

# Diagnóstico retrospectivo de la infección congénita por citomegalovirus

## *Retrospective diagnosis of citomegalovirus congenital infection*



### Raquel Pinillos Pisón

Licenciada en Medicina y Cirugía, Neonatóloga, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Zaragoza, España

**Javier López Pisón**, Licenciado en Medicina y Cirugía, Neuropediatra, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Zaragoza, España

**Juan Pablo García Iñiguez**, Licenciado en Medicina y Cirugía, Pediatra, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Zaragoza, España

**Victoria Caballero Pérez**, Licenciada en Medicina y Cirugía, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Zaragoza, España

**Marta Vara Callau**, Licenciada en Medicina y Cirugía, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Zaragoza, España

**Víctor Rebage Moisés**, Licenciado en Medicina y Cirugía, Neonatólogo, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Zaragoza, España

**Segundo Rite Gracia**, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Zaragoza, España

Acceda a este artículo en siicsalud

Código Respuesta Rápida  
(Quick Response Code, QR)



Recepción: 10/9/2012 - Aprobación: 14/12/2012  
Primera edición, www.siicsalud.com: 22/2/2013

Enviar correspondencia a: Raquel Pinillos Pisón, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, 50009, Zaragoza, España  
raquel\_pinillos@yahoo.es



+ Especialidades médicas relacionadas, producción bibliográfica y referencias profesionales de los autores.

### Abstract

*Cytomegalovirus is the most common congenital viral infection. It is the cause of many abnormalities involving the central nervous system. Since it is mainly asymptomatic, two thirds of the sequelae occur in asymptomatic children at birth. After the first 2-3 weeks of life, the detection of viral DNA in the dried blood sample from the neonatal screening has been proposed as an ideal and unique method of certainty for retrospective diagnosis. The technique is carried out by dilution and extraction-amplification, with results appearing in less than 48 hours. A variable number of protocols has been published in the literature that refer various in vitro sensitivities that depend mainly on the extraction method from the heel prick and amplification that are heterogeneous (between 35%-98%). The sensitivity is greater if it is secondary to primary infection, in selected patients, using a good method of extraction and amplification and doubled, or even tripled, amplification. The specificity is consistent in all of them and reaches almost 100%. The viral load test of the voucher is underestimated but highly related to that of fresh blood and although it may not have viraemia at birth, viraemic infants have higher risk of developing neurosensory sequelae, making clinical detection rates in selected patients high. The feasibility of alternatives such as the umbilical cord in Japan, and in recent years, the use of dried urine on filter paper have been described, with good results reported.*

**Key words:** congenital citomegalovirus infection, retrospective diagnosis

### Resumen

La infección por citomegalovirus (CMV) es la infección viral congénita más frecuente. Es causa de múltiples anomalías que involucran al sistema nervioso central. Debido a que es principalmente asintomática, dos tercios de las secuelas se producen en niños asintomáticos al nacimiento. Pasadas las primeras 2 a 3 semanas de vida, se ha propuesto como método ideal y único de certeza para el diagnóstico retrospectivo la detección del ADN viral en la muestra de sangre seca procedente de la pesquisa neonatal. La técnica se lleva a cabo mediante dilución, amplificación y extracción, con resultado en menos de 48 horas. Se han publicado en la bibliografía numerosos protocolos, que refieren variadas sensibilidades *in vitro* que dependen fundamentalmente del método de extracción, desde la prueba del talón y de la amplificación, que son muy heterogéneas (entre 35% y 98%). La sensibilidad es mayor si es secundaria a primoinfección, en pacientes seleccionados, si se utiliza un buen método de extracción y amplificación, y una amplificación duplicada o, incluso, triplicada. La especificidad en todos ellos es concordante y alcanza casi el 100%. La carga viral de la prueba del talón está subestimada, pero altamente relacionada con la de sangre fresca y, aunque puede no haber viremia al nacimiento, los neonatos vírémicos son los que tienen mayor riesgo de presentar secuelas neurosensoriales, por lo que los índices de detección clínica en pacientes seleccionados son altos. Se ha descrito la viabilidad de otras alternativas, como el cordón umbilical en Japón y, en los últimos años, el uso de orina seca en papel de filtro, y se comunicaron buenos resultados.

**Palabras clave:** infección congénita por citomegalovirus, diagnóstico retrospectivo

### Introducción

La infección por citomegalovirus (CMV) es la infección viral congénita más frecuente, con una prevalencia del 0.4% al 2.3%.<sup>1</sup> Constituye el 60% de las infecciones congénitas y la principal causa de deficiencia neurosensorial adquirida intraútero. La seroprevalencia en embarazadas varía de un 35% a un 95%.<sup>2,3</sup> Desconocemos la prevalencia de la infección congénita en el recién nacido.

La infección puede ser secundaria a primoinfección materna o a una recurrencia. La primoinfección tiene consecuencias más graves, sobre todo durante la primera mitad del embarazo, y la posibilidad de transmisión es mayor en el tercer trimestre.<sup>4,5</sup>

La transmisión madre-hijo es principalmente el resultado de una primoinfección (1% al 4% de las mujeres sero-

negativas durante el embarazo)<sup>6</sup> y conlleva un riesgo de transmisión de un 24% a un 75% (promedio del 40%).<sup>7,8</sup> Cada vez hay mayor información acerca de que la evolución de una infección congénita secundaria a reactivación puede ser sintomática y grave.<sup>9,10</sup>

### Manifestaciones clínicas

La infección cursa con amplio espectro de manifestaciones, desde asintomática hasta un síndrome congénito muy grave. Sólo del 10% al 12% están sintomáticos en el período neonatal.<sup>6,11,12</sup>

En general, entre un 10% y un 20% de los afectados tendrán daño neurológico en el seguimiento posterior, cifra que se eleva hasta un 60% en el caso de recién nacidos sintomáticos.<sup>1,8,13</sup> Es causa de múltiples anomalías

que involucran al sistema nervioso central (SNC), como retraso mental, autismo, trastornos del aprendizaje, parálisis cerebral, epilepsia, déficit visual y auditivo. Entre los casos asintomáticos al nacimiento, entre un 11% y un 13.5% tendrán secuelas permanentes en los años siguientes.<sup>11,12,14</sup>

Los hallazgos neurorradiológicos incluyen lesiones multifocales o difusas, principalmente en la sustancia blanca profunda (más acusadas en regiones parietales), ventriculomegalia, calcificaciones intracraneales, vasculopatía de las arterias talamoestriadas, atrofia cerebral y encefalopatía destructiva, con anomalías en las circunvoluciones o sin ellas.<sup>15,16</sup> Los factores de peor pronóstico cognitivo son la microcefalia y las anomalías en las neuroimágenes.<sup>17</sup>

El síntoma más frecuente es la hipoacusia, presente en el 10% al 15% de los casos y hasta en un 30% a un 65% si la infección fue sintomática en el período neonatal. Está especialmente ligado a la presencia de petequias, hepatitis y restricción del crecimiento intrauterino al nacimiento.<sup>18</sup> Es bilateral en dos tercios de los niños, puede ser fluctuante y progresar durante la infancia en un 30% a un 80%,<sup>8</sup> y hasta en el 50% es de establecimiento tardío,<sup>19,20</sup> con una media de edad al establecimiento de 44 meses.<sup>8,19,21,22</sup> Se estima que es responsable de un 15% a un 20% de la sordera neurosensorial. Los pacientes con cargas virales más altas en sangre y orina tienen mayor riesgo.<sup>23,24</sup>

Koyano *et al.* refirieron, en 2011, que hasta un 25% de los casos de retraso mental de causa desconocida se asocian con la infección y la mitad de las secuelas son de establecimiento tardío.<sup>25</sup>

### Generalidades acerca del diagnóstico

La mayoría de las infecciones en embarazadas son asintomáticas. El diagnóstico más fiable se establece mediante seroconversión. La IgM constituye un marcador de infección activa o reciente. Los hallazgos de los últimos estudios indican que menos del 10% de las mujeres IgM positivas infectan al feto.<sup>26</sup> La presencia de IgM combinada con índice de baja avidéz tiene el mismo valor que la seroconversión.<sup>7,26-28</sup>

El diagnóstico fetal se establece mediante amniocentesis a partir de la semana 21 a 22 (el feto comienza a excretar orina a partir de la semana 19 a 20), con un intervalo de 6 a 8 semanas tras la infección materna. La sensibilidad y la especificidad del cultivo del líquido amniótico y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son del 70% al 80%, del 100% y 90% al 98%, y del 92% al 98%, respectivamente. Por debajo de 1 000 copias/ml hay bajo riesgo de enfermedad sintomática, mientras que con más de 100 000 copias/ml existe una alta especificidad en el diagnóstico de la infección congénita sintomática.<sup>7,29</sup> Sólo un tercio de los niños con infección sintomática presenta hallazgos en las pruebas de imagen durante el embarazo.<sup>30</sup>

El diagnóstico de infección congénita en el período neonatal depende del aislamiento del virus en orina o la detección del ADN viral mediante PCR en sangre, orina o saliva o líquido cefalorraquídeo (LCR) durante las 2 a 3 primeras semanas de vida. El método diagnóstico ideal es el cultivo viral en orina, saliva, o en ambas, pero cada día es más utilizada la técnica de PCR, mediante la amplificación del ADN viral, la cual resulta de elevada sensibilidad y especificidad. Demler y Warren<sup>31,32</sup> demostraron un 93% a un 100% y un 89% a un 95% de sensibilidad y especificidad, respectivamente.

La antigenemia o anticuerpos IgM frente al CMV tienen una sensibilidad inferior (entre el 30% y 40%, y del 70%, respectivamente)<sup>23,33</sup> y su negatividad no invalida el diagnóstico. Además, la IgM puede tener falsos positivos, por lo que siempre debe confirmarse mediante cultivo o PCR.

El cultivo viral convencional es muy poco utilizado porque los resultados pueden demorarse 2 semanas.<sup>27</sup> El cultivo de orina en *shell vial* es el método diagnóstico más utilizado por su rapidez (24 h) y alta especificidad. Sin embargo, la sensibilidad es algo más baja (94%). La PCR en sangre también tiene buena sensibilidad, aunque la carga viral puede ser muy baja en pacientes asintomáticos o poco sintomáticos. Las PCR en saliva, y especialmente en LCR, tienen menor sensibilidad y no deben ser las únicas herramientas en el diagnóstico. La PCR en orina, se considera en muchos centros la técnica de referencia por su alta sensibilidad.<sup>23,27,33-36</sup>

Ante la falta de un cribado habitual, algunas infecciones poco sintomáticas y la inmensa mayoría de las asintomáticas pasan desapercibidas al nacimiento. El porcentaje de secuelas en los niños con infección asintomática es bajo, de alrededor del 13%. Sin embargo, debido a que la infección congénita es principalmente asintomática, dos tercios del total de las secuelas se producen en niños sin síntomas al nacimiento.<sup>11</sup> Los niños con infección sintomática no diagnosticada pueden recibir diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas de peor pronóstico, como leucodistrofias o leucoencefalopatías.<sup>15,16,37</sup>

En cuanto al diagnóstico retrospectivo, pasadas las 2 a 3 primeras semanas de vida, ninguno de los procedimientos anteriores permite diferenciar una infección congénita de una adquirida.

En la última década, se ha ido estableciendo el papel de la detección de ADN del virus en la muestra de sangre de papel de filtro procedente de la pesquisa neonatal realizada para despistaje endocrino-metabólico, proponiéndose como método ideal y único de certeza para un diagnóstico retrospectivo. Esta muestra se extrae en la primera semana de vida para el cribado neonatal de metabolopatías y se almacena en cada comunidad habitualmente entre 1 y 5 años.

La leucoencefalopatía de la infección congénita por CMV plantea el diagnóstico diferencial con enfermedades neurodegenerativas y la confirmación de dicha infección como causa permite asegurar el carácter no progresivo de la leucoencefalopatía, a diferencia de las de origen metabólico, obviar estudios extensos y costosos y mejorar los resultados diagnósticos en el grupo global de las leucoencefalopatías, de las que hasta un 50% pueden quedar sin diagnóstico.

### Diagnóstico mediante PCR

A finales de 1985 se desarrolló la técnica de PCR, lo que permitió, en 1994, el diagnóstico de infección congénita por CMV en muestras de sangre de 11 recién nacidos en comparación con el aislamiento viral. Shibatta, en 1994, aplica esta técnica por primera vez sobre la muestra de sangre seca del papel de filtro de la pesquisa neonatal<sup>38</sup> y, posteriormente, el método fue simplificado por Barbi y col. en 2000, confirmándose en sucesivos estudios.<sup>39,40</sup>

La técnica se lleva a cabo mediante dilución, amplificación y extracción, con resultado definitivo en menos de 48 horas y con escaso coste en relación con otras técnicas. Las aplicaciones han sido diversas; además de confirmar el momento de la infección intraútero, se ha utilizado para validar criterios de resonancia magnética como

predictores de infección por CMV,<sup>15</sup> estimar el impacto de la infección congénita por CMV como etiología de la sordera neurosensorial<sup>40</sup> y para estudios de prevalencia en diferentes países.<sup>41</sup>

La conservación de la muestra tiene lugar a temperatura ambiente, dada la estabilidad del ADN sin constatare pérdida de sensibilidad, con lo cual se obtuvieron resultados positivos hasta 20 meses,<sup>42</sup> 11 años,<sup>43</sup> y 17 y 18 años después.<sup>44,45</sup> Atkinson, en dos preparados con sangre CMV positiva, obtuvo un decremento progresivo de la carga viral conforme pasaba el tiempo, hasta los 2 años, sobre todo a partir de los 18 meses. No podría ocurrir que niños de 17 años fueran positivos a menos que la carga viral al nacimiento fuera superior a  $10^8$ , ya que la carga viral excepcionalmente es superior a  $10^6$ . Es decir, que es posible que después de una fase inicial de declinación permanezca estable a cargas bajas durante largos períodos.<sup>44</sup>

La posibilidad de contaminación horizontal de tarjetas adyacentes fue referida por Johansson en 1997, pero no ha sido confirmado por otros grupos diferentes.<sup>44,45</sup>

Esta técnica ha mostrado una sensibilidad del 71% al 100% y una especificidad del 99% al 100%, comparada con el cultivo de orina.<sup>40</sup> Además, puede tener un valor pronóstico, ya que los niños con hipoacusia presentan cargas virales más altas en sangre seca.<sup>46</sup> El único problema es que la prueba pierde sensibilidad en niños con cargas virales bajas al nacimiento ( $< 10^4$  copias/ml). Por tanto, la determinación de la PCR para CMV en sangre seca debe reservarse inicialmente para estudios epidemiológicos y para el diagnóstico retrospectivo de la infección, pero no debe sustituir al cultivo o a la PCR en orina como pruebas de elección en el diagnóstico del recién nacido.

En 2006, en series de 500 y 900 neonatos mostró una sensibilidad y especificidad del 100% al 99% al compararlo con el cultivo de orina, tanto en casos sintomáticos como en asintomáticos.<sup>13</sup> Una sensibilidad discretamente inferior demostraron Johansson (que aplica esta técnica en niños de 12 a 18 años) y Yamamoto, aunque manteniendo la especificidad en torno al 100%.<sup>45,47</sup> Atribuyen esta menor sensibilidad a una posible inhibición de la técnica de PCR con el paso del tiempo. En contraste con lo anterior, el estudio prospectivo y con una muestra de gran tamaño llevado a cabo por Boppana y col. muestra que, aunque mantuvo una excelente especificidad, cercana al 100%, la sensibilidad de la determinación fue de un 34%, muy lejos de lo publicado hasta entonces. Estos hallazgos parecen no corresponderse con un método de pesquisa inferior al utilizado previamente, sino que sugieren que no todos los niños con infección congénita por CMV permanecen víremicos al nacimiento.<sup>48</sup>

En todos ellos, la sensibilidad varía entre un 35% y un 98%, según los diferentes trabajos publicados, pero la especificidad es concordante, ya que alcanza casi el 100%, de forma que una determinación negativa no lo excluye, pero una positiva prácticamente lo confirma. Así, inicialmente fue propuesta como un método de diagnóstico retrospectivo,<sup>1,15,42,45,47,49,50</sup> pero posteriormente también como método de rastreo.<sup>13</sup> Se han publicado numerosos protocolos<sup>42,45,47,49,50-52</sup> que refirieron sensibilidades variables *in vitro*, dependiendo fundamentalmente del método de extracción. La sensibilidad de la detección de ADN de CMV en la prueba del talón, señalada en cuatro grandes series, varió entre un 34% y un 100%.<sup>43,44,49</sup> La primera fue la de Barbi, en 2000, que obtuvo una sensibilidad del 81.9% al 100% y una especificidad del 92.2% al 99.7%. Se diseñó de forma retrospectiva, incluyendo a 509 pa-

cientes, con una seroprevalencia en la gestante en torno al 79%. El criterio de inclusión utilizado fue la presencia de síntomas compatibles o la primoinfección materna. Hubo 72 neonatos con infección confirmada, se usaron 3 discos de 9 mm de la muestra de sangre seca de la prueba del talón y la extracción fue mediante *shock* templado.<sup>49</sup> En la segunda serie, de Soetens (2008),<sup>43</sup> se obtuvo una sensibilidad del 73% al 83%. La seroprevalencia comunicada en esa población fue de alrededor del 50%. El diseño fue retrospectivo, se llevó a cabo con la finalidad de efectuar una pesquisa universal, sin seleccionar pacientes, y fueron 55 los neonatos con infección confirmada. Se utilizó toda la muestra de sangre seca (10 mm) de la prueba del talón; la extracción se realizó con fenol-cloroformo (83% de sensibilidad) y easyMAG® (biomerieux) (73% sensibilidad). Posteriormente, Atkinson,<sup>44</sup> en 2009, presentó una nueva serie, también de diseño retrospectivo, que incluyó 70 neonatos con infección ya confirmada por CMV. Utilizó la mitad de la muestra (5 mm), el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) y obtuvo una sensibilidad del 72% al 74%. En 2010, Boppana<sup>48</sup> presentó resultados dispares. Analizó de forma prospectiva 20 448 neonatos en una población con alta seroprevalencia estimada (en torno al 70%), a modo de pesquisa universal, y se verificaron 92 niños con infección congénita confirmada. Se utilizan dos discos (6 mm) y la extracción se llevó a cabo con el Kit Qiagen M48 (Qiagen), con el que se obtuvo una sensibilidad baja, de entre el 28% y el 34%, aunque con una especificidad del 99.9%. En el último estudio publicado, de acuerdo con nuestro conocimiento,<sup>53</sup> se analizaron de forma prospectiva 271 neonatos de riesgo (síntomas compatibles o primoinfección materna), en una población con una seroprevalencia estimada del 50%; se comprobaron 64 casos de infección confirmada. Se utilizó toda la muestra disponible (10 mm) y se extrajo con el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit modificado (Qiagen) y con fenol-cloroformo, con lo que se obtuvo una sensibilidad del 96.9% al 100% y del 95%, respectivamente, y una especificidad del 98.1% al 99% y del 98.5%, en el mismo orden. Leurez-Ville y col. analizaron las principales razones de la discrepancia entre los resultados. En primer lugar, el tamaño de la muestra, ya que un tamaño mayor podría aumentar su sensibilidad. En segundo lugar, las características de la población en estudio, ya que cuando se aplicó a poblaciones de alto riesgo y no como pesquisa universal, la sensibilidad fue alta. La sensibilidad por medio del rastreo también fue muy alta (82%) cuando se aplicó en un país de baja seroprevalencia.<sup>43</sup> En este mismo estudio, la sensibilidad fue mayor cuando la responsable era una primoinfección, en comparación con una reactivación o reinfección (82% frente a 54%), lo que podría relacionarse con una supuesta carga viral más baja en el segundo caso. Por otro lado, en el estudio reciente e importante de Boppana,<sup>48</sup> la determinación tuvo escasa sensibilidad (34%) y, en este caso, no se publicaron los datos acerca de la proporción de infección tras reinfección o reactivación, aunque es probable que fuera alta porque la mayoría de madres procedían de grupos étnicos con alta seroprevalencia de CMV.<sup>54</sup>

En 2008, Barbi y col. llevaron a cabo un examen externo de calidad en la detección de ADN mediante PCR en la prueba del talón. Participaron 27 laboratorios, 28 mediante PCR en tiempo real y 5 con PCR convencional. Se obtuvo un resultado positivo correcto en el 91% de los casos en aquellas muestras cuya carga viral superaba los  $8.8 \times 10^4$  copias/ml, en el 59% y el 12% con cargas virales de  $9.4 \times 10^3$  y  $7.3 \times 10^3$  copias/ml, respectivamen-

te. Así, el estudio reveló un límite muy escaso de detección ( $8.8 \times 10^4$  copias/ml), lo que estableció una urgente necesidad de mejorar los distintos métodos para llevarla a cabo, a partir de la muestra de sangre seca del papel de filtro. Como causa más probable de falsos positivos (9% de laboratorios y 11% de los datos) se identifica la pérdida de adhesión a las medidas de seguridad estrictas, cuyo objetivo es evitar la posibilidad de contaminación y transferencia.<sup>55</sup> No hay estándares internacionales disponibles y se ha demostrado que la amplificación del ácido nucleico por métodos como la PCR varía considerablemente entre laboratorios. La influencia del método de extracción y del área utilizada de la muestra de sangre seca podrían explicar los resultados discordantes del primer ensayo clínico europeo sobre la detección de ADN de CMV en la prueba del talón en el rango de carga viral baja. Como puntos críticos, Barbi incluye el método de elución y extracción, la cantidad de papel manchado, las características individuales de las pruebas de PCR y el criterio para considerar la positividad.

Sin embargo, el mayor factor responsable de las discrepancias entre estudios son las diferencias en los métodos de extracción desde la prueba del talón,<sup>56</sup> que son muy heterogéneos.<sup>57</sup> La evaluación de distintos métodos de extracción y amplificación realizada por De Vries en 2009 mostró claramente que algunos métodos informan mayor sensibilidad, la cual varía del 32% al 73%.<sup>52</sup> De Vries comparó un panel de métodos de extracción de ADN disponibles actualmente,<sup>39,42,47,49,51</sup> apuntando desde un principio que es difícil la comparación debido a diferencias entre los estudios, en relación con el origen y el volumen de las muestras. Las variables potenciales que influyen sobre la sensibilidad son el origen de la muestra, el volumen de sangre seca, el volumen de elución y el método de amplificación. Como ejemplos aportados en este estudio, con el QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) se ha referido una sensibilidad del 95%, con una carga viral de  $3.6 \log_{10}$  copias/ml en un experimento con sangre diluida de un paciente transplantado,<sup>51</sup> mientras que con una modificación del anterior se consiguió una sensibilidad del 100% en la prueba del talón de 7 neonatos con CMV congénito, de los que sólo 3 eran sintomáticos.<sup>42</sup> Como ya se señaló anteriormente, Soetens informa una sensibilidad del 73% de la extracción con NucliSENS® easyMAG® al efectuar 53 pruebas del talón de neonatos con infección congénita (de los que sólo 2 fueron sintomáticos).<sup>43</sup> Considerando la extracción de ADN con medidas de *shock* templado, Yamamoto aporta una sensibilidad del 71.4% en combinación con una n-PCR convencional, al realizar la prueba del talón de 7 neonatos infectados (de los que 5 fueron sintomáticos).<sup>55</sup> El índice de sensibilidad mayor usando el modo de *shock* templado fue obtenido por Barbi, cuyo método tuvo una sensibilidad del 100% al analizarse 72 neonatos infectados (26 sintomáticos) usando una muestra de 3 mm probada por triplicado.<sup>39</sup> En el estudio de De Vries de 2009, la influencia potencial de diferencias fue excluida por usar muestras clínicas idénticas de pacientes transplantados, que contenían ADN extracelular e intracelular, idénticos volúmenes de entrada y salida y métodos de amplificación para todas las muestras analizadas. El protocolo que resultó más sensible de los comparados en este estudio fue el descrito por Barbi y col., modificado y no modificado, el QIAamp DNA Investigator Kit, el BioRobot Universal System y el Magna Pure LC. Para todos ellos, la mayor sensibilidad fue alcanzada cuando las muestras fueron analizadas por triplicado. El protocolo triplicado

de Barbi tuvo una sensibilidad del 100%, 86% y 50%, con cargas virales de 5-4, 4-3 y 3-2  $\log_{10}$  copias/ml, en orden respectivo.<sup>52</sup>

Göhring, en 2010, estudió y comparó los resultados en cuanto a sensibilidad, combinando distintos métodos de extracción y técnicas de PCR.<sup>57</sup> Ya Soetens, en 2008, mostró que la combinación de easyMAG® DNA Extraction con un protocolo de PCR convencional tuvo sólo una sensibilidad del 45%.<sup>43</sup> Atkinson, combinando la extracción con el kit comercial de Qiagen y una PCR a tiempo real (Taq Man), efectuando diluciones seriadas para cuantificación y analizando todas las muestras por triplicado obtuvo una sensibilidad del 72% al 74%.<sup>44</sup> En este estudio, el valor de corte para la detección positiva fue de 1 500 copias/ml de sangre completa, una comparación que resulta favorable con el estudio de calidad externo de Barbi de 2008, donde el 50% de los laboratorios obtuvieron como valor límite 9 300 copias/ml.<sup>55</sup> En el estudio de Göhring, la combinación más sensible consistió en una PCR convencional usando *primers* de la región 1E1E4 y extracción con fenol-cloroformo mediante parches de 1 x 6 a 3 x 3 de sangre seca o el QIAamp DNA Blood Mini Kit con la totalidad de la muestra de sangre seca. Usando una PCR a tiempo real con hibridación en prueba, la mayor sensibilidad resultó de la extracción con fenol-cloroformo y el QIAamp DNA Blood Mini Kit usando la totalidad de la muestra. El peor resultado fue obtenido con NucliSENS® easyMAG® y la extracción templada, que fueron ineficientes (las muestras de extracción templada frecuentemente fueron hemolíticas, lo que podría explicar la pérdida de sensibilidad en el LightCycler® 480 System debido a efectos inhibitorios de la sangre contaminada). Así, concluyen que si se tiene en cuenta que la carga viral media en sangre de cordón publicada por Halwach fue de 2 300 copias /ml,<sup>58</sup> la mejor combinación de extracción y amplificación puede consistir en extracción con fenol-cloroformo o QIAamp DNA Blood Mini Kit en combinación con una n-PCR convencional, usando al menos una tarjeta completa de sangre seca. Esto conlleva fuertes repercusiones para el diagnóstico retrospectivo, ya que la vasta mayoría de los neonatos infectados son asintomáticos, con cargas virales bajas al nacimiento, y sólo serían detectados por la combinación óptima. Para el diagnóstico de rutina, el QIAamp DNA Blood Mini Kit podría ser una buena solución sensible y viable.<sup>57</sup> Soetens (2008), confirmó también estos resultados.<sup>43</sup> Es sorprendente que el método de extracción templada descrito por Shibatta y modificado por Barbi no fuera eficaz. Estos resultados conflictivos podrían ser explicados por el protocolo modificado publicado por De Vries en 2009, donde las muestras fueron inicialmente incubadas a 4°C durante una noche antes de la incubación a 55°C.<sup>52</sup>

La sensibilidad de la detección de ADN de CMV en la prueba del talón es mayor si la infección es secundaria a una primoinfección materna, si se utilizan buenos métodos de extracción y amplificación, y una amplificación duplicada, o incluso triplicada, es importante para alcanzar una sensibilidad óptima (la duplicación de la prueba incrementó la sensibilidad de un 58% a un 73% en el estudio de Soetens de 2008).<sup>43,57</sup>

También se han descrito las ventajas adicionales de la PCR a tiempo real sobre la n-PCR convencional, como son el menor riesgo de contaminación, la mayor facilidad de implementación y el menor coste. El primer estudio que muestra una amplificación con PCR a tiempo real fue el de Scanga, en 2006. En este caso, la sensibilidad y la especificidad fueron del 100%.<sup>42</sup> El inconveniente teórico

es que la sensibilidad de esta muestra no es tan baja como la descrita para la PCR convencional (1 600 copias/ml frente a 400 copias/ml).<sup>1,49,50</sup>

### Carga viral

Se han publicado diversos estudios sobre la carga viral en sangre de neonatos infectados. Halwach-Bawman<sup>58</sup> informó una media de carga viral en sangre venosa de cordón de 2 300 copias/ml ( $3.4 \log_{10}$ ), sin encontrar diferencias entre pacientes sintomáticos y asintomáticos. En contraste con lo anterior, numerosos ensayos han referido niveles de ADN de CMV significativamente mayores en niños sintomáticos que en asintomáticos. Boppana<sup>24</sup> señala una media de carga viral en sangre periférica significativamente mayor en 18 neonatos sintomáticos, en comparación con 58 asintomáticos. Además, entre los asintomáticos, aquellos que en el seguimiento presentaban pérdida auditiva tenían una carga viral mayor. Los mismos resultados fueron obtenidos por Lanari<sup>23</sup> y Revello.<sup>33</sup> En el estudio de De Vries, el 86 % de la sensibilidad del protocolo de Barbi se obtuvo con 3 a 4  $\log_{10}$  copias/ml,<sup>52</sup> lo que, combinado con los resultados de Halwach, conllevaría a que una cantidad de casos no fueran detectados a pesar de utilizar el método más sensible disponible. El estudio de calidad externa de Barbi indica que, si tenemos en cuenta el dato de Halwach (carga viral media de 2 300 copias/ml), menos del 50% de todos los laboratorios serían capaces de identificar recién nacidos congénitamente infectados, ya que sólo unos pocos de ellos pudieron detectar cargas de 730 copias/ml.<sup>55</sup>

Se ha descrito que puede no haber viremia en el momento del nacimiento,<sup>59</sup> pero los datos ya expuestos sugieren que los recién nacidos virémicos al nacimiento tienen más riesgo de manifestar síntomas neurológicos y que las cargas virales más altas están asociadas con pérdida auditiva más grave.<sup>24,46</sup> Vauloup-Fellous refirió que la cuantificación de la carga viral de la prueba del talón está infraestimada respecto de las muestras de sangre fresca, con una diferencia media de  $0.73 \log_{10}$  genoma/copias/ml, y que fue significativamente mayor en niños sintomáticos y en aquellos con pérdida auditiva;<sup>51</sup> estos resultados son congruentes con los de Boppana (2005) y de Lanari, en los que el 90% de los recién nacidos que presentarían pérdida auditiva tenían cargas virales al nacimiento superiores a 1 000 copias/ml.<sup>23,24</sup> Los valores límites de detección de ADN de CMV estuvieron, en su mayoría, en el rango referido en la bibliografía (2 000 a 4 000 copias/ml)<sup>42,51</sup> y fueron mucho más altos que los obtenidos usando sangre fresca (rango de 50 a 500 copias/ml). Esto se debe a la cantidad de sangre extraída (50  $\mu$ l en comparación con 200 a 500  $\mu$ l de sangre fresca) y a que el protocolo de extracción usado es menos eficiente que el de sangre fresca. Sin embargo, aunque la sensibilidad *in vitro* puede ser relativamente baja, los índices de detección clínica son en general altos en pacientes seleccionados. En el estudio de Leurez-Ville, en 2011, la carga viral de los niños sintomáticos fue significativamente mayor con el primer protocolo (PCR a tiempo real diseñada por el propio laboratorio y amplificada por duplicado, en comparación con el kit comercial CMV PCR kit [Abbott] en una amplificación única).<sup>53</sup> También Vauloup-Fellous<sup>51</sup> y Walter y col. en 2008,<sup>46</sup> demostraron

que la cuantificación de ADN a partir de la prueba del talón, basada en el kit de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit, se relacionó en gran medida con la cuantificación hecha en sangre fresca.

### Otros métodos diagnósticos

En los últimos años se ha descrito la viabilidad de otra alternativa para detectar la infección congénita. El uso de orina seca en papel de filtro ha sido sugerida por Nozawa<sup>60</sup> y Koyano<sup>25</sup> ya que ésta habitualmente contiene cargas virales de CMV mayores que las de sangre. Es probable que los métodos de extracción sean aplicables. En 2011 en Japón, Koyano llevó a cabo la determinación en más de 21 000 recién nacidos, a modo de pesquisa. La infección congénita por CMV fue identificada en 66 casos (0.31%). Se detectó en 9 de 12 niños mediante la prueba del talón, y en todos ellos en el cordón umbilical. La carga viral resultó en acuerdo con la carga viral de la orina diluida. Ambas cargas virales en orina fueron mayores que las verificadas en sangre.

Otra muestra propuesta como arma de diagnóstico retrospectivo en Japón ha sido el cordón umbilical. Por prácticas culturales, éste se preserva en casa limpio y seco, como símbolo del vínculo madre-hijo, durante años. Son varias las series que demuestran la detección de ADN de CMV en el cordón umbilical después de varios años. Ogawa<sup>61</sup> en 2006 y Tagawa<sup>62</sup> en 2009 demostraron un 15% y un 12%, respectivamente, de infección congénita entre pacientes con hipoacusia.

En la actualidad no existe una pesquisa neonatal implementada para el diagnóstico de la infección congénita. Esto es objeto de debate por la incidencia de la infección congénita y la gran importancia como etiología de la sordera neurosensorial. Se asumen dos beneficios teóricos, que serían la identificación de niños en riesgo para el establecimiento tardío o la progresión de hipoacusia y la aplicación de tratamiento para prevenir dicho establecimiento. Leurez-Ville<sup>53</sup> propuso que la detección de ADN de CMV mediante PCR de la muestra de sangre seca de la prueba del talón sería, probablemente, un método eficiente de identificación de neonatos con alto riesgo de secuelas a largo plazo. De Vries<sup>52</sup> sugirió que el protocolo de Barbi y el BioRobot Universal System serían los candidatos más apropiados para ello. Sin embargo, sólo el estudio dirigido por Boppana<sup>48</sup> llevó a cabo una pesquisa en una escala que se aproxima a universal, obteniendo baja sensibilidad. Aproximadamente el 80% de los neonatos con infección congénita no tienen síntomas ni secuelas a largo plazo. En la actualidad, el tratamiento está reservado para neonatos sintomáticos, que pueden en su mayoría ser detectados clínicamente y confirmados con las pruebas disponibles. Además, la terapia antiviral no es curativa y no previene toda la discapacidad.<sup>63</sup> No está claro que exista alguna prueba diagnóstica con la suficiente sensibilidad y especificidad, a partir de la prueba del talón, para ser considerada susceptible de aplicar como pesquisa. Otros líquidos corporales, como la saliva o la orina, podrían ser superiores porque la cantidad de virus es significativamente mayor. Así, el beneficio de una detección precoz de los casos que no son clínicamente aparentes necesita ser mejor definido, ya que podría ser un valioso instrumento de salud pública en la actualidad.

**Autoevaluación del artículo**

La infección congénita por citomegalovirus se asocia con elevada morbilidad neonatal.

**En relación con la epidemiología de la infección congénita por citomegalovirus, señale la respuesta correcta:**

- A, Es la infección viral congénita más frecuente con una prevalencia de 0.4% a 2.3%; B, La seroprevalencia en mujeres es cercana al 10%, con incremento en los últimos años; C, Está instaurado el cribado serológico sistemático en el embarazo; D, Todas son correctas; E, Ninguna es correcta.

Verifique su respuesta en [www.siicsalud.com/dato/evaluaciones.php/125958](http://www.siicsalud.com/dato/evaluaciones.php/125958)**Cómo citar este artículo**

Pinillos Pisón R, López Pisón J, García Iñiguez JP, Caballero Pérez V, Vara Callau M, Rebage Moisés V, Rite Gracia S. Diagnóstico retrospectivo de la infección congénita por citomegalovirus. *Salud i Ciencia* 20(3):285-91, Nov 2013.

**How to cite this article**

Pinillos Pisón R, López Pisón J, García Iñiguez JP, Caballero Pérez V, Vara Callau M, Rebage Moisés V, Rite Gracia S. Retrospective diagnosis of cytomegalovirus congenital infection. *Salud i Ciencia* 20(3):285-91, Nov 2013.

**Bibliografía**

- Zucca C, Binda S, Borgatti et al. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection and cortical maldevelopment. *Neurology* 61:710-712, 2003.
- Misono S, Sie K, Weiss N, Huang M, Boeckh M, Norton S et al. Congenital Cytomegalovirus Infection in Pediatric hearing Loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 137:47-53, 2011.
- Bradford R, Cloud G, Lakeman A, Boppana S, Kimberlin D, Jacobs R et al. Detection of Cytomegalovirus (CMV) DNA by Polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *JID* 191:227-233, 2005.
- Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 17:353-63, 2007.
- Peckham C, Tooke P, Logan S, Giaquinto C. Screening options for prevention of congenital cytomegalovirus infection. *J Med Screen* 8:119-24, 2001.
- Naessens A, Casteels A, Decatte L, Foulon W. A serologic strategy for detecting neonates at risk for congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 146:194-7, 2005.
- Barbi M, Binda S, Caroppo S, Calvario A, Germinario C, Bozz IA, et al. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 25:156-9, 2006.
- Gaytant MA, Steegers EA, Semmekrot BA et al. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv* 57:245-256, 2002.
- Estripeaut D, Moreno Y, Ahumada-Ruiz S et al. Seroprevalencia de la infección por citomegalovirus en puérperas y su impacto neonatal. *An Pediatr (Barc)* 66:135-139, 2007.
- F. Baquero-Artigao y Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr* 71(6):535-547, 2009.
- DeOry F, Castañeda R, Ramírez R, Pachón I. Estudio seroepidemiológico frente a citomegalovirus en mujeres en edad fértil de la Comunidad de Madrid. *Med Clin (Barc)* 111:286-7, 1998.
- De Ory F, Ramírez R, García-Comas L, León P, Sagües MJ, Sanz JC. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol* 19:85-9, 2004.
- Francoual C, Rozenberg F, Gelot A. Infection maternofoetale à cytomegalovirus. *Med Mal Infect* 26:441-446, 1996.
- Pinillos R, Olloqui A, Torres y col. Citomegalovirus congénito neonatal. Comunicación de un caso y revisión. *Acta Pediatr Esp* 67:234-238, 2009.
- Malm G, Engman ML. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonat Med* 12:154-159, 2007.
- Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 41:192-197, 2008.
- Fowler KB, Dahle AJ, Boppana S et al. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr* 135:60-64, 1999.
- Kenneson A, Canon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 17:253-276, 2007.
- Boppana S, Fowler KB, Britt WS, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection infants born to mother with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 104:55-60, 1999.
- Gaytant MA, Rours GI, Steegers EA, Galama JM, Semmekrot BA. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case report and review of the literature. *Eur J pediatr* 162:248-253, 2003.
- Pass RF. Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes* 12:50-55, 2005.
- Haginoya K, Ohura T, Kon K et al. Abnormal white matter lesions with sensorineural hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection: retrospective diagnosis by PCR using Guthrie cards. *Brain Dev* 24:710-714, 2002.
- Van der Knaap MS, Vermeulen G, Barkhof F et al. Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: Use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology* 230:529-536, 2004.
- Noyola D, Demler GJ, Nelson CT et al. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 138:325-331, 2001.
- Rivera L B , Boppana S B , Fowler K B, Britt W J , Stagno S, Pass R F. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 110:762-7, 2002.
- Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, et al. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus. *J Pediatr* 130:624-630, 1997.
- Dahle AJ, Fowler KB, Wright JD, et al. Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital CMV. *J Am Acad Audiology* 11:283-290, 2000.
- Barbi M, et al. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J* 22:39-42, 2003.
- Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *J Clin Virol* 41:57-62, 2008.
- Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol* 35:216-20, 2006.
- Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 117:76-83, 2006.
- Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RD, Lakeman FD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: Association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr* 146:817-23, 2005.
- Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, et al. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open* 1:e000118, 2011.
- Anderson KS, Amos CS, Boppana SB et al. Ocular abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *J Am Optom Assoc* 67:273-B, 1996.
- Coast Dk, Demmler GJ, Paysse EA et al. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *J AAPOS* 4:110-116, 2000.
- Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, Guerra B, Belluci T, Sassi M, et al. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol* 65:410-415, 2004.
- Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton OD, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256:1904-1908, 1986.
- Munro SC, Hall B, Whybin LR, Leader L, Robertson P, Maine GT, et al. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* 43:4713-4718, 2005.
- Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 183:476-482, 2000.
- Ville Y. The megalovirus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 12:151-153.[editorial], 1998.
- Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, Lanari M, Farina A, Lazzarotto T, et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 198:380e1-7, 2008.
- Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM et al. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 158:1177-1184, 1988.
- Warren WP, Balcarek K, Smith R et al. Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol* 30:786-789, 1992.
- Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Paolucci S, Gerna G. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* 14:57-66, 1999.
- Distéfano A, González C, Pardón F, Sarubi MA, Canero C. Diagnóstico de la infección congénita por citomegalovirus en muestras de sangre seca de recién nacidos en la tarjeta de Guthrie. Una técnica promisoriosa. *Arch Argent Pediatr* 106(2):132-137, 2008.
- Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis* 16:44-49, 2005.
- Inoue N, Koyano S. Evaluation of screening tests for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 27:182-4, 2008.
- Pinillos R, Llorente M, López-Pisón J et al. Infección congénita por citomegalovirus. Revisión de nuestra experiencia diagnóstica de 18 años. *Rev Neurol* 48:349-353, 2009.
- Shibata M, Takano H, Hironaka T et al. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper. *J Virol Methods* 46:279-285, 1994.
- Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection via dried blood spots. *Rev Med Virol* 16:385-392, 2006.
- Barbi M, Binda S, Caroppo S et al. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection

- and hearing loss. *J Clin Virol* 35:206-209, 2006.
52. Johansson PJ, Jonsson M, Ahlfors K et al. Retrospective diagnostics of congenital cytomegalovirus infections by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. *Scan J Infect Dis* 29:465-468, 1997.
53. Scanga L, Chaing S, Powell C, et al. Diagnosis of human congenital cytomegalovirus infection by amplification of viral DNA from dried blood spots on perinatal cards. *J Mol Diagn* 8:240-245, 2006.
54. Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, et al. Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections. *J Clin Microbiol* 46:943-946, 2008.
55. Atkinson C, Walter S, Sharland M, et al. Use of stored dried blood spots for retrospective diagnosis of congenital CMV. *J Med Virol* 81:1394-1398, 2009.
56. Walter S, Atkinson C, Sharland M, Rice P, Raglan E, Emery VC, et al. Congenital cytomegalovirus: association between dried blood spot viral load and hearing loss. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 93:280-285, 2008.
57. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Pinto PC et al. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus infection by the polymerase chain reaction technique. *J Virol Methods* 97:159-164, 2001.
58. Paixao P, Almeida S, Gouveia P, Vilarinho L, Vaz R. Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Eurosurveillance* 14:1-3, 2009 ([www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)).
59. Boppana B, Ross A, Novak Z et al. Dried Blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 303:1375-1382, 2010.
60. Barbi M, Binda S, Primache V, et al. Cytomegalovirus detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosis congenital infection. *J Clin Virol* 17:159-65, 2000.
61. Distefano AL, Alonso A, Martin F, Pardon H. Human cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina. *BMC Pediatr* 4:11, 2004.
62. Vauloup-Fellous C, Ducrox A, Couloigner V, et al. Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: retrospective study of CMV congenital infection. *J Clin Microbiol* 45:3804-3806, 2007.
63. De Vries JJ, Claas EC, Kroes AC, Vossen AC. Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 46:37-42, 2009.
64. Dollard S, Schleiss MR, Grosse SD. Public health and laboratory considerations regarding newborn screening for congenital cytomegalovirus. *J Inher Metab Dis* 33:5249-5254, 2010.
65. Leurez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, Parat S, Castel C, Avettand-fenoel V, et al. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect Dis* 52:575-581, 2011.
66. Kharrazi M, Hyde T, Young S, Amin MM, Cannon MJ, Dollard SC. Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 157:191-197, 2010.
67. Barbi M, MacKay WG, Binda S, Van Loon AM. External quality assessment of cytomegalovirus DNA detection on dried blood spots. *BMC Microbiol* 8:2, 2008.
68. Dollard S, Scheleiss MR. Screening newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 304:407-408, 2010.
69. Göhring K, Dietz K, Hartleif S, Jahn G, Hamprecht K. Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards. *J Clin Virol* 48:278-281, 2010.
70. Hallwach-Baumann G, et al. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* 25:81-87, 2002.
71. Nozawa N, et al. Real-time PCR assay using specimens on filter disk as a template for detection of cytomegalovirus in urine. *J Clin Microbiol* 45:1305-1307, 2007.
72. Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukushima E, Omori K. Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. *Laryngoscope* 116:1991-1994, 2006.
73. Tagawa M, Tanaka H, Moriuchi M, Moriuchi H. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection at a school for the deaf by using preserved dried umbilical cord. *J Pediatr* 155:749-751, 2009.
74. Pass R. Dried blood spots and universal newborn screening for congenital cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis* 52:582-584, 2011.