



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN
DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN LA SANGRE SECA DE LA
PRUEBA DE DETECCIÓN PRECOZ NEONATAL (PRUEBA DEL
TALÓN) MEDIANTE PCR EN LOS PACIENTES AFECTOS DE
CITOMEGALOVIRUS CONGÉNITO**

ISABEL VIVES OÑÓS

Tesis Doctoral

Departamento de Pediatría, de Obstetricia y Ginecología y de Medicina
Preventiva
Año 2017

Director de tesis

Dr. Pere Soler-Palacín



Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria.
Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

Nom del director de la tesi / Nombre del director de la tesis / Name of the thesis director
PERE SOLER i PALACÍN
Universitat o organisme del director / Universidad u organismo / University or institution
HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON – UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Nom del tutor de la tesi (si cal) / Nombre del tutor de la tesis (si es necesario) / Name of the thesis tutor (if necessary)

Departament o Institut de la inscripció de la tesi Departamento o Instituto de la inscripción de la tesis Department or Research Institute where the thesis is inscribed	Estudi o programa de doctorat Estudio o programa de Doctorado Doctoral Study or Programme
PEDIATRIA, GINECOLOGIA i OBSTETRÍCIA i MEDICINA PREVENTIVA	Programa de Doctorat regulat pel Reial Decret 1393/2007

Títol de la tesi presentada / Título de la tesis presentada / Title of the thesis
"Sensibilidad y especificidad de la técnica de detección de DNA de citomegalovirus en la sangre seca de la prueba de detección precoz neonatal (prueba del talón) mediante PCR en los pacientes afectados de citomegalovirus congénito."

Nom i cognoms del doctorand / Nombre y apellidos del doctorando / Name of the candidate
ISABEL VIVES-OÑÓS

1. ÉS APTA LA TESI PRESENTADA PER AL TRÀMIT DE LECTURA I DEFENSA PÚBLICA? / ¿ES APTA LA TESIS PRESENTADA PARA EL TRAMITE DE LECTURA Y DEFENSA PUBLICA? / IS THE THESIS SUITABLE TO BE READ AND DEFENDED PUBLICLY?

NO

SI / YES

2. INFORME RAONAT (es poden afegir els fulls necessaris adjuntant aquesta fitxa) / INFORME RAZONADO (se pueden añadir las hojas necesarias adjuntando esta ficha) / REASONED REPORT (You can use all the pages you might need including this form)

La doctoranda ha completat amb escreix l'objectiu marcat durant la redacció del projecte inicial, de manera que no tan sols ha aportat informació sobre la sensibilitat de la PCR per al diagnòstic retrospectiu de la infecció congènita per CMV sinó que ha avaluat la relació entre el resultat de la prova i diverses variables clíniques d'una manera exhaustiva.

La troballa d'una sensibilitat baixa en un treball multicèntric com el que constitueix aquesta tesi és important, doncs obre una porta a la reflexió sobre la utilitat d'aquesta tècnica per al diagnòstic retrospectiu del CMV congènit a la pràctica clínica habitual. Davant aquesta baixa sensibilitat, el que posa de manifest aquest treball és que a la pràctica no es pot descartar CMV congènit davant d'un resultat negatiu de la PCR en mostra de sang seca.

Es tracta d'una troballa d'alt valor pràctic, doncs al nostre medi, on no es realitza cribratge sistemàtic al naixement, ens trobem davant de la necessitat d'arribar al diagnòstic de manera retrospectiva en molts pacients, no només en unitats especialitzades d'infectologia sinó a molts serveis assistencials de diferent nivell.

Aquest treball obre la porta a la reflexió sobre la necessitat de trobar altres alternatives per al diagnòstic retrospectiu de CMV congènit o per a la valoració de la necessitat de fer cribratge universal de la malaltia enlloc d'usar el diagnòstic retrospectiu.

Per aquests motius, considero **APTA** per al tràmit de lectura i defensa la present tesi doctoral davant d'un Tribunal Acadèmic.



Pere Soler-Palacín

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Universitat Autònoma de Barcelona

DATA/FECHA/DATE: 26 de juny de 2017

SIGNATURA / FIRMA / SIGNATURE:

11 55 9

*Si ve l' instant que veus que defalleixo
-sóc feble al capdavant; ho saps com jo-
no em deixis desistir.
Recorda'm els projectes no aconplerts,
retreu-me les paraules
amb què vaig comprometre'm
per tu i per mi,
fes-me, si cal, memòria del lloc
i dels objectes que ens acompanyaven.
Només tu pots parlar-me'n sense por
i ens redreçarem junts altra vegada.*

Miquel Martí i Pol

A Ricardo, M^a Eulàlia, Roger i Toni

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Pere Soler, por su inagotable energía y su empeño en que aprenda, y por haberme abierto las puertas del maravilloso mundo de la infectología. Es como una luz en el horizonte: nunca llegaré a alcanzar sus conocimientos, pero está siempre ahí recordándome que tengo que seguir adelante.

A Gema Codina, por su disponibilidad inmediata a entrar en el proyecto y por haber realizado las PCR.

A todos los miembros de REDICCMV que aceptaron participar en el estudio, por haber aportado los datos y las muestras para que este trabajo se haya completado. En especial, al Dr. Daniel Blázquez por haber creído en este proyecto desde el principio y al Dr. Ton Noguera por tener siempre una palabra de ánimo.

A todos los pacientes, controles, y sus familias, por su participación desinteresada en este estudio.

A Santiago Pérez Hoyos por el soporte estadístico. A Celine Cavallo por el soporte lingüístico en la traducción al inglés.

A Antoinette Frick, por su ayuda con la redacción de la tesis, a Maria Espiau por sus consejos prácticos, y a Marta Dapena por su constante “soporte moral”.

A mis padres, Ricardo y M^a Eulàlia, por todo lo que me han dado en la vida, sin su esfuerzo y amor no hubiera podido llegar hasta aquí. A mi hermano Ricard y su mujer Laura, por su apoyo, sobretodo informático este último tiempo.

A Roger, por sus abrazos y risas pese a todas las horas que mi trabajo y en especial esta tesis le han robado. Y a Toni, por lo mismo, por su incondicional compañía en este viaje, y porque siempre le digo que ésta será la última y luego me lío en algún proyecto más: sense el vostre recolzament, aquest treball no hagués estat possible.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	19
2. RESUMEN.....	21
3. INTRODUCCIÓN.....	31
3.1. Citomegalovirus: el virus.....	31
3.2. Patogenia.....	33
3.2.a. Patogenia de la infección congénita.....	35
3.3. Transmisión intraútero.....	36
3.3.a. La paradoja de la transmisión en gestantes previamente inmunes.....	37
3.4. Epidemiología.....	38
3.4.a. Seroprevalencia en gestantes.....	39
3.4.b. Prevalencia de la infección congénita por CMV.....	41
3.5. Clínica de la infección por citomegalovirus.....	42
3.5.a. Citomegalovirus congénito.....	43
3.5.b. Citomegalovirus de adquisición perinatal.....	44
3.6. Diagnóstico.....	46
3.6.a. Técnicas diagnósticas.....	46
3.6.b. Diagnóstico de la infección en la gestante.....	49
3.6.c. En el feto.....	50
3.6.d. En el recién nacido.....	52
3.6.e. Diagnóstico retrospectivo de la infección congénita por CMV.....	54
3.7. Prevención de la infección congénita por citomegalovirus.....	58
3.8. Tratamiento de la infección por citomegalovirus.....	59
3.8.a. Tratamiento en la gestante.....	60
3.8.b. Tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus.....	61
3.8.c. Tratamiento de la infección de adquisición perinatal.....	63
3.9. Pronóstico de la infección por citomegalovirus congénito.....	64

4. JUSTIFICACIÓN.....	67
5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	69
6. OBJETIVOS.....	69
7. MÉTODOS.....	71
8. RESULTADOS.....	77
8.1. Análisis descriptivo de la población a estudio.....	77
8.1.1. Análisis descriptivo de los casos.....	78
8.1.2. Análisis descriptivo de los controles.....	84
8.2. Sensibilidad, especificidad, razón de probabilidad positiva y razón de probabilidad negativa.....	85
8.3. Relación entre el resultado de la rt-PCR en sangre seca y diversas variables.....	87
8.3.1. Variables cualitativas.....	87
8.3.2. Variables cuantitativas.....	90
9. DISCUSIÓN.....	93
10. LIMITACIONES.....	103
11. CONCLUSIONES.....	107
12. BIBLIOGRAFIA.....	109
13. ANEXO 1. PUBLICACIÓN.....	119
14. ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.....	125
15. ANEXO 3. HOJA INFORMATIVA Y HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN DE LOS PACIENTES.....	127
16. ANEXO 4. HOJA INFORMATIVA Y HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN DE LOS CONTROLES.....	131
17. ANEXO 5. NOMBRE DE LOS INVESTIGADORES PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.....	135

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Seroprevalencia de la infección por CMV en gestantes según país.....	40
Tabla 2. Estudios de sensibilidad de la PCR en sangre seca para el diagnóstico retrospectivo de CMV congénito, con pacientes extraídos de cribado poblacional.....	55
Tabla 3. Estudios de sensibilidad de la PCR en sangre seca para el diagnóstico retrospectivo de CMV congénito, con pacientes reclutados por sospecha clínica.....	56
Tabla 4. Tipo de papel y diámetro de los círculos en las 5 comunidades Autónomas de nacimiento de los pacientes.....	72
Tabla 5. Centros que han participado en el estudio, número de pacientes por centro y Comunidad Autónoma.....	77
Tabla 6. Síntomas y signos al nacimiento.....	79
Tabla 7. Medida del diámetro del círculo de papel secante.....	81
Tabla 8. Medianas y rangos intercuartílicos de carga viral al nacimiento en pacientes asintomáticos y sintomáticos.....	82
Tabla 9. Distribución de los pacientes según carga viral detectable o no al nacimiento, entre pacientes sintomáticos y asintomáticos.....	83
Tabla 10. Medianas y rango intercuartílico de carga viral en sangre seca en pacientes asintomáticos y sintomáticos.....	84
Tabla 11. Resultados rt-PCR en grupo de pacientes y en grupo de controles.....	85
Tabla 12. Variables clínicas cualitativas al nacimiento y durante el seguimiento y su relación con el resultado de la rt-PCR en sangre seca.....	88
Tabla 13. Medianas y rango intercuartílico del tiempo transcurrido entre la recolección y el procesamiento de las muestras en pacientes con rt-PCR positiva y pacientes con rt-PCR negativa.....	90
Tabla 14. Diámetros de papel secante y su relación con el resultado de la rt-PCR en sangre seca.....	91

Figura 1. Porcentaje de niños que reciben tratamiento y tratamiento recibido.....	80
Figura 2. Distribución de las cargas virales en sangre al nacimiento en relación al resultado de rt-PCR.....	92
Figura 3. Gráfico donde se observa la distribución de pacientes según carga viral al nacimiento comparada con la carga viral en sangre seca.....	92

1. ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferasa
CMV	Citomegalovirus
CMVc	Citomegalovirus congénito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IC	Intervalo de confianza
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IU	Unidades internacionales
LCR	Líquido cefalorraquídeo
log	Logaritmo en base 10
n	Número
PBS	Phosphate buffered saline tampone
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
REDcap	Reserch Electronic Data Capture
REDICCMV	Registro Español de Infección Congénita por CitoMegalovirus
RIC	Rango intercuartílico
RM	Resonancia magnética
RNA	Ácido ribonucleico
rt-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
TARc	Tratamiento antirretroviral combinado
TORCH	Toxoplasmosis Otras Rubeola Citomegalovirus Herpes
UPIIP	Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

2. RESUMEN

Introducción

El citomegalovirus humano (CMV) es un virus de la familia herpesviridae. Está ampliamente distribuido a nivel mundial, con mayor o menor prevalencia dependiendo del nivel socioeconómico y de otros muchos factores. En el huésped inmunocompetente suele dar cuadros clínicos leves o subclínicos, pudiendo también presentarse en forma de mononucleosis infecciosa o cuadro gripal. Como otros virus de la familia herpes, permanece en estado latente en las células de la persona infectada, lo que puede dar lugar a reactivaciones. La importancia del citomegalovirus radica en las infecciones congénitas y en aquellas en huéspedes inmunodeprimidos, en los cuales puede dar lugar a infecciones graves e incluso mortales.

La infección congénita por citomegalovirus (CMVc) está considerada la infección congénita más frecuente de los países desarrollados, estimándose su prevalencia en un 0,7%, con rango entre 0,3 y 1,3%. Puede causar importantes secuelas a largo plazo, la más frecuente de las cuales es la hipoacusia neurosensorial. La probabilidad de padecer secuelas varía según diversos factores, siendo los más importantes la edad gestacional a la que se adquiere el virus y la presencia de sintomatología al nacimiento. La infección la pueden transmitir tanto gestantes seronegativas mediante adquisición por primoinfección como gestantes seropositivas, en las que la viremia y la infección fetal se producen bien por reactivación del virus bien por reinfección por otro genotipo viral. Actualmente, ningún país del mundo realiza cribado universal de citomegalovirus congénito.

El diagnóstico de infección congénita por CMV requiere de la confirmación de la presencia del virus en cualquier fluido corporal, siendo el más comúnmente utilizado la orina, por la alta carga viral que presenta y la sencillez en la recogida de

la muestra. Esta presencia debe objetivarse en las dos o tres primeras semanas de vida, pues, pasado ese periodo, la adquisición puede ser postnatal (mediante leche materna, por contacto con secreciones vaginales maternas en el canal del parto o por transfusiones de donante positivo no leucodepleccionado). En la actualidad, se contempla el tratamiento de la infección congénita por CMV en determinados supuestos, que en general comprenden aquellos neonatos que presentan síntomas. En el caso de la adquisición postnatal durante el periodo neonatal no se contempla el tratamiento de forma generalizada.

Para diferenciar retrospectivamente entre la adquisición pre y postnatal de la infección por CMV en aquellos casos en los que no se ha realizado el estudio microbiológico durante las dos o tres primeras semanas de vida, se dispone de una muestra de sangre recogida en el periodo postnatal inmediato: la sangre seca de la prueba de cribado neonatal. Si en esa muestra se constata la presencia de CMV, se considera que la adquisición es congénita, y si no se detecta virus, se considera postnatal.

Existen múltiples estudios sobre la sensibilidad de esta técnica, únicamente uno en España, con sensibilidades entre 28% y 100%. El estudio piloto realizado por nuestro grupo en 2014 sobre 14 pacientes mostró una sensibilidad menor (50%) que la descrita en la mayoría de los otros estudios.

El Registro Estatal De Infección Congénita por CMV (REDICCMV) es un registro de carácter estatal en donde se incluyen todos aquellos casos con CMVc de aquellos centros que participan en el proyecto.

Hipótesis de trabajo

El paciente con diagnóstico confirmado de CMVc debe presentar positividad para la detección de DNA de CMV en la sangre seca almacenada excedente del programa de cribado metabólico neonatal. Si esta técnica fuera efectiva y sensible, todos los pacientes con CMVc probado incluidos en REDICCMV deberían presentar un resultado positivo. Contrariamente, los niños en los que se excluye el diagnóstico de CMVc deben presentar negatividad para la detección de DNA de CMV en sangre seca.

Por todo ello, el estudio de DNA de CMV en la sangre seca almacenada excedente del programa de cribado metabólico neonatal debe permitir el diagnóstico retrospectivo de los pacientes con CMVc en los que no se haya realizado el estudio microbiológico durante las dos/tres primeras semanas de vida.

Objetivos

Principal:

Valorar la utilidad de la técnica de detección de DNA de CMV mediante PCR a tiempo real en la sangre seca del papel secante excedente del programa de cribado metabólico neonatal en los pacientes con diagnóstico confirmado de CMV congénito.

Secundario:

Establecer la adecuación del uso de esta técnica en nuestro país para deducir si la adquisición de la infección fue pre o postnatal.

Analizar la posible relación entre diversas variables clínicas y el resultado de la prueba.

Métodos

Estudio multicéntrico ambispectivo observacional de casos-contróles. Los casos son pacientes con CMVc confirmado (mediante la detección del virus por PCR o cultivo viral en cualquier líquido corporal en las dos primeras semanas de vida) incluidos en la cohorte REDICCMV. Los controles son neonatos en los que se descartó el diagnóstico de CMVc mediante determinación de CMV en orina en las primeras dos semanas de vida, prueba realizada por sospecha clínica. En ambos grupos se han analizado dos círculos de sangre seca, en el primer caso como excedente del programa de cribado neonatal y, en los controles, recogiendo dos círculos extra en el momento de la realización de la prueba de cribado neonatal. El análisis se ha realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. La presencia de CMV se ha estudiado mediante una técnica de PCR a tiempo real comercializada (rt-PCR (RealStar CMV®, Altona, Hamburg, Germany)).

Se ha realizado un análisis descriptivo de las variables clínicas. Para comparar variables categóricas se ha usado el test Chi-cuadrado, y el test exacto de Fisher, útil en caso de muestras pequeñas. Para comparar variables continuas con una variable dicotómica se ha usado la U de Mann-Whitney. Para comparar la relación lineal entre dos variables continuas se ha usado el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS 20 para Mac.

El trabajo cuenta con la aprobación del comité ético del Hospital Universitari Vall d'Hebron (código PR(AMI)194/2012) como centro coordinador y con las aprobaciones de los comités éticos locales de los centros participantes.

Resultados

Han participado en el estudio un total de 184 individuos (103 pacientes y 81 controles). Entre los pacientes, un 33% eran prematuros, la mitad aproximadamente mujeres, un 63,1% presentaban síntomas o signos compatibles con CMVc y un 62,7% recibieron tratamiento antiviral específico. Los signos y síntomas más frecuentes al nacimiento fueron: retraso de crecimiento intrauterino (41,5%), neuroimagen patológica (38,5%), trombocitopenia (18,5%), petequias (15,4%), microcefalia (13,8%) e hipoacusia (12,3%).

Entre los 103 pacientes, 58 presentan rt-PCR positiva en sangre seca, frente a 2/81 del grupo control, lo que equivale a una sensibilidad de la prueba de 56% (95%IC 47-65%), especificidad de 98% (91-99%), razón de probabilidad positiva de 22,81 (5,74-90,58) y razón de probabilidad negativa de 0,45 (0,36-0,60).

En el análisis de las variables clínicas en relación al resultado de la prueba se observa que únicamente la carga viral al nacimiento tiene relación con la misma: cargas virales más bajas al nacimiento tienen con más frecuencia rt-PCRs negativas en la sangre seca. Sin embargo, al estudiar la correlación entre la carga viral en sangre al nacimiento y en sangre seca en 51 de nuestros pacientes (técnica semicuantitativa), no se ha observado ninguna correlación.

Conclusión

Con la técnica diagnóstica y metodología utilizadas en el presente estudio, ante un resultado negativo de la rt-PCR en la muestra de sangre seca de la prueba de cribado metabólico, no podemos descartar infección congénita por CMV, sobre todo en los niños con cargas virales más bajas o no detectables al nacimiento. Por el contrario, un resultado positivo tiene una elevada especificidad para el

diagnóstico de confirmación de CMVc. Es necesario disponer de una técnica definida en cuanto a muestra, extracción, procesamiento e interpretación que permita el diagnóstico retrospectivo de la infección por CMVc cuando ello sea necesario.

ABSTRACT

Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) is an herpesviridae virus endemic throughout the world, its prevalence depending on several factors, as socioeconomic background or age. In the immunocompetent host, symptoms are usually mild, as infectious mononucleosis or flu-like. The virus remains latent in host cells and can reactivate over the time. Its importance comes from the infections in the immunocompromised host, in which it can lead to severe infections and death, and congenital infections.

Congenital cytomegalovirus (cCMV) is known to be the most common cause of congenital viral infection in developed countries, with a prevalence among 0.7% (0.3 and 1.3%). The infection can lead to long term sequelae, the most important of them being permanent sensorineural hearing loss. Gestational age at acquisition and symptomatic infection at birth are the strongest predictors of long term sequelae. The virus can be transmitted to the fetus both by non-immune (primary infection) and immune pregnant women (either by reinfection or reactivation).

Currently, there is no country worldwide with a universal cCMV screening program.

The diagnosis of a congenital infection requires the identification of the virus in any body fluid (urine is the most commonly used for its high viral load and technical feasibility) within the first two or three weeks of life. Afterwards, the detection of CMV can be due to postnatal infection (the infant can become infected from the breast milk, from the exposure to the virus in the maternal genital tract at delivery or through blood transfusions). The antiviral treatment is usually recommended to those symptomatic patients with congenital acquisition, whereas the treatment is not used in general terms in postnatally infected children.

When a retrospective diagnosis to rule congenital infection out is needed after the first two or three weeks of life, dried blood spots (DBS) from the metabolic screening program can be useful. If the virus is isolated in this sample, a diagnosis of congenital infection is established while if not, we presume a postnatal acquisition.

There have been many published studies about this topic, only one in Spain, with sensitivities ranging from 28% until 100%. The pilot study made by our group with 14 patients showed a lower sensitivity (50%), compared with those reported in most of the previously published studies.

The Spanish Registry of Congenital CMV Infection (Registro Estatal De Infección Congénita por CMV (REDICCMV)) is an online registry including all those cCMV patients from hospitals around the country included in the project.

Hypothesis

Those patients with confirmed cCMV have to test positive in the detection of CMV DNA in dried blood spots. If this technique is reliable and sensitive enough, all

those patients with confirmed cCMV included in REDICCMV should report a positive result.

On the contrary, all those infants in whom the cCMV diagnosis has been ruled out, should report a negative result.

Therefore, the detection of CMV DNA in DBS should allow clinicians to retrospectively diagnose cCMV in those patients in whom the diagnose was not made the first two or three weeks of life.

Aims

Primary aim:

To assess the sensitivity and specificity of a real-time PCR technique for the detection of CMV DNA in neonatal dried blood spots in patients with confirmed congenital CMV infection.

Secondary aim

To assess the accuracy of a real-time PCR for the detection of CMV DNA in neonatal dried blood spots for the retrospective diagnosis of congenital CMV infection.

To analyze the relationship between clinical variables and rt-PCR result.

Methods

Case-control multicentric, ambispective observational study. Cases are patients with confirmed cCMV from REDICCMV, established on the presence of CMV by PCR or culture in any body fluid before two weeks of life. Infants in whom cCMV had

definitively been ruled out (negative urine PCR the first two weeks of life) were used as negative controls.

From both groups, two DBS were collected (in the cases surplus samples from the metabolic screening program were collected, and in the controls two DBS were collected at the time of the collection of the blood sample for the screening program).

The presence of CMV DNA was assessed by rt-PCR (RealStar CMV, Altona, Hamburg, Germany) in the Molecular Biology Lab at the Microbiology Department of Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona).

Categorical variables were compared with the chi-square and Fisher exact tests, and expressed as the number and percentage (with 95% confidence intervals). The Mann-Whitney U test was used to compare continuous variables, and the Spearman correlation coefficient to evaluate linear relationships between them. Continuous variables were expressed as the median and interquartile range. Statistical analyses were performed using SPSS version 20 (IBM, Armonk, New York, USA). A p value of <0.05 was considered statistically significant.

The Ethics Committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron as coordinator center (code number PR(AMI)194/2012), and the local ethics committees from the participating centers gave their approval for the study. Parental consent was obtained for all the patients included.

Results

One hundred and eighty-four subjects were included (103 patients and 81 controls). In the patient group, 52% were female, 33.3% were premature, 63.1% showed birth signs or symptoms consistent with cCMV and 62.7% received

antiviral treatment. The most common symptoms were: intrauterine growth restriction (41.5%), pathological neuroimaging (38.5%), thrombocytopenia (18.5%), petechiae (15.4%), microcephaly (13.8%) and hearing loss (12.3%)

Fifty-eight (56.3%) samples from the patient group tested positive by CMV DNA rt-PCR in contrast to 2/81 among the control samples, leading to a sensitivity of 56% (95%IC 47-65%), specificity 98% (91-99%), positive likelihood ratio 22.81 (5.74-90.58) and negative likelihood ratio 0.45 (0.36-0.60).

The only variable significantly associated with negative CMV DNA results on DBS testing was the plasma viral load at birth (bPVL): those patients with lower bPVL tested negative more frequently than those with higher bPVL. However, no correlation between bPVL and viral load in DBS (semi quantitative technique) was found in those patients that could be checked for both viral loads (51).

Conclusion

With the technique and methodology used in the current study, a negative rt-PCR DBS result does not rule out congenital CMV infection, especially in patients with low viremia at birth. In contrast, a positive result has a high specificity for the retrospective diagnosis of cCMV infection. There is a need of an available technique regarding sampling, extraction, processing and result interpretation for the retrospective diagnosis of cCMV when necessary.

3. INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano (CMV) tiene una amplia distribución mundial, con mayor o menor prevalencia dependiendo del nivel socioeconómico y de otros muchos factores. En el huésped inmunocompetente, en general, produce cuadros clínicos leves o subclínicos, pudiendo también presentarse en forma de mononucleosis infecciosa o cuadro gripal. Como otros virus de la familia herpes, permanece en estado latente en las células de la persona infectada.

La importancia del CMV radica en las infecciones congénitas y en aquellas en huéspedes inmunodeprimidos, como los trasplantados de precursores hematopoyéticos o los trasplantados de órgano sólido. La infección congénita por citomegalovirus (CMVc) está considerada la infección congénita más frecuente en los países desarrollados, y puede dar secuelas a largo plazo, sobretodo hipoacusia neurosensorial y problemas neurológicos.

3.1. Citomegalovirus: el virus

Citomegalovirus humano (CMV) forma parte de la familia herpesviridae, del grupo β -herpesvirus, que incluye CMV (herpesvirus humano 5), herpes virus humano 6A, herpes virus humano 6B, herpes virus humano 7 y otros herpesvirus que infectan mamíferos¹.

El nombre de citomegalovirus viene dado por la capacidad citopática focal que produce en cultivos tisulares, dando lugar a células muy grandes con inclusiones tanto citoplasmáticas como nucleares. De ahí el nombre: cyto= célula y megalogrande, en griego.

CMV es un virus grande y complejo, de unos 200nm de diámetro. El virión completo está formado por tres regiones diferentes: la cápside que contiene el genoma DNA, el tegumento y la envuelta¹.

La cápside está formada por 162 capsómeros, que rodean los 235.000 pares de bases que componen el DNA de doble cadena, que se compone de 166 genes que codifican proteínas².

El tegumento está formado por proteínas codificadas por el propio virus. Es la parte más compleja y heterogénea a nivel estructural. Contiene un número no determinado de proteínas y RNA viral. Habitualmente se dice que se trata de un tegumento no estructurado, conocido como amorfo, pero hoy en día se sabe que la parte más interna es la que asume la estructura de la cápside que envuelve. Las proteínas del tegumento están fosforiladas y tienen un papel en la regulación de la replicación viral. También tienen papel una vez dentro de la célula infectada, bloqueando respuestas celulares intrínsecas para eludir mecanismos de defensa de la célula a la que infectan. Además, es en el tegumento donde están las proteínas que inducen mayor respuesta inmune¹

El tegumento está a su vez envuelto por una membrana lipídica, donde se hallan más de 20 glicoproteínas virales (el número exacto aún no se sabe). Las glicoproteínas inducen la respuesta humoral rápidamente detectable en el huésped, y se han podido identificar diversos anticuerpos neutralizantes contra estas proteínas en personas inmunes a CMV¹. Estas proteínas abren un camino a la posibilidad de vacunas preventivas para CMV, que inicialmente parecían esperanzadoras, pero en la actualidad aún están en fase experimental.

CMV puede infectar muchos tipos distintos de células. Entra en las células del huésped por fusión de las glicoproteínas de la envuelta (gB, gH, gM/gN) con proteínas de la superficie celular (integrinas celulares, receptor alfa del factor de

crecimiento plaquetario,...) o por vía endocítica. En el núcleo celular ocurren la replicación viral, la síntesis de proteínas y el ensamblado de las partículas que no forman parte de la envuelta. Este acúmulo de las nucleocápsides da lugar a la típica lesión en “ojo de búho” de las inclusiones nucleares de las células infectadas. El proceso de creación de la envuelta es más complejo, y se inicia con la salida a través de la membrana nuclear celular, adquiriendo posteriormente membranas endosómicas en el citoplasma. El virus es transportado por el aparato de Golgi hasta la superficie celular, por donde sale mediante exocitosis. Las inclusiones citoplasmáticas típicas de las células infectadas por CMV son las acumulaciones de las nucleocápsides y cuerpos densos (tegumento con envuelta sin nucleocápside de DNA) en el aparato de Golgi².

3.2. Patogenia

La adquisición del CMV en el huésped sano suele ser a través de las superficies mucosas del tracto respiratorio superior o del tracto genital. La viremia posterior permite la diseminación al resto de órganos. Los efectos citopáticos de CMV se han observado (incluso en personas sanas sin evidencia de infección pre-mortem), en numerosos órganos: glándulas salivares, riñón, hígado, pulmón, glándulas adrenales, mucosa intestinal, así como en prácticamente todos los tipos de células (epiteliales, endoteliales, músculo liso, neuronas, glía, epitelio retiniano, fibroblastos, y en células de la estirpe monocito/macrófago)².

La excreción viral en orina, saliva, lágrimas, semen, secreciones cervicales y leche materna empieza a las 4-6 semanas tras la entrada del virus en el organismo, y es fácilmente detectable. La viremia puede detectarse durante meses, y la excreción viral en orina, saliva y secreciones genitales durante años².

El CMV es capaz de persistir en el organismo evadiendo el sistema inmune de personas sanas mediante diversos mecanismos: presenta funciones específicas que aparentemente atrapan y destruyen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I, interfiere en el procesamiento y presentación de antígenos, degrada proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, e inhibe la destrucción celular por parte de los natural killer, entre otros².

Se cree que la persistencia del virus en el organismo es por mantenimiento del genoma viral en las células precursoras hematopoyéticas, aunque la replicación viral en células epiteliales renales y en glándulas salivares también podría ser determinante².

La gravedad de la infección por CMV, en general, depende de la existencia de alteraciones en el sistema inmune. Así, los pacientes inmunosuprimidos tras un trasplante, los que reciben quimioterapia o los pacientes VIH, entre otros, suelen presentar viremia persistente y desarrollar enfermedad clínica. La inmunidad humoral juega un papel importante, pues los pacientes seronegativos pre trasplante de órgano sólido presentan más morbimortalidad por CMV que aquellos seropositivos. Asimismo, los prematuros que desarrollan más síntomas relacionados con la infección por CMV tras una transfusión son aquellos cuyas madres son seronegativas o aquellos de menos de 28 semanas².

La inmunidad celular también juega un papel fundamental: los pacientes con infección más grave son aquellos que tienen inmunosupresión celular más intensa (los pacientes trasplantados de órgano sólido que reciben inmunoglobulinas antitimocíticas, los pacientes trasplantados de precursores hematopoyéticos y los pacientes VIH con menores recuentos de CD4²).

3.2.a. Patogenia de la infección congénita

La patogenia del CMVc se ha estudiado a través de necropsias de fetos y placentas. Las necropsias de fetos afectados muestran afectación en la mayoría de células y órganos fetales. En un estudio de 34 fetos afectados³ se observó positividad para antígeno de CMV en todas las placentas y páncreas, en 87% de fetos en los pulmones y riñones, en un 71% en hígado, en un 55% en cerebro y en un 44% en corazón. Se observó infiltrado inflamatorio en prácticamente todos los órganos afectados y se relacionaba la intensidad de esta respuesta inflamatoria con la gravedad del daño orgánico³. Se observaba necrosis con daño cerebral en el 33% de los fetos y leucoencefalopatía telencefálica en un 22%. Los autores de este estudio concluyeron que observaban que muchos órganos fetales (páncreas, riñón, corazón, hígado) estaban afectados, pero como éstos tienen alta capacidad regenerativa, parece que los daños en estos órganos podrían solucionarse. Sin embargo, el daño cerebral (que no es sólo producido por el efecto directo del virus sino también por el infiltrado inflamatorio y la hipoxia debida a la placentitis), es menos probable que se resuelva por la escasa posibilidad de regeneración que las células cerebrales presentan. Prácticamente todos los tipos de células cerebrales presentan lesiones citopáticas, pero el patrón no es homogéneo sino parcheado con áreas de necrosis focal².

A nivel auditivo se observan células epiteliales con inclusiones citoplasmáticas a nivel de los canales semicirculares, la membrana vestibular, la cóclea y otras estructuras del oído².

El daño fetal de la infección por CMV no es sólo producido por infección viral directa, sino por infección placentaria, donde ocurre una inflamación de las vellosidades coriónicas, una necrosis de las mismas y lesiones vasculares. En modelos *in vitro* se ha observado que la infección por CMV impide la diferenciación

e invasión del citotrofoblasto, lo que sugiere que la infección impide la correcta función placentaria⁴.

La gravedad de la infección por CMV adquirida durante la etapa fetal puede explicarse también por la inmadurez inmunitaria propia del feto. Las personas que adquieren la infección intraútero o durante el periodo neonatal excretan CMV en orina durante más tiempo que los adultos. Existen diversos trabajos que demuestran que la respuesta inmune es diferente en neonatos comparado con sus madres u otros adultos sanos².

3.3. Transmisión intraútero

Se sabe que entre un 35 y un 40% de las gestantes con primoinfección transmitirán el virus al feto. La tasa de transmisión es más alta al final de la gestación, pero las secuelas más importantes se suelen ver en fetos infectados en el primer trimestre, que además suelen presentar más sintomatología al nacimiento⁵. En un estudio con 79 madres con primoinfección⁵ se pudieron estudiar las diferencias entre aquellas que se infectaron en el primer trimestre frente a aquellas que se infectaron en segundo y tercer trimestres de gestación. Un 23% de los neonatos nacidos de infección en el primer trimestre presentaba síntomas al nacimiento frente a un 11,4% de los neonatos nacidos de infecciones en el segundo y tercer trimestre (diferencia no estadísticamente significativa). En el seguimiento sí que se observaban diferencias significativas en cuanto a las secuelas auditivas: un 24% de los neonatos infectados en el primer trimestre presentaba hipoacusia neurosensorial frente a un 2,5% de los que se infectaban en segundo y tercer trimestre. En cuanto a las secuelas neurológicas, se observaban en un 32% de los neonatos infectados en primer trimestre frente al 15% en el resto, pese a que, de nuevo, no se alcanzaba significación estadística.

En otro estudio que implicó a 238 gestantes con seroconversión a CMV que fueron reclutadas tras cribado serológico, se observaban tasas de transmisión del 8,8% en el caso de seroconversión detectada en el periodo preconcepcional, 19% en el periconcepcional, 30,6%, en el primer trimestre, 34,1% en el segundo y 40% en el tercero⁶.

CMV también puede transmitirse de madre a hijo en madres inmunes, mediante reinfección por otro genotipo viral o por reactivación de una infección latente⁷, pero el hecho de presentar anticuerpos frente a CMV disminuye el riesgo de transmitir la infección. Este hecho se explica con más detalle en el siguiente apartado: “La paradoja de la transmisión en gestantes previamente inmunes”.

3.3.a. La paradoja de la transmisión en gestantes previamente inmunes

Como se ha citado previamente, el hecho de presentar IgG positiva para CMV al principio del embarazo no excluye la posibilidad de transmisión al feto, bien por reactivación del virus, bien por reinfección por otro genotipo viral.

En un estudio en gestantes inmunes se observó que el riesgo de transmisión intraútero de CMV en madres seronegativas era globalmente del 3% frente al 1% en madres seropositivas⁸. Los estudios de seguimiento de pacientes con CMVc sugieren que los hijos de madres con primoinfección presentan más secuelas que aquellos nacidos de madres con inmunidad previa⁹. De todos modos, el mismo grupo que publica este estudio, también publica otro en el que se observa que las reinfecciones por otro genotipo pueden dar lugar a infecciones sintomáticas⁷. En otro estudio realizado en Finlandia (en este caso retrospectivo a través una cohorte obtenida por búsqueda de historias), se observa que la mayoría de pacientes con síntomas (54%) eran fruto de infecciones no primarias (hijos de madres con IgG positiva de alta avidéz en el primer trimestre de la gestación)¹⁰. Es

decir, pese a que la probabilidad de infección sintomática y secuelas parece menor en los hijos de madres con inmunidad previa (aquellos que adquieren el virus por reinfección-reactivación de sus madres), no es inexistente y, por tanto, estar en esta situación no excluye la posibilidad de sintomatología al nacimiento y secuelas a largo plazo.

Quizá los estudios más significativos sobre el tema sean los realizados en países con alta prevalencia de CMV, como el realizado en Brasil y publicado en 2009^{11,12}. La seroprevalencia en la población estudiada era del 95,7%, con una incidencia de infección congénita por CMV del 1,08%, presentando el 8,1% de los niños al menos un síntoma al nacimiento, el 4,6% de los niños tres o más síntomas y observándose sordera a los 21 meses en 5 niños (8,6% de los niños que completaron el seguimiento), profunda y bilateral en dos de ellos. Se pone de manifiesto que la presencia de inmunidad previa no constituye un factor de protección total para la transmisión al feto y el desarrollo de secuelas.

3.4. Epidemiología

La prevalencia de la infección por CMV depende de la edad y varía, no sólo en función del país o región donde se estudie, sino también de otros factores como el nivel socioeconómico, la raza y la paridad. Los estudios se realizan por diversos métodos como seroprevalencia o determinación de PCR en diferentes muestras de población. Si revisamos estudios de prevalencia en población general, vemos que en Estados Unidos ronda el 50¹³-60%¹⁴, en China el 48%¹⁵, en Holanda 45,6%¹⁶ y en España entre el 62,8%¹⁷ y el 69,8%¹⁸. La seroprevalencia en España va en descenso, pues en un estudio entre mujeres con edades comprendidas entre los 2 y los 40 años en la Comunidad de Madrid¹⁹ se observaba descenso de la seroprevalencia del 66,3% al 57,4% si se comparaban los datos de 1993 con los de 1999.

En todos los estudios la seroprevalencia aumenta con la edad y es mayor en mujeres. En algunos trabajos se asocia a bajo nivel educacional familiar, bajos ingresos, inmigración²⁰ y hacinamiento¹³, cosa que en otros trabajos no se demuestra.

Los niños preescolares son fuente importante de contagio tanto para sus compañeros de guardería como para las mujeres en edad fértil^{2,1} (sus madres y cuidadoras), pues excretan importantes cantidades de virus en orina y saliva, y se contagian fácilmente entre sí al compartir juguetes y fómites con saliva contaminada. Como se ha dicho anteriormente, la excreción del virus en orina y saliva puede durar meses, años incluso en el caso de que la adquisición sea en los primeros meses de la vida, por lo que estos niños pueden resultar contagiosos durante largo tiempo. Así, la seroprevalencia es mayor en niños que acuden a guardería que entre aquellos que no acuden. Casi el 52% de los niños de entre 3 meses y 6 años que acudían a guardería presentaban IgG positiva para CMV en un estudio realizado en Francia²¹.

3.4.a. Seroprevalencia en gestantes

Como en el grupo de población general, la seroprevalencia entre gestantes difiere entre diferentes países y regiones, entre grupos sociales, entre grupos etarios y según otros muchos factores. Existen multitud de estudios publicados en diferentes países del mundo. Se resumen brevemente en la **tabla 1**.

País/región	Seroprevalencia	Años de estudio
Austria ²²	73,2%	2009-2013
Canadá (Québec ²³)	40,4%	2010-2013
China (Pekín ²⁴)	94,7%	2010-2015
España (Cataluña ²⁵)	73,3%	1985
Finlandia ²⁶	71,5% 84,5%	2012 1992
Francia (París ²⁷)	Global 57% Origen región metropolitana de París 43,7% Resto de orígenes 84,1%	2009
Italia (Sicilia ²⁸)	Global 65,9% Inmigrantes 91,4% No inmigrantes 62,5%	2012
Polonia ²⁹	62,4%	2010-2011
Reino Unido (Bradford ²⁰)	Global 79% Origen caucásico 49% Origen sur-asiático nacidas en Gran Bretaña 89% Origen sur-asiático nacidas en Asia 98%	2008-2011

Tabla 1. Seroprevalencia de la infección por CMV en gestantes según país.

En la mayoría de estos estudios, los factores relacionados con mayor seropositividad eran la edad, el bajo nivel socioeconómico y educacional, provenir de fuera del país, hacinamiento y paridad.

En el estudio de Pekín de seroprevalencia (94,7% de madres seropositivas al inicio de la gestación), se observaba una tasa de seroconversión en el primer trimestre de 0,45%, y en general durante todo el embarazo de 0,76%. En otro estudio de

seroconversión, en este caso en Québec²³, se observa una seroprevalencia inicial del 40,4%, y una seroconversión entre primer y tercer trimestre del 2,1%.

3.4.b. Prevalencia de la infección congénita por CMV

La infección por CMV es la infección congénita más frecuente de los países desarrollados, estimándose su prevalencia sobre un 0,7%^{30,31}. Los estudios de prevalencia de infección congénita tienen la mayoría limitaciones metodológicas. El mejor estudio publicado es una revisión de 2007³⁰, donde revisan 15 estudios publicados de calidad (se incluyen casi 118.000 neonatos) y de donde se extrae una prevalencia global del 0,7%, con rango entre 0,3 y 1,3% según el estudio.

En países en vías de desarrollo la prevalencia es más alta, como se observa en un trabajo de revisión de estudios realizados en países en vías de desarrollo³² publicado por el mismo grupo que el anterior. Se trata de una revisión de 11 estudios realizados en África, Asia y Latinoamérica, donde la prevalencia de infección congénita variaba desde el 0,6% hasta el 6,1%.

La frecuencia de infección entre los neonatos con peso menor de 1.500 gramos al nacimiento se estudió en un trabajo americano publicado en 2014³³. En este estudio, cuya limitación es su diseño retrospectivo, realizan cribado las dos primeras semanas de vida a todos los recién nacidos de menos de 1.500 gramos nacidos o referidos a un hospital de Birmingham, y observan una prevalencia de infección congénita del 0,39%.

En España no existe ningún trabajo sobre prevalencia de CMVc en población general. Sí existe un trabajo en hijos de madre con infección por VIH³⁴, que demuestra una prevalencia del 4,6%. Dicha prevalencia ha disminuido con los años (antes de 1997 era del 9,2% comparado con el 1,34% de después de 1997). Se asocia a la transmisión vertical de VIH (26% CMVc en los neonatos infectados por

VIH mediante transmisión vertical frente a 2,5% de los niños sin transmisión del VIH) e indirectamente al tratamiento materno con zidovudina (menos transmisión en caso que la madre lo recibiera).

3.5. Clínica de la infección por citomegalovirus

La infección por CMV en el paciente inmunocompetente puede producir desde un cuadro asintomático a un síndrome mononucleósico clásico, pero con anticuerpos heterófilos negativos. La infección en el paciente inmunocompetente cura sin secuelas (pero cabe recordar que el virus queda latente en el organismo), aunque puede durar hasta 4 semanas o más. Se han descrito algunas infecciones graves en personas inmunocompetentes, pero son extremadamente raras, por lo que, si se observan, debe estudiarse la inmunidad del paciente. En cambio, en el paciente inmunodeprimido, como en el trasplantado de órgano sólido, en el trasplantado de precursores hematopoyéticos o en el paciente VIH, la infección puede ser grave. En el caso de los trasplantes, la enfermedad puede producirse por reactivación del virus desde los órganos del receptor, desde el órgano trasplantado, o por adquisición tras transfusión de derivados sanguíneos no leucodepleccionados de donante seropositivo, y condiciona gran morbimortalidad.

En el caso del paciente VIH, la clínica se asocia al nivel de CD4s y la manifestación más frecuente es la retinitis. Desde la introducción de la TARc la cifra de enfermedad por CMV en pacientes VIH ha descendido claramente. Un punto importante a comentar en este sentido son las madres con infección por VIH, pues son fuente de infección congénita por CMV. En un estudio francés publicado en 2009³⁵, se observa un descenso del 3,5 al 1,2% en la transmisión vertical de CMV de madres con VIH a sus hijos (si estos no estaban infectados por VIH) con la introducción de la TARc. En cambio, en los neonatos infectados por VIH, la

transmisión vertical de CMV era alta (10,3%), y presentaban altas tasas de infección sintomática (23,1%).

3.5.a. Citomegalovirus congénito

La infección por CMV durante el periodo fetal puede dar lugar a un amplio abanico de síntomas, desde el aborto al nacimiento de un neonato asintomático. Clásicamente se describe que el 85-90% de los niños que nacen con CMVc no presentará síntomas al nacimiento, frente al 10-15% que sí los presentará. El porcentaje de pacientes con secuelas en uno y otro grupo varía, cómo se comentará en el apartado de pronóstico.

Si nos centramos en los síntomas en el feto, éstos se expresarán a través de alteraciones en las ecografías obstétricas principalmente. De todos modos, las alteraciones ecográficas de fetos infectados por CMV no son exclusivas del virus y se comparten con otras TORCH y con otras enfermedades fetales³⁶, y, además, únicamente el 25% de los fetos las presentará. Los hallazgos más frecuentes son retraso de crecimiento intrauterino, ventriculomegalia, ascitis, calcificaciones intracraneales, oligoamnios, polihidramnios, microcefalia, hiperecogenicidad intestinal, hídrops, derrame pleural y calcificaciones hepáticas³⁶, además de quistes periventriculares, sinequias intraventriculares y alteraciones en el desarrollo cortical, hepatomegalia, esplenomegalia, derrame pericárdico, ascitis y cardiomegalia³⁷. En resonancias magnéticas fetales se pueden observar, además de los hallazgos anteriormente descritos, alteración de la giración (polimicrogiria), atrofia cortical, alteraciones de sustancia blanca e hipoplasia cerebelosa³⁸. Si se realiza cordocentesis se puede detectar anemia, trombocitopenia y elevación de las enzimas hepáticas.

En cuanto a los síntomas al nacimiento, la mitad de los niños sintomáticos presentan síntomas propios de infección diseminada, con repercusión en múltiples órganos (con predominio en el sistema reticuloendotelial y sistema nervioso central (SNC), con o sin repercusión auditiva y ocular), mientras que la otra mitad puede presentar únicamente algún síntoma aislado.

Los hallazgos más frecuentes, de mayor a menor frecuencia son: petequias (76%), ictericia (67%), hepatoesplenomegalia (60%), microcefalia (53%), retraso de crecimiento intrauterino (50%), coriorretinitis/atrofia del nervio óptico (20%), púrpura (13%) y convulsiones (7%). En cuanto a los hallazgos de laboratorio, los más frecuentes son la elevación de AST (por encima de 80UI/mL) (83%), elevación de bilirrubina directa (por encima de 4 mg/dL) (81%), trombocitopenia (77%) y elevación de proteínas en el líquido cefalorraquídeo³⁹. En otras series hablan de hepatoesplenomegalia como síntoma más frecuente, seguido de ictericia y petequias¹.

3.5.b. Citomegalovirus de adquisición perinatal

Además de la transmisión madre-hijo transplacentaria de CMV (que da lugar a la infección congénita), el virus también puede transmitirse durante el trabajo de parto (por exposición al mismo en la mucosa del tracto genital), a través de la leche materna y por transfusión de hemoderivados no leucodepleccionados. La transmisión cruzada entre neonatos (de neonato infectado a otro a través de las manos del personal) debiera ser inexistente si se siguen las medidas estándar de higiene: lavado de manos y uso de materiales específicos para cada paciente^{40,1}.

Se puede detectar CMV mediante PCR en leche materna hasta en el 95% de madres inmunes^{41,42}, y la mitad de neonatos hijos de estas madres que excretan virus en leche se infectarán a través de la misma². CMV se excreta en la porción no

celular de la leche materna, y no es necesario aislar el mismo en otros fluidos maternos para que esté presente en la leche⁴⁰. La congelación de la leche materna o su pasteurización disminuyen el riesgo de transmisión, pero también alteran las propiedades de la leche, por lo cual no se usan de manera estandarizada en las unidades neonatales. En caso de la leche de banco, se aconseja usar de donantes seronegativas o procesarla mediante congelación o pasteurización⁴⁰.

La transmisión por transfusiones también es posible, y una no despreciable fuente de infección entre prematuros de bajo peso. CMV se transmite dentro de los leucocitos, por lo que hoy en día se usan derivados hematopoyéticos leucodepleccionados o de donante CMV negativo, eliminándose, teóricamente, este riesgo⁴⁰.

Los pacientes con adquisición perinatal empiezan a excretar virus en orina entre las 3 semanas y los 3 meses de vida, y lo excretan durante meses e incluso años, aunque con menor viruria que la que tienen los niños con infección congénita.

Para el diagnóstico certero de adquisición perinatal debe de haberse excluido la infección congénita (mediante la negatividad para CMV en las primeras dos-tres semanas de vida).

En general, en el neonato a término sano, será una infección asintomática que no causará secuelas a largo plazo¹. De todos modos, existe la duda de si estas infecciones neonatales no congénitas pueden dar secuelas a largo plazo, como las de CMV de adquisición congénita en niños asintomáticos al nacimiento pero con alteraciones a muy largo plazo⁴⁰.

Otro escenario diferente es el de los prematuros de bajo peso. En estos sí se ha visto que la adquisición postnatal de CMV presenta clínica⁴¹, normalmente hepatoesplenomegalia, linfocitosis con linfocitos atípicos, elevación de transaminasas, trombocitopenia, empeoramiento respiratorio y aspecto séptico en

el momento de iniciarse la infección. El riesgo de sintomatología tras infección perinatal se relaciona con el peso al nacimiento (mayor riesgo en aquellos de menos de 1.250 gramos), con el tiempo hasta la adquisición de la infección⁴⁰ (más grave cuanto más precoz se adquiera), con la exposición a múltiples transfusiones, y con el hecho de ser hijo de madre seronegativa². Las secuelas a largo plazo entre los prematuros que adquieren la infección perinatal no están claras, pues los estudios arrojan resultados dispares en este sentido, con algunos estudios sugiriendo que la adquisición postnatal no aumenta el riesgo de secuelas neurológicas a largo plazo y otros estudios donde se observa lo contrario⁴⁰.

3.6. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en métodos serológicos y de detección directa del virus en diversos fluidos corporales o en órganos, bien sea mediante cultivo, mediante detección de material genético o mediante detección de antígenos. Dependiendo del tipo de paciente se realizan unos u otros.

3.6.a. Técnicas diagnósticas

i. Serología

Los métodos serológicos pueden detectar la presencia de inmunoglobulinas IgM e IgG, y, de ésta última, es posible realizar un test de avidéz.

La **IgM** suele producirse los primeros 7-12 días tras el inicio de la infección, y puede permanecer positiva durante 3 o 4 meses⁴³ (incluso 6-9 en el caso de gestantes)⁴⁴. El hecho de encontrarla puede indicar primoinfección o reinfección-reactivación, pese a que no en todas las reinfecciones o reactivaciones se detecta (en las reactivaciones en individuos inmunocompetentes muchas veces no se detecta⁴³). En general, pues, en el

individuo inmunocompetente, la presencia de IgM en la mayoría de casos significará primoinfección. Se pueden observar falsos positivos de IgM por reacción cruzada en caso de otras infecciones virales como virus Epstein-Barr o parvovirus B19⁴⁴.

La **IgG** se empieza a detectar a partir de las 2-3 semanas del inicio de la infección y permanece detectable de por vida⁴³. Se usa para realizar cribado de infección previa. Sirve para determinar la posibilidad de transmisión del virus en donantes de sangre y de órganos, la posibilidad de reactivación del mismo en personas inmunocomprometidas y el riesgo de adquirir el virus en personas expuestas².

También se puede medir la **avidez de la IgG**, técnica que ayuda a discernir entre infección reciente o antigua. Los anticuerpos IgG producidos en los primeros meses después de la adquisición de la infección presentan baja avidez, que va aumentando a medida que pasa el tiempo por maduración de los mismos, de manera que a los meses los anticuerpos que se detectan son de alta avidez. Así pues, los anticuerpos IgG de alta avidez debieran encontrarse únicamente en individuos con infección antigua o en reactivaciones. Si el laboratorio informa una avidez de más del 60%, este resultado es sugestivo de infección antigua, mientras que si la avidez es menor del 30%, sugiere una infección de hace menos de 3 meses (reciente)³⁶.

ii. Cultivo

CMV únicamente puede cultivarse en células humanas. El crecimiento del virus se detecta mediante observación del efecto citopático del virus en las células inoculadas. Solían usarse fibroblastos o células de pulmón embrionario humano, pero el problema de estas técnicas es que el ciclo replicativo del virus es lento y el diagnóstico puede demorarse 15 o 20 días. La orina de neonatos con infección congénita presenta una excepción a esta demora en los resultados, pues ante la

elevada viruria que presentan, la presencia del virus puede hacerse evidente a las 48 horas de la inoculación⁴³.

La introducción de cultivo mediante *Shell vial* permite hacer diagnósticos por cultivo en 24-48 horas, pues la muestra se centrifuga, se deja incubar y se tiñe con anticuerpos monoclonales fluorescentes que detectan antígenos víricos tempranos, que se expresan en 18 horas. A esta técnica realizada en orina de recién nacidos, en algunas unidades se conoce bajo el nombre de antigenuria, pero es un cultivo viral con detección de antígenos⁴³.

iii. Antigenemia

Se basa en la detección de antígenos de CMV en los leucocitos extraídos de muestras de sangre. Se usaba antes de las técnicas de detección de DNA para monitorizar a los pacientes de riesgo (trasplantados e inmunodeprimidos)⁴³.

iv. Diagnóstico histológico

El efecto citopático típico que CMV genera en los tejidos hace que los patólogos puedan sospechar (casi incluso confirmar) la presencia de enfermedad por CMV en ese tejido. A pesar de ello, podrían confundirse con infecciones por otros virus, por lo que no son patognomónicas.

v. Métodos moleculares

Se basan en la detección del material genético del virus en diferentes muestras clínicas (sangre, orina, saliva, LCR, sangre seca). Pueden ser cualitativos o cuantitativos. Son técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que pueden amplificar y detectar diferentes genes propios del virus. La sensibilidad depende de la técnica, pues cada una usa un gen determinado a amplificar, y del tipo de muestra. Existen múltiples PCR comerciales y algunos laboratorios de

microbiología las producen para uso propio. En el caso de las técnicas cuantitativas, permiten obtener resultado de carga viral⁴³.

3.6.b. Diagnóstico de la infección en la gestante

Como se ha comentado anteriormente, el cribado de infección por CMV en la gestante no se realiza de manera universal en ningún país del mundo. Al diagnóstico puede llegarse a través de haber realizado serologías de cribado (en algunos centros se realizan, a criterio del obstetra), a partir de diagnosticar serológicamente a una madre que presenta clínica (muy pocas gestantes presentan clínica y aunque la presenten, raras veces se piensa en el virus y se realizan serologías) o que ha tenido contacto con una persona con infección activa por CMV, o a partir de una sospecha clínica en el feto (por hallazgos ecográficos sugestivos).

El diagnóstico serológico en la gestante es complicado pues existen casos dudosos, y, además, incluso en gestantes con IgG positiva en el primer trimestre, puede haber transmisión del virus, tal como se ha explicado en el apartado "la paradoja de la transmisión en gestantes previamente inmunes".

El diagnóstico de primoinfección se puede asegurar cuando se observa seroconversión, es decir, aparición de IgG en una mujer con IgG previamente negativa³⁶. También se podría asegurar en una gestante previamente negativa en la que se observa aparición de IgM, a la cual debería seguir en el tiempo la aparición de la IgG. Hay que ir con cuidado y confirmar el resultado en una nueva muestra pues la serología puede presentar reacción cruzada con infecciones por otros herpesvirus.

Si se detecta IgM en una gestante de la que previamente se desconocía el estatus serológico, el diagnóstico es más complicado, pues podría tratarse de una

reinfección-recurrencia o de una primoinfección. Hasta en el 10% de las recurrencias en embarazadas puede observarse la presencia de IgM³⁶ y en un estudio del 2004 se observó que menos del 10% de gestantes que presentaban IgM positiva, transmitían el virus al feto⁴⁴. En los casos en los que se detecta IgM se usa el test de avidéz de IgG para discernir entre infección reciente y antigua: una avidéz de más del 60% equivaldría a una infección antigua, y por tanto estaríamos ante una recurrencia, mientras que una avidéz de menos del 30% correspondería a una primoinfección³⁶. Una avidéz alta las primeras 12-16 semanas de embarazo es muy sugestiva de infección preconcepcional⁴⁴.

Si una mujer con IgG positiva pregestacional presenta un aumento significativo en los títulos de anticuerpos IgG (con o sin IgM positiva) y éstos son de alta avidéz, se clasifica como recurrencia³⁶.

3.6.c. En el feto

Una vez diagnosticada la primoinfección en la gestante (o en caso de no quedar claro el tipo de infección), se aconseja estudiar al feto para valorar si ha habido o no transmisión vertical. Este punto no está tan claro en el caso de las reactivación-reinfecciones, aunque, como se ha dicho previamente, éstas no están exentas de transmisión al feto, clínica y secuelas.

El diagnóstico de infección fetal puede realizarse mediante amniocentesis o cordocentesis. Hoy en día, por la elevada sensibilidad de la amniocentesis y las complicaciones que puede presentar la cordocentesis, suele realizarse a través de la primera.

Cabe recordar que la excreción viral en orina es muy alta, por lo que la detección del virus en líquido amniótico presenta un elevado rendimiento.

Se recomienda realizar amniocentesis en gestantes en las que se haya demostrado primoinfección (o no quede claro el tipo de infección) en la primera mitad gestacional, o en caso de alteraciones ecográficas fetales sugestivas de infección por CMV⁴⁴.

La amniocentesis debe realizarse como mínimo 6-8 semanas después de haberse detectado la infección materna y siempre entre la semana 20 y la 22, pues hasta entonces el virus no se excreta suficientemente en orina. La presencia del virus en líquido amniótico puede detectarse mediante cultivo viral (preferiblemente *shell vial*, con sensibilidades del 70-80%) o mediante PCR (con sensibilidades del 90-98%)⁴⁴. Pese a la alta sensibilidad de la PCR pueden darse algunos falsos negativos, que podrían ser, probablemente, por transmisión del virus en un momento posterior durante la gestación³⁷. En un estudio publicado en 2012 se observaba CMVc en un 7% de las gestantes con PCR negativa en líquido amniótico⁴⁵. Es por eso que, pese a la negatividad de la amniocentesis, todos los neonatos hijos de madres a los que se les realizó la amniocentesis en busca de CMV deben ser estudiados al nacimiento mediante determinación del virus en orina, aunque la amniocentesis haya resultado negativa³⁷. Pese a esta recomendación, parece ser que estos falsos negativos (o negativos en el momento de la amniocentesis, que no necesariamente deben ser falsos negativos) son menos sintomáticos y tienen menos secuelas que aquellos fetos con líquido amniótico positivo⁴⁶.

Se puede estudiar, además, la carga viral en líquido amniótico. En diversos estudios se ha observado que podría ser un factor pronóstico de sintomatología y de secuelas a largo plazo. Una carga viral baja (menos de 10^3 copias/ml) es un buen indicador de bajo riesgo de sintomatología al nacimiento y bajo riesgo de secuelas⁴⁴, mientras que una carga viral por encima de 10^5 copias/ml es muy sugestiva de infección sintomática al nacimiento⁴⁷. Sin embargo, algunos autores refieren que los rangos de cargas virales en líquido amniótico se solapan entre los

niños sintomáticos y asintomáticos al nacimiento³⁶, por lo que no queda claro si la carga viral en líquido amniótico da un pronóstico seguro en el 100% de los casos.

La infección en el feto debe ser estudiada, además, mediante ecografía, pero como se ha dicho en el apartado de clínica, no todos los fetos infectados presentan ecografía alterada (de hecho, son los menos). En los embarazos en que se demuestre infección fetal por PCR positiva en líquido amniótico, se recomienda control ecográfico estricto cada 2-4 semanas para evaluación de la posible aparición de alteraciones ecográficas³⁶. Hoy en día se recomienda, además, la realización de RM fetal, pues aporta información complementaria a la encontrada en la ecografía⁴⁸.

3.6.d. En el recién nacido

La infección en el recién nacido puede diagnosticarse mediante positividad para CMV en cualquier líquido biológico: sangre, LCR, saliva, orina..., siendo este último el más frecuentemente utilizado, por su facilidad de recogida y alta sensibilidad. La detección de CMV en estos medios puede realizarse mediante cultivo (*shell vial*) o mediante técnicas moleculares de PCR. Se considera diagnóstica de CMVc si se realiza durante las dos o tres primeras semanas de vida (según la guía). Pasado este tiempo, si se detecta CMV en cualquier fluido corporal, no puede asegurarse que se trate de adquisición congénita (ver sección 3.6.d).

Se aconseja estudiar a todos los neonatos con historia fetal de alteraciones ecográficas compatibles con CMV (citadas en el apartado 3.5.a, página 28), a todos aquellos con síntomas compatibles³⁸ (aunque sólo presenten uno), a todos los neonatos con infección materna confirmada o dudosa durante la gestación (pese a que se haya realizado amniocentesis y la detección de CMV haya sido negativa), a todos los hijos de madre con VIH y a todos los prematuros de menos de 32 semanas gestacionales y/o de menos de 1.500 gramos de peso al nacimiento.

3.6.d.1. Estudio completo tras el diagnóstico de CMV congénito

A todo neonato con CMVc habrá que hacerle un estudio al nacimiento para clasificarlo en el grupo de sintomáticos o asintomáticos, cosa que influirá en el tratamiento y el pronóstico. Debe realizarse:

- Exploración física exhaustiva, prestando atención a la presencia de alteraciones neurológicas, exantema petequiral y hepatoesplenomegalia.
- Somatometría completa, y clasificarlo, si hace falta, como retraso de crecimiento intrauterino (y el tipo) o microcefalia.
- Analítica sanguínea: con estudio de hemograma (especial atención a las citopenias, sobretodo trombocitopenia) y bioquímica con estudio hepático completo.
- Determinación de carga viral en sangre (cuantificada) y serologías IgG e IgM.
- Ecografía cerebral y abdominal.
- Resonancia magnética cerebral.
- Fondo de ojo.
- Potenciales evocados auditivos y visuales.
- Punción lumbar, con bioquímica (especial atención a las proteínas) y PCR a CMV.

Las alteraciones en la neuroimagen deberían ser evaluadas mediante ecografía y resonancia magnética, pues los hallazgos de ambas pruebas se complementan, tal como se observa en un trabajo de 2014⁴⁹, y en los datos de la cohorte española REDICCMV⁵⁰, no publicados pero reflejados en la tesis del Dr. Blázquez-Gamero. En el primero, hasta el 7,5% de pacientes con ecografía cerebral normal presentaban RM alterada, y dichos pacientes tenían secuelas auditivas o neurológicas a largo plazo. De los datos de la cohorte española (con 297 pacientes en el momento del

análisis) se extrae que hasta el 35% de los pacientes con ecografía normal presentaban RM alterada, y de estos, 75% tenían hipoacusia y 25% alteración neurológica al año de vida. Estos resultados podrían explicarse por tratarse la ecografía de una técnica observador dependiente, además de porque existen algunas alteraciones que no pueden ser objetivadas por la ecografía, como las de corteza cerebral.

Respecto a la punción lumbar, que clásicamente se ha considerado imprescindible, existe un trabajo del grupo de redicCMV⁵¹ en el que se observa que la PCR positiva en LCR se asocia a sintomatología al nacimiento. Únicamente en 4 de los 21 pacientes con PCR positiva en LCR ésta era el único hallazgo patológico (4 de los 21 eran pacientes sin otros síntomas), y en ninguno de los 4 se observaron secuelas. Este trabajo tiene la limitación de que las secuelas están estudiadas a los 6 meses, por lo que habrá que comprobar con el paso del tiempo si estos datos se confirman. De todos modos, abre una ventana a la reflexión sobre si la punción lumbar en estos pacientes debe hacerse en todos los casos.

3.6.e. Diagnóstico retrospectivo de la infección congénita por CMV

En el caso en que el diagnóstico de CMV se presuponga pasadas las dos o tres primeras semanas de vida (por aparición de clínica compatible, porque no supera el cribado auditivo neonatal y se demora la repetición de éste, porque aparece una sordera tardía, o por cualquier otro motivo), será imprescindible filiar si se trata de una adquisición del virus pre o postnatal (congénita o no) por las implicaciones terapéuticas y pronósticas que ello tiene. Para diferenciar ambas adquisiciones se usa la sangre seca de la prueba del talón, donde se estudia la presencia del virus mediante PCR.

Existen múltiples estudios publicados sobre la sensibilidad de diversas de estas técnicas, resumidos en un metanálisis publicado por Wang en 2015⁵², donde se

analizan 14 publicaciones con los estudios disponibles de mejor calidad, y donde se observa una sensibilidad global de 84% y una especificidad de 100%. Este trabajo incluye estudios en diversos países del mundo (Francia, Estados Unidos, Italia, Suecia, Argentina, Portugal, Eslovenia, Bélgica, Canadá y Brasil), con diseños dispares. Algunos de ellos son de cribado universal y otros extraen las muestras de niños con sospecha de infección. En los estudios de cribado universal la serie más amplia de niños con CMVc confirmado es de 92 pacientes (cribando 22.448 neonatos), como se observa en la **tabla 2**. Entre los estudios en que no se parte de cribado poblacional, es difícil encontrar el tamaño muestral de pacientes confirmados en la mayoría, pues mezclan pacientes probables con confirmados. En el caso particular del trabajo de Barbi de 2006⁵³, se indica que los datos no están publicados, sino que se muestran en un cuadro en un artículo de revisión del tema. Expone que cuentan con 880 pacientes con sospecha de CMVc, aunque parece que al final sean 154 infecciones congénitas, y posteriormente el mismo grupo publica datos de CMV confirmado de 60 pacientes⁵⁴. Llama la atención esta disparidad de números y el hecho de no estar publicados los datos de los 154 pacientes. El resto de trabajos sobre base de sospecha clínica cuentan con entre 4 y 64 pacientes con CMVc confirmado, como se ve en la **tabla 3**.

Autor	Población cribada	Número de pacientes	Sensibilidad
Barbi et al ⁵⁵	1.268	6	100%
Boppana et al ³¹	20.448	92	28-34%
Paradiz et al ²⁶	2.841	4	50%
Soetens et al ⁵⁶	No consta	55	45-82%
Yamamoto et al ⁵⁷	332	7	71%

Tabla 2. Estudios de sensibilidad de la PCR en sangre seca para el diagnóstico retrospectivo de CMV congénito, con pacientes extraídos de cribado poblacional

Autor	Número de pacientes	Sensibilidad
Barb et al ⁵³	154 (ver texto)	99%
Binda et al ⁵⁴	60	100%
Distéfano et al ⁵⁸	31	100%
Johanson et al ⁵⁹	16	81%
Leruez-Ville et al ⁶⁰	45	88-100%
Leruez-Ville et al ⁶¹	64	95-100%
Paixao et al ⁶²	28	93%
Scanga et al ⁶³	7	100%
Vaudry et al ⁶⁴	4	50%
Vives et al ⁶⁵	14	50%

Tabla 3. Estudios de sensibilidad de la PCR en sangre seca para el diagnóstico retrospectivo de CMV congénito, con pacientes reclutados por sospecha clínica

De los datos expuestos en las dos tablas previas es llamativo que las sensibilidades más bajas se observan en aquellos trabajos de cribado poblacional con mayor número de pacientes, y en cambio las más altas en los trabajos en que los pacientes son reclutados por sospecha clínica, lo que hace pensar que quizá este reclutamiento podría constituir un sesgo.

El único trabajo publicado en España es el publicado por nuestro grupo en 2014⁶⁵, donde observamos una sensibilidad del 50% en una muestra de 14 pacientes.

De todos modos, probablemente el factor más determinante de la sensibilidad es la técnica usada para la extracción del DNA y para la realización de la PCR, como muestran diversos trabajos^{56,66,67}. Soetens et al⁵⁶ publicaron en 2008 un artículo donde comparaban dos métodos de extracción del DNA y dos métodos de amplificación del mismo para el diagnóstico retrospectivo de CMVc, observándose sensibilidades del 66 y del 73% según la técnica usada, en las mismas muestras.

Combinando el mejor método de extracción y el mejor método de amplificación la sensibilidad aumentaba hasta el 82%. En 2009 de Vries⁶⁶ et al publicaron otro estudio donde comparaban 8 técnicas de extracción del DNA desde el papel secante, observando sensibilidades del 32 al 73% si las muestras eran testadas una única vez, con mejores sensibilidades en todas las técnicas si las muestras se testaban tres veces. Un dato importante de este estudio es que la sensibilidad variaba dependiendo de la carga viral en la sangre que usaban para mojar el papel secante. En el rango de carga viral baja (2-3 log₁₀ copias/mL), 4 de los 8 métodos daban resultados negativos y en el rango de carga viral media (3-4 log₁₀ copias/mL), las sensibilidades variaban del 17 al 67%. De hecho, Atkinson et al⁶⁷ describen en 2014 una nueva técnica que permite aumentar la sensibilidad del 69 al 81%.

Queda claro, pues, que la sensibilidad depende de la técnica de extracción, de la técnica de amplificación, de la carga viral y del tipo de población de la que se parte. Además, muchos pacientes no presentan viremia en el momento del diagnóstico, aunque sí viruria, por lo que en estos niños no se puede diagnosticar únicamente mediante PCR en sangre (sea total o sangre seca), sino en orina.

Hasta la fecha no había ninguna técnica comercializada validada para la extracción de DNA desde la muestra de sangre en papel secante, por lo que las técnicas que se realizaban eran resultado de la modificación de alguna técnica comercializada para la extracción del DNA desde sangre total o plasma. Desde el año 2017, y de manera posterior a la realización del presente trabajo, se dispone de una técnica comercial validada para la extracción de DNA desde muestras sólidas como el papel secante (MagCore[®] (RBCBioscience, New Taipei City, Taiwan)), lo que disminuirá las diferencias en la realización de la técnica entre diversos laboratorios.

3.7. Prevención de la infección congénita por citomegalovirus

Hasta el momento, la única medida que se ha demostrado eficaz para la prevención de la infección congénita es la prevención de la adquisición del virus en la gestante.

Diversos intentos de desarrollar una vacuna eficaz para prevenir la infección por CMV han dado resultados desalentadores. En la actualidad hay 4 ensayos en marcha para el desarrollo de vacunas, que está previsto que finalicen entre 2017 y 2019⁶⁸.

La intervención que sí se demuestra eficaz en la prevención de la infección por CMV en la gestante es la información adecuada de las medidas para frenar el contagio. Cabe recordar que la adquisición de CMV es frecuente cuando se convive con niños que van a guardería, especialmente los menores de dos años, pues excretan gran cantidad de virus en orina y saliva, y usan pañales. Existen trabajos que demuestran la reducción de la tasa de seroconversión en mujeres a las que se da información sobre medidas preventivas^{69,70}.

De todos modos, pocas gestantes conocen la existencia del virus y el riesgo potencial para sus hijos que éste supone, como confirman diversos estudios sobre el conocimiento de la infección por CMV entre las gestantes⁶⁸.

Se debería mejorar en la información que se da en las visitas obstétricas sobre actitudes preventivas, pues éstas han demostrado reducir las tasas de seroconversión materna y, por tanto, las infecciones congénitas por CMV. Existen organizaciones muy activas en este sentido, como la National CMV foundation (<https://www.nationalcmv.org>) o la española STOP citomegalovirus (<https://www.stopcitomegalovirus.org>), que dedican parte de sus esfuerzos a la concienciación de la población sobre la enfermedad y las medidas preventivas.

Las medidas preventivas recomendadas se basan en:

- Lavado de manos tras el cambio de pañal, dar de comer a un niño o limpiarle la nariz o la boca, con agua y jabón durante al menos 15-20 segundos.
- No compartir comida, bebida, utensilios de comida, cepillos de dientes ni chupetes.
- Evitar el contacto con la saliva del niño (evitar besos cerca de la boca).
- Considerar lavar las superficies que tienen contacto con saliva u orina, como por ejemplo encimeras o juguetes.

3.8. Tratamiento de la infección por citomegalovirus

En la actualidad existen diferentes alternativas farmacológicas para el tratamiento de CMV. Ganciclovir, valganciclovir, valaciclovir, cidofovir y foscarnet son los principios activos autorizados en nuestro país para el tratamiento de la infección por CMV en diversos contextos clínicos.

Otra posibilidad de tratamiento en la embarazada son las inmunoglobulinas específicas antiCMV.

En general, en el paciente inmunocompetente sin complicaciones no es necesario el tratamiento para la infección pues ésta es autolimitada y no da lugar a secuelas. Diferente es en el caso de los inmunodeprimidos, pero no es motivo de esta tesis profundizar en la infección por CMV en estos colectivos y los tratamientos son diversos e individualizados.

Las posibilidades de tratamiento en la gestante, en los casos de CMVc y en aquellos adquiridos en época neonatal se exponen a continuación.

3.8.a. Tratamiento en la gestante

El tratamiento en la gestante va dirigido a evitar la infección fetal o, si ésta se produce, disminuir la gravedad y las secuelas. En la actualidad no se dispone en España de ningún tratamiento autorizado para tratar a la gestante. En algunos centros se está usando la gammaglobulina hiperinmune a modo de uso compasivo como medicación extranjera.

Gammaglobulina hiperinmune

La teórica utilidad de la gammaglobulina hiperinmune vendría dada por la evidencia de que a mayor número de anticuerpos IgG y mayor avidéz, menor es el daño fetal en los fetos infectados por CMV⁷¹. En general, las infecciones congénitas secundarias a reinfecciones/reactivaciones suelen tener mejor pronóstico que aquellas que ocurren tras primoinfección. En este sentido se iniciaron hace años estudios para valorar la eficacia de la gammaglobulina administrada a la mujer gestante para prevenir el paso del virus al feto o, si el paso ya se había producido, disminuir las secuelas¹. Nigro et al firman dos estudios, publicados en 2005⁷² y en 2012⁷³, y Visentin et al uno en 2012⁴⁵, que apoyaban esta teoría, pero los diseños no eran aleatorizados, y la metodología arrojaba muchas dudas sobre la verdadera eficacia del tratamiento. De hecho, recientemente, se ha publicado un documento de consenso internacional en el que no se aconseja el uso rutinario de gammaglobulina hiperinmune en la gestante⁶⁸.

Valaciclovir

Un estudio prometedor es el publicado en octubre de 2016⁷⁴ sobre el tratamiento con valaciclovir en las gestantes con infección fetal confirmada por PCR en líquido amniótico y con feto sintomático, que muestra un aumento en el número de asintomáticos al nacimiento del 43% al 82% sin efectos adversos destacables⁷⁴. De todos modos, pese a que los resultados parecen prometedores, tampoco se

pueden usar como base para una recomendación general. El anteriormente citado documento de consenso internacional así lo indica también, no recomendando ningún tratamiento antiviral de forma rutinaria en la gestante⁶⁸.

3.8.b. Tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus

Para el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus se dispone, en general, de dos fármacos: ganciclovir y valganciclovir. Ninguno de los dos tiene contemplada esta indicación en España en su ficha técnica.

Ganciclovir

En el trabajo ya clásico de Kimberlin publicado en 2003⁷⁵ se observaba una mejoría del pronóstico auditivo y neurológico a los 6 meses y al año en los pacientes con afectación del SNC tratados con ganciclovir endovenoso durante 6 semanas. Pese a estos datos, el estudio presentaba un número no despreciable de niños perdidos en el seguimiento, y se observó que hasta dos tercios de los neonatos presentaban neutropenia. Otro estudio del mismo grupo publicado en 2009 observaba mejoría del pronóstico neurológico a los 6 y 12 meses en el grupo tratado con ganciclovir⁷⁶.

Ganciclovir tiene, entre otros, el problema de la administración endovenosa. En la actualidad se usa en aquellos pacientes más sintomáticos (sépticos, con afectación grave del SNC) o en aquellos pacientes que no pueden recibir tratamiento oral, hasta que su estado mejora y se puede cambiar el tratamiento a valganciclovir. Suponen en la práctica clínica una pequeña proporción de pacientes.

El tratamiento con ganciclovir requiere de monitorización de la cifra de neutrófilos mediante analítica, que se suele realizar de forma semanal hasta el final del tratamiento. Así mismo, se realizan bioquímicas seriadas pues otros posibles efectos adversos, pese a que son poco frecuentes, son nefro o hepatotoxicidad (además de anemia y trombocitopenia)³⁸.

Un punto a no olvidar es que en modelos animales se ha visto que ganciclovir tiene potencial carcinogénico y de alteración gonadal, hecho que no se ha demostrado, por el momento, en humanos. Quedará pendiente ver si en un futuro los niños tratados en la primera infancia con ganciclovir desarrollan estos problemas a largo plazo.

La dosis recomendada es de 12 mg/kg/día administrado en dos dosis.

Valganciclovir

Valganciclovir es un profármaco de ganciclovir que presenta elevada biodisponibilidad. Además, se observa menos proporción de pacientes con neutropenia entre los pacientes tratados con valganciclovir que entre aquellos tratados con ganciclovir.

En 2015⁷⁷ se publicó un estudio donde se comparaba la eficacia del tratamiento con valganciclovir durante 6 semanas frente a valganciclovir 6 meses. El tratamiento se administraba a neonatos con infección congénita y sintomáticos, con al menos un síntoma, pero la mayoría de ellos presentaban síntomas de SNC. Tras las 6 semanas de tratamiento inicial se aleatorizaba a los pacientes a recibir el tratamiento con valganciclovir hasta completar los 6 meses o placebo. En el trabajo no se observan diferencias en la audición a los 6 meses, pero sí una ligera tendencia a la mejoría o no empeoramiento de la audición a los 12 y 24 meses en los pacientes tratados durante 6 meses. El pronóstico neurológico sí que ofrece mejores resultados en aquellos pacientes tratados durante 6 meses. La neutropenia no difería entre los pacientes tratados 6 semanas y aquellos tratados 6 meses. Como los propios autores de este estudio dicen, sus datos sugieren que la administración de valganciclovir durante 6 meses tiene un efecto moderadamente favorable a nivel auditivo y de neurodesarrollo⁷⁷.

La dosis recomendada es de 32 mg/kg/día administrado en dos dosis.

Pese a todos estos datos, cabe destacar que no existe ningún estudio aleatorizado sobre la eficacia de ningún fármaco en el caso del CMVc asintomático, tampoco en el monosintomático. Las últimas recomendaciones publicadas en el documento de consenso internacional⁶⁸ recomiendan tratamiento en los pacientes con síntomas “moderados a graves”, con inicio en el primer mes de la vida, directamente con valganciclovir oral y durante no más de 6 meses.

En los pacientes asintomáticos o con síntomas leves y aislados, este panel de expertos no recomienda en la actualidad ningún tratamiento. Tampoco recomienda el tratamiento de manera rutinaria a los neonatos con hipoacusia neurosensorial aislada (como único síntoma).

No existe hoy en día ningún estudio aleatorizado que avale la recomendación de iniciar tratamiento a aquellos niños en los que se observa clínica compatible con CMV en el primer año de la vida y que se confirma que la adquisición fue congénita (mediante positividad para CMV en la sangre seca de la prueba del talón), por lo que la actitud terapéutica en estos casos debe ser individualizada⁶⁸. Sí que existen series de casos en que se ha tomado esta actitud terapéutica, con aparentes buenos resultados, como los observados por Del Rosal et al⁷⁸. En este trabajo tratan con valganciclovir (4 además con ganciclovir) a 13 niños de entre 0 y 8 meses de vida con diagnóstico retrospectivo y síntomas de SNC, observando buena tolerancia al tratamiento y mejoría o no empeoramiento en la audición.

3.8.c. Tratamiento de la infección de adquisición perinatal

El tratamiento de los neonatos con adquisición no congénita es controvertido y no se extrae de estudios sino de series de casos^{79,40,80,81}. Algunos autores observan mejoría de la hepatitis y colestasis con tratamiento con ganciclovir^{82,83} mientras que otros observan que los síntomas se resuelven también sin tratamiento^{40,79}. Por ello, en general, el tratamiento de este grupo de pacientes no se recomienda de

forma generalizada sino que se valora según la sintomatología del paciente^{40,80}. Se podría valorar la necesidad de tratamiento en aquellos pacientes más sintomáticos (síndrome séptico, afectación multisistémica, hepatitis y colestasis, neumonitis, meningitis o enteritis), mediante ganciclovir endovenoso, al menos dos semanas, prorrogables a dos semanas más si los síntomas no se han resuelto⁷⁹, aunque no existen tampoco datos extraídos de estudios sobre la duración del tratamiento. La duda queda sobre la incidencia de secuelas, pues en la actualidad se asume que la adquisición postnatal de CMV no va asociada a secuelas como la prenatal, pero se duda de si en los prematuros esta premisa se cumple o pueden desarrollar secuelas a largo plazo⁸⁰.

3.9. Pronóstico de la infección por citomegalovirus congénito

El pronóstico de la infección congénita por CMV varía en función de diversos factores, entre ellos el más importante la presencia de síntomas al nacimiento^{84,5}.

Las posibles secuelas a largo plazo son:

- hipoacusia neurosensorial: que puede ser bilateral, progresiva y profunda, y hasta en el 33-50% de los casos no está presente al nacimiento⁸⁵.
- corioretinitis: a diferencia de la producida por *Toxoplasma gondii* no suele aparecer tras el periodo neonatal, pero sí puede dejar secuelas.
- coeficiente intelectual bajo.
- parálisis cerebral/paresia.
- convulsiones: que pueden no estar presentes al nacimiento, pero aparecer en los primeros años de la vida.
- alteraciones del lenguaje y del aprendizaje, que son independientes de la pérdida auditiva.
- alteraciones dentales: esmalte dental displásico.

Entre todas las secuelas posibles cabe destacar la hipoacusia, que puede ocurrir no sólo en los sintomáticos sino también en los asintomáticos, y de hecho la progresión es igual en ambos grupos, salvo que en los primeros la hipoacusia suele ser más marcada y su progresión más rápida⁸⁶. La edad mediana de aparición de la hipoacusia tardía es de 11 meses, pero puede aparecer hasta casi 4 años después, lo que obliga a seguimiento auditivo durante muchos años⁸⁵. La hipoacusia puede ser fluctuante (más frecuente en asintomáticos que en sintomáticos), y ocurrir únicamente en un oído y a determinadas frecuencias. Es por este motivo que se aconseja realizar estudio auditivo cada 6 meses hasta los 5 años (si se observa cambio en los resultados, cada 3 meses)⁸⁵ y a partir de esa edad, anual hasta la adolescencia⁶⁸.

Los principales factores de mal pronóstico descritos al nacimiento incluyen microcefalia, corioretinitis y la presencia de alteraciones neurológicas o neuroimagen alterada en el primer mes de vida. De todos modos, en un estudio publicado en 2002 sobre factores pronósticos de mala evolución auditiva en niños sintomáticos encuentran que los dos únicos factores de riesgo independientes para la aparición hipoacusia a largo plazo son la presencia retraso de crecimiento intrauterino y la presencia de petequias⁹.

Los factores de riesgo de mala evolución en pacientes asintomáticos no se conocen. Existe un estudio sobre carga viral al nacimiento y pronóstico auditivo en el que se observa que una carga viral menor de 3.000 copias/mL en neonatos asintomáticos se asocia a buen pronóstico auditivo⁸⁷.

Un factor pronóstico clásico y que en la actualidad está en duda es el tipo de infección materna. Los estudios son contradictorios, y, pese a que hay trabajos que apoyan que la primoinfección da lugar a neonatos más sintomáticos al nacimiento y con más secuelas¹⁰, existen otros en los que se observa que la proporción de

secuelas entre los niños nacidos de madres con primoinfección no difiere demasiado de aquellos nacidos tras reinfección/reactivación³⁹.

Otro factor que clásicamente se pensaba relacionado con el pronóstico era la carga viral al nacimiento. Si bien es cierto que se ha demostrado que los pacientes sintomáticos suelen tener la carga viral más alta³⁹, un estudio de 2009⁸⁷ no vio asociación entre carga viral alta y peor pronóstico auditivo (salvo en los niños asintomáticos, en los que sí se observó que una carga viral menor de 3.000 copias/mL se asociaba a buen pronóstico). Otro estudio en que se intentó relacionar la cantidad de virus excretado en orina con la aparición de hipoacusia tampoco pudo establecer correlación⁸⁸.

Posiblemente el principal factor pronóstico sea la edad gestacional en el momento de la infección. Los hijos de madres con seroconversión en el primer trimestre suelen tener más secuelas que aquellos cuya infección ocurrió en la segunda mitad de la gestación^{89,5}. Cabe destacar, de todos modos, que la adquisición en el tercer trimestre también puede comportar hipoacusia o alteración neurológica, pese a que en menor proporción de casos que en el caso de una infección en el primer trimestre.

4. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de la infección congénita en el recién nacido se realiza demostrando la positividad de CMV en algún líquido orgánico durante los primeros 15 o 21 días de vida según las guías (el más frecuentemente utilizado es la orina, pero la positividad en otros líquidos orgánicos es también diagnóstica). Cuando nos encontramos ante la sospecha clínica de CMVc en un paciente de más de 15-21 días de vida, es importante averiguar si la adquisición fue prenatal (congénita) o postnatal puesto que ambas entidades tienen un pronóstico significativamente diferente, y por tanto la decisión de tratamiento también es distinta. Como ya se ha mencionado en antecedentes, tres estudios^{75,77,76} han demostrado la efectividad del tratamiento antiviral en pacientes sintomáticos para disminuir el riesgo de secuelas, sobretodo hipoacusia. Para el diagnóstico retrospectivo en la actualidad se investiga la presencia de DNA de CMV mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real en la sangre seca del papel secante almacenado excedente del programa de cribado metabólico neonatal (muestra obtenida, normalmente, en las primeras 72 horas de vida). Este método se ha validado en otros países a través de diversos estudios publicados^{31,55,54,61,52,90,56} habiendo demostrado una sensibilidad que oscila entre un 28 y un 100% según los diferentes autores, pero no está validado en nuestro país con este fin. Un único estudio realizado por nuestro grupo y publicado en Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica⁶⁵ (**Anexo 1**) observó una sensibilidad del 50% en una muestra de 14 pacientes. Ante estos resultados, se decidió realizar un estudio multicéntrico con pacientes del Registro Estatal de Infección Congénita por Citomegalovirus (REDICCMV).

REDICCMV es un registro online de carácter estatal en donde se incluyen todos aquellos casos con CMVc de aquellos centros que participan en el proyecto. Cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario 12 de

Octubre. Se requiere consentimiento informado de las familias para incluir a un paciente en la base de datos. El registro ha sido desarrollado para mejorar el conocimiento de la infección congénita por CMV en nuestro medio y facilitar el desarrollo de estudios sobre esta patología. Actualmente cuenta con más de 420 pacientes de 40 hospitales españoles. Los datos de los pacientes se recogen y analizan mediante REDCap (Research Electronic Data Capture)⁹¹, proporcionado por el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Se trata de una base de datos web segura, diseñada para almacenar datos para estudios de investigación.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El paciente diagnosticado de CMVc debe presentar positividad para la detección de DNA de CMV en la sangre seca almacenada excedente del programa de cribado metabólico neonatal. Si esta técnica fuese suficientemente sensible, todos los pacientes con CMVc probado de REDICCMV deberían presentar un resultado positivo. Los niños que no presentan CMVc deben presentar negatividad para la detección de DNA de CMV en sangre seca.

Por todo ello, el estudio de DNA de CMV en la sangre seca almacenada excedente del programa de cribado metabólico neonatal debe permitir el diagnóstico retrospectivo de los pacientes con CMVc en los que no se haya realizado el estudio microbiológico durante las dos/tres primeras semanas de vida.

6. OBJETIVOS

6.1. Principal

Valorar la sensibilidad, especificidad, razón de probabilidad positiva y razón de probabilidad negativa de la técnica de detección de DNA de CMV mediante PCR a tiempo real (rt-PCR) en la sangre seca del papel secante excedente del programa de cribado metabólico neonatal en los pacientes con diagnóstico confirmado de CMV congénito.

6.2. Secundario

Establecer la adecuación del uso de esta técnica en nuestro país para deducir si la adquisición de la infección fue pre o postnatal.

Analizar la posible relación entre diversas variables clínicas y el resultado de la prueba.

7. MÉTODOS

Estudio multicéntrico ambispectivo observacional de casos-controles.

7.1. Definición de caso

Los casos son pacientes con diagnóstico confirmado de CMVc por PCR positiva o cultivo viral en cualquier líquido corporal (orina, sangre, LCR o saliva) en las dos primeras semanas de vida, incluidos en la cohorte española REDICCMV y nacidos entre enero de 2007 y enero de 2016. Los pacientes incluidos desde 2014 se han recogido de forma prospectiva. Todos los pacientes tienen un mínimo de 6 meses de seguimiento.

Se ofreció a todos los centros que pertenecen a REDICCMV participar en este estudio. De todos los pacientes se solicitaron a las respectivas unidades provinciales de cribado neonatal el envío (previa firma del consentimiento informado de las familias) de un trozo del papel secante con sangre seca excedente del programa de cribado metabólico neonatal, recogida a las 48-72 horas del nacimiento. Los papeles secantes entre comunidades autónomas difieren mínimamente, como se muestra en la **tabla 4**.

7.2. Definición de control

Los controles corresponden a neonatos nacidos en un único centro (Hospital QuirónSalud Barcelona) a los cuales, por motivos de sospecha clínica, se determinó CMV en orina al nacimiento mediante PCR (COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test) y ésta resultó negativa. Son, por tanto, niños a los cuales se ha confirmado que no tienen la infección al nacimiento. La muestra de la mayoría de controles se recogió en el momento de realizar la prueba de cribado metabólico

neonatal, recogiendo dos círculos más de sangre en papel secante, sin que eso supusiera ningún procedimiento extra para los recién nacidos. En algunos casos las muestras se han obtenido del Programa de Cribado Neonatal de Cataluña. Se solicitó consentimiento informado a las familias de los controles.

Comunidad Autónoma	Tipo de papel	Diámetro
Cataluña*	Whatman® 903 (GE Healthcare, Kent, UK)	8 mm hasta 2013 12 mm desde 2013
Madrid	Whatman® 903 (GE Healthcare, Kent, UK) and Perkin Elmer® 226 Spot Saver Card (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)	13 mm
Andalucía	Schleicher & Schuell 903® (Schleicher & Schuell, Inc, USA)	15 mm
Navarra	Perkin Elmer® 226 Spot Saver Card (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)	9 mm
Canarias	Schleicher & Schuell 903® (Schleicher & Schuell, Inc, USA)	15 mm

Tabla 4. Tipo de papel y diámetro de los círculos en las 5 comunidades autónomas de nacimiento de los pacientes.

Shleicher & Schuell 903® y Whatman 903® son el mismo tipo de papel (hasta 2008 fue fabricado por Shleicher & Schuell y desde entonces por Whatman).

* Para los controles negativos se usó Whatman®903 con círculo de 12 mm de diámetro.

7.3. Datos clínicos recogidos

Los datos recogidos para este estudio han sido:

1. Edad gestacional (semanas). Se consideran prematuros los niños nacidos de una gestación de 36 semanas y 6 días o menos, los a término aquellos con edades gestacionales comprendidas entre las 37 semanas y las 41 semanas y 6 días y los postérmino aquellos de 42 semanas o más.
2. Peso al nacimiento (gramos). Se consideran retraso de crecimiento intrauterino aquellos niños con percentil de peso, talla y perímetro craneal menor de 10 para la edad gestacional.
3. Sexo.
4. Presencia o no al nacimiento de signos o síntomas compatibles con CMVc.
5. Tipo de signos y síntomas al nacimiento. Se han considerado: Retraso de crecimiento intrauterino, microcefalia, hipoacusia, hipotonía, trombocitopenia, petequias, alteración ecográfica cerebral (alteración sustancia blanca, ventriculomegalia, calcificaciones intracraneales, vasculopatía lenticuloestriada), alteración de RM cerebral (alteración sustancia blanca, ventriculomegalia, calcificaciones intracraneales, vasculopatía lenticuloestriada, alteraciones en la giración), corioretinitis, sepsis, hepatoesplenomegalia, ictericia, aumento de transaminasas, polimorfomación.
6. Presencia de hipoacusia al nacimiento.
7. Presencia de hipoacusia neurosensorial durante el seguimiento (mínimo 6 meses).
8. Tratamiento: recibe o no tratamiento, tipo de tratamiento recibido.
9. Presencia de alteración neurológica durante el seguimiento (mínimo 6 meses).
10. Carga viral en sangre al nacimiento.

Algunos de estos datos han sido obtenidos de la hoja de recogida de datos (**anexo 2**), y otros se han extraído de REDcap.

Además, se han recogido los siguientes datos:

11. Tiempo de seguimiento de los pacientes.
12. Tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra y el procesamiento de la misma para este estudio.
13. Medida del diámetro del círculo de papel secante.
14. Carga viral en sangre seca

7.4. Procesamiento de las muestras

Los investigadores de los diferentes centros solicitaron a los laboratorios de cribado regionales las muestras de los pacientes, y éstas fueron enviadas a la Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria (UPIIP) del Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, para su procesamiento. Se analizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Dicho laboratorio está acreditado según la normativa UNE-EN ISO 9000_2015 y pasa regularmente los controles periódicos de calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Se cortaron dos círculos de papel secante con bisturí estéril. Se colocaron en un tubo de ensayo y se añadió 1 mL de tampón PBS (phosphate buffered saline tampon). Se vortearon los tubos para permitir que la sangre seca se transfiriera del papel al líquido. Para la extracción del DNA se usaron 400 µL de esta muestra mediante un sistema automatizado (EasyMag®, bioMérieux, Marcy, l'Étoile, France). En el laboratorio de microbiología del hospital se usa esta técnica para la extracción del DNA pues permite la extracción de DNA de diversas muestras

clínicas de manera simultánea, y además todos los procesos pueden ser llevados a cabo en el mismo tubo de ensayo sin necesidad de cambios de plataforma, lo que disminuye la posibilidad de contaminación externa del material genético.

La amplificación se realizó mediante rt-PCR a tiempo real (RealStar CMV®, Altona, Hamburg, Germany), usando el termociclador Smartcycler® (Cepheid®, Sunnyvale, California, USA).

Esta prueba incluye una amplificación heteróloga (control interno) para identificar una posible inhibición de la rt-PCR y para confirmar la integridad de todos los reactivos.

Según el fabricante, el límite de detección de la técnica son 0,42 IU/μL y el límite de cuantificación es 1 IU/μL.

La carga viral se expresa en IU/mL y en logaritmo base 10. La carga viral en sangre seca es una técnica semicuantitativa, pues se parte de una muestra que no es líquida, y de ella se extrae un valor de carga viral, que será más o menos alto según la dilución de la misma en el líquido que se añade. En realidad, permite una comparación entre la cantidad de virus que hay en las muestras de sangre seca de los diferentes pacientes, pues la cantidad de líquido añadido es siempre la misma, y permite una comparación con la carga viral al nacimiento de manera semicuantitativa.

7.5. Estudio estadístico

Se ha realizado un análisis descriptivo de las variables clínicas. Las variables categóricas se expresan en número de casos y porcentajes, y se han calculado los intervalos de confianza (95%) cuando ha sido oportuno. Para comparar variables categóricas se ha usado el test Chi-cuadrado, y el test exacto de Fisher, útil en caso

de muestras pequeñas (menos de 5 pacientes en uno de los apartados de la tabla 2x2).

Las variables continuas se expresan como medianas y rangos intercuartílicos (primer cuartil-tercer cuartil, equivalente a percentil 25-percentil 75). Para compararlas con una variable dicotómica se ha usado la U de Mann-Whitney. Para comparar la relación lineal entre dos variables continuas se ha usado el coeficiente de correlación de Spearman.

La significación estadística se ha considerado como un valor de p menor de 0,05

Para el análisis estadístico se ha usado el programa SPSS versión 20 (IBM, Armonk, New York, USA).

7.6. Consideraciones éticas

El trabajo cuenta con la aprobación del comité de ética del Hospital Universitari Vall d'Hebron, como estudio número PR(AMI)194/2012 como hospital coordinador y con la aprobación del comité de ética del Hospital QuirónSalud Barcelona para la recogida de los controles.

Los investigadores locales se encargaron de las aprobaciones de los comités éticos locales en los diferentes centros incluidos en el estudio.

Se ha obtenido consentimiento informado de todos los pacientes y controles incluidos en este estudio. En el **anexo 3** constan la hoja informativa a los padres de los pacientes y la hoja de consentimiento informado. En el **anexo 4** constan la hoja informativa a los padres de los controles y la hoja de consentimiento informado respectiva.

8. RESULTADOS

8.1. Análisis descriptivo de la población a estudio

Han participado en este estudio 10 centros de 5 comunidades autónomas.

Se han reclutado un total de 184 individuos (103 pacientes y 81 controles) cuya distribución geográfica se muestra en la **tabla 5**.

Centro	Número de pacientes	Número de controles	Comunidad Autónoma
H. Sant Joan de Déu	46	-	Cataluña
H. Vall d'Hebron	23	-	Cataluña
H. La Paz	13	-	Madrid
H. Gregorio Marañón	6	-	Madrid
H. 12 de Octubre	6	-	Madrid
H. QuirónSalud Barcelona	3	81	Cataluña
Complejo Universitario de Canarias	2	-	Canarias
H. Joan XXIII	2	-	Cataluña
H. Carlos Haya	1	-	Andalucía
Complejo Hospitalario de Navarra	1	-	Navarra
Total	103	81	

Tabla 5. Centros que han participado en el estudio, número de pacientes por centro y Comunidad Autónoma.

Los nombres de los investigadores de cada centro se detallan en el **Anexo 5**.

8.1.1. Análisis descriptivo de los casos

a. Edad gestacional (semanas)

La edad gestacional mediana entre los pacientes fue de 38 semanas, con RIC 36-39 semanas. Veintinueve pacientes fueron prematuros (33,3%), 58 a término y en 19 se desconoce la edad gestacional.

b. Peso al nacimiento (gramos)

La mediana de peso al nacimiento fue de 2.647 gramos, con RIC 2.232,5-3.045 gramos. Veintisiete pacientes (26,2%) presentaban retraso de crecimiento intrauterino.

c. Sexo

Cincuenta y dos pacientes eran mujeres (50,5%) frente a 51 hombres (49,5%).

d. Presencia o no de signos o síntomas al nacimiento compatibles con CMVc

Sesenta y cinco pacientes (63,1%) presentaban al nacimiento signos o síntomas compatibles con CMVc. Los signos y síntomas que presentan los 65 pacientes sintomáticos se recogen en la **tabla 6**. Veintitrés pacientes presentaban más de un síntoma.

Retraso de crecimiento intrauterino	27 (41,5)
Neuroimagen patológica	25 (38,5)
Trombocitopenia	12 (18,5)
Petequias	10 (15,4)
Microcefalia	9 (13,8)
Hipoacusia	8 (12,3)
Hepatoesplenomegalia	5 (7,7)
Hipotonía	4 (6,2)
Sepsis	2 (3,1)
Ictericia	2 (3,1)
Aumento de transaminasas	1 (1,5)
Corioretinitis	1 (1,5)

Tabla 6. Síntomas y signos al nacimiento. Resultados expresados en número de casos (porcentaje sobre los 65 pacientes sintomáticos)

Ocho (7,8% de los 103 globales) pacientes presentaban hipoacusia en la primera evaluación al nacimiento.

e. Tratamiento

Se dispone de datos de 102/103 pacientes. De ellos, 64 (62,7%) recibieron tratamiento antiviral específico, y se dispone de información sobre el tratamiento concreto en 43 pacientes. Cinco recibieron únicamente ganciclovir endovenoso, 21 tratamiento secuencial con ganciclovir endovenoso y posteriormente con valganciclovir oral, y 17 únicamente valganciclovir oral (**figura 1**).

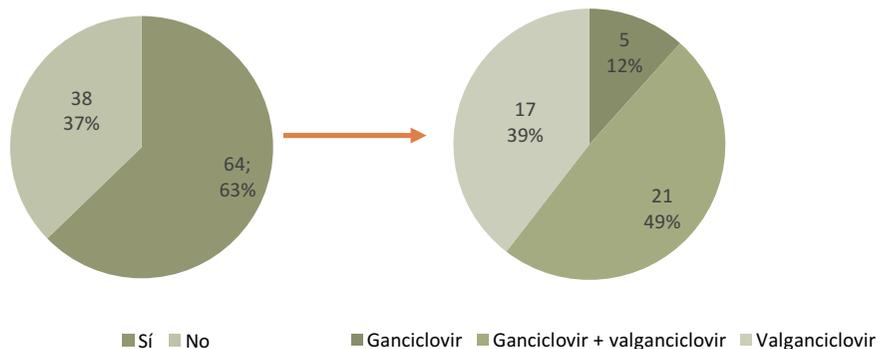


Figura 1. Porcentaje de niños que reciben tratamiento y tratamiento recibido

f. Presencia de hipoacusia neurosensorial durante el seguimiento (mínimo 6 meses)

En 97 pacientes se dispone de datos de valoración auditiva más allá de los 6 meses de seguimiento. De ellos, en 27 pacientes se detectó hipoacusia durante el seguimiento (27,8%). En 24 de los 62 pacientes sintomáticos de los que se tienen datos se detectó hipoacusia en el seguimiento, lo que equivale a un 38,7%, frente a 3/35 (8,6%) de los pacientes asintomáticos al nacimiento.

g. Presencia de alteración neurológica durante el seguimiento (mínimo 6 meses)

Se tienen datos de alteración neurológica en el seguimiento en 96 pacientes. De ellos, hay alteración neurológica en 23 (24%), frente a 73 (76%) que no presentan alteración neurológica en el seguimiento.

h. Tiempo de seguimiento de los pacientes

La mediana de meses de seguimiento fue de 35,4 meses (RIC 15,7-50,8).

i. Tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra y el procesamiento de la misma para este estudio

La mediana de meses transcurridos entre la recolección de la muestra y el procesamiento de la misma ha sido de 23 meses (RIC 12,8-42), (mínimo 1,31 meses, máximo 69,2 meses).

j. Medida del diámetro del círculo de papel secante

Se han encontrado 5 medidas de papel secante diferentes según comunidades autónomas (ver **tabla 7** para la distribución de pacientes según el tamaño del círculo).

Medida	Número de pacientes
8 mm	44
9 mm	1
12 mm	30
13 mm	25
15 mm	3

Tabla 7. Medida del diámetro del círculo de papel secante.

Resultados expresados en número de casos

k. Carga viral en sangre al nacimiento (los datos se expresan en copias/mL (log))

Se dispone de datos de carga viral en 92 pacientes. La mediana de carga viral al nacimiento entre todos los pacientes es de 1.936 copias/ml (log 3,3) (RIC 276,5- 8.305 copias/ml (log 2,5- 3,93)). La cifra mínima de carga viral fue indetectable y la máxima de 7.400.000 copias/ml.

Entre los pacientes asintomáticos (datos de carga viral en 31 de 38 pacientes asintomáticos), la mediana de carga viral al nacimiento es de 1.548 copias/ml (3,19) (RIC 149-2.906) y entre los sintomáticos (datos de carga viral en 61 de 65 pacientes) 2.364,5 copias/ml (3,37) (RIC 333,25-10.000). La distribución de la carga viral al nacimiento es la misma en ambos grupos, con $p=0,277$.

Entre los 95 pacientes de los que se tienen datos de carga viral, 13 presentaban carga viral indetectable al nacimiento. Tres de los 33 pacientes asintomáticos de los que se tienen datos de carga viral al nacimiento presentan carga viral indetectable, frente a 10 de los 62 pacientes sintomáticos de los que se tienen datos de carga viral al nacimiento.

En la **tabla 8** se resumen los datos de carga viral en los pacientes sintomáticos y asintomáticos, y en la **tabla 9** la distribución de pacientes según si la carga viral es detectable o no entre sintomáticos y asintomáticos.

	Asintomáticos		Sintomáticos	
	Copias/ml	Logaritmo	Copias/ml	Logaritmo
Mediana	1.548	3,19	2.364,5	3,37
Rango intercuartílico	149-2.906	2,17-3,46	333,25-10.000	2,52-4

Tabla 8. Medianas y rangos intercuartílicos de carga viral en sangre al nacimiento en pacientes asintomáticos y sintomáticos.

Carga viral	Asintomáticos	Sintomáticos	Total
Indetectable	3 (9,1%)	10 (16,1%)	13
Detectable	30 (90,9%)	52 (83,9%)	82
Total	33	62	95

Tabla 9. Distribución de los pacientes según carga viral en sangre detectable o no al nacimiento, entre pacientes sintomáticos y asintomáticos. Los resultados se expresan en n (%)

I. Carga viral en sangre seca

En 51 de los 58 casos en que el resultado de rt-PCR en sangre seca ha sido positivo se ha podido cuantificar la carga viral. La mediana de carga viral en sangre seca es de 3.843 copias/ml (log 3,6) (RIC 1.297- 17.967,5 copias/ml (log 3,1- 4,3)). Cabe recordar que se trata de una medida semicuantitativa que por tanto permite la comparación entre las muestras, pero no guarda una correlación lineal con la carga viral en sangre.

La mediana de carga viral en sangre seca entre los pacientes sintomáticos al nacimiento es de 3.966 copias/ml (log 3,6) (RIC 1.909,5- 17.967,5 copias/ml (log 3,3-4,3)). La mediana de carga viral en sangre seca entre los pacientes asintomáticos al nacimiento es de 3.016,5 copias/ml (log 3,5) (RIC 621-14.360,5 copias/ml (log 2,8-4,2)). La distribución de la carga viral en sangre seca es la misma entre los sintomáticos y los asintomáticos, con $p=0,701$.

En la **tabla 10** se resumen los datos de carga viral en sangre seca en pacientes sintomáticos y asintomáticos al nacimiento.

	Asintomáticos		Sintomáticos	
	Copias/ml	Logaritmo	Copias/ml	Logaritmo
Mediana	3.016,5	3,5	3.966	3,6
Rango intercuartílico	621-14.360,5	2,8-4,2	1.909,5- 17.967,5	3,3-4,3

Tabla 10. Medianas y rango intercuartílico de carga viral en sangre seca en pacientes asintomáticos y sintomáticos.

8.1.2. Análisis descriptivo de los controles

Al inicio del trabajo se anonimizaron los controles, por lo que sólo se dispone de datos de 53/81 controles. La mediana de edad gestacional es de 38/2 semanas (RIC 35-39/5). La edad gestacional mínima fue de 30 semanas y máxima 41/6. La mediana de peso al nacimiento fue de 2.420 gramos (RIC 1.798-2.805).

8.2. Sensibilidad, especificidad, razón de probabilidad positiva y razón de probabilidad negativa.

Resultados de la rt-PCR para la detección de CMV en sangre seca

De entre los 103 pacientes, 58 presentan rt-PCR positiva en sangre seca (56,3%), frente a 2 de 81 del grupo control, como se muestra en la **tabla 11**.

rt-PCR	Pacientes	Controles
Positiva	58	2
Negativa	45	79
Total	103	81

Tabla 11. Resultados rt-PCR en grupo de pacientes y en grupo de controles.

Según estos resultados, la sensibilidad de la prueba es 56% (95%IC 47-65%), la especificidad 98% (91-99%), la razón de probabilidad positiva 22,81 (5,74-90,58), y la razón de probabilidad negativa 0,45 (0,36-0,60).

Sensibilidad entre los pacientes con carga viral detectable al nacimiento

Si se analizan únicamente los pacientes con carga viral detectable al nacimiento (82), se observa que la rt-PCR en sangre seca es positiva en 48 de ellos, lo que equivale a una sensibilidad del 59% (IC 48-69%).

Sensibilidad entre los pacientes sintomáticos al nacimiento

Si se analizan únicamente los pacientes con síntomas al nacimiento (65), se observa que la rt-PCR en sangre seca es positiva en 35 de ellos, lo que equivale a una sensibilidad del 54% (IC 42-65%).

Sensibilidad entre los pacientes asintomáticos al nacimiento

Si se analizan únicamente los pacientes asintomáticos al nacimiento (38), se observa que la rt-PCR en sangre seca es positiva en 23 de ellos, lo que equivale a una sensibilidad del 60% (IC 45-74%).

Sensibilidad entre los pacientes de las dos comunidades autónomas que más pacientes han aportado al estudio

Se ha analizado la sensibilidad entre los pacientes de las dos comunidades autónomas que más pacientes han aportado al estudio: Madrid (25 pacientes) y Cataluña (74 pacientes), resultando 64% (IC 45-80%) y 55% (IC 44-66%), respectivamente.

8.3. Relación entre el resultado de la rt-PCR en sangre seca y diversas variables.

Se ha estudiado la relación entre diversas variables clínicas y la positividad-negatividad de la rt-PCR en sangre seca.

8.3.1. Variables cualitativas

Como se muestra en la **tabla 12**, ninguna de las variables cualitativas estudiadas se ha podido relacionar en este estudio con el resultado de la rt-PCR en sangre seca de manera estadísticamente significativa.

Variable clínica		Número de pacientes con/sin la variable estudiada	rt-PCR positiva	rt-PCR negativa	Valor de p
Al nacimiento					
Presencia de síntoma/s	Si	65 (63,1)	35 (60,3)	30 (66,7)	0,51
	No	38 (36,9)	23 (39,7)	15 (33,3)	
Hipoacusia neurosensorial	Si	8 (7,7)	4 (6,9)	4 (8,9)	0,727
	No	95 (92,2)	54 (93,1)	41 (91,1)	
Alteración neurológica	Si	29 (28,4)	15 (25,9)	14 (31,8)	0,509
	No	73 (71,6)	43 (74,1)	30 (68,2)	
Retraso de crecimiento intrauterino	Si	27 (26,2)	15 (25,9)	12 (26,7)	1
	No	76 (73,8)	43 (74,1)	33 (73,3)	
Trombocitopenia	Si	11 (10,7)	3 (5,2)	8 (17,8)	0,055
	No	92 (89,3)	55 (94,8)	37 (82,2)	
Petequias	Si	10 (9,7)	6 (10,3)	4 (8,9)	1
	No	93 (90,3)	52 (89,7)	41 (91,1)	
Microcefalia	Si	9 (8,7)	5 (8,6)	4 (8,9)	1
	No	94 (91,3)	53 (91,4)	41 (91,1)	
Hepato-espleno megalia	Si	5 (4,9)	2 (3,4)	3 (6,7)	0,651
	No	98 (95,1)	56 (96,6)	42 (93,3)	

Hipotonía	Si	4 (3,9)	2 (3,4)	2 (4,4)	1
	No	99 (96,1)	56 (96,6)	43 (95,6)	
Sepsis	Si	2 (1,9)	0 (0)	2 (4,4)	0,188
	No	101 (98,1)	58 (100)	43 (95,6)	
Ictericia	Si	2 (1,9)	2 (3,4)	0 (0)	0,503
	No	101 (98,1)	56 (96,6)	45 (100)	
Aumento de transaminasas	Si	1 (1)	1 (1,7)	0 (0)	0,563
	No	102 (99)	57 (98,3)	45 (100)	
Corioretinitis	Si	1 (1)	0 (0)	1 (2,2)	0,437
	No	102 (99)	58 (100)	44 (97,8)	
Durante el seguimiento					
Hipoacusia neurosensorial	Si	27 (27,8)	15 (26,3)	12 (30)	0,730
	No	70 (72,2)	42 (73,7)	28 (70)	
Alteración neurológica	Si	23 (24)	16 (28,6)	7 (17,6)	0,193
	No	73 (76)	40 (71,4)	33 (82,5)	
Reciben tratamiento	Si	64 (62,7)	33 (56,9)	31 (70,5)	0,116
	No	38 (37,3)	25 (43,1)	13 (29,5)	

Tabla 12. Variables clínicas cualitativas al nacimiento y durante el seguimiento y su relación con el resultado de la rt-PCR ensangre seca. Los resultados se expresan como número de casos (%).

8.3.2. Variables cuantitativas

1. Tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra y el procesamiento de la misma para este estudio.

El tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra y el procesamiento de la misma para este estudio no es un factor determinante de resultado. La mediana de tiempo transcurrido entre la recolección y el procesamiento de las muestras en los pacientes con rt-PCR positiva en sangre seca es de 42,8 meses, frente a 24,5 meses de los que presentan rt-PCR negativa. La distribución de meses transcurridos es la misma entre las categorías de resultado rt-PCR, con $p=0,663$, y la mediana de meses transcurridos también, con $p=0,931$.

En la **tabla 13** se resumen los datos de tiempo transcurrido en pacientes con resultado positivo y pacientes con resultado negativo de la rt-PCR.

Meses	rt-PCR positiva	rt-PCR negativa
Mediana	42,87	24,49
Rango intercuartílico	12,3-44,6	13,41-35,57

Tabla 13. Medianas y rango intercuartílico del tiempo transcurrido entre la recolección y el procesamiento de las muestras en pacientes con rt-PCR positiva y pacientes con rt-PCR negativa. Los resultados se expresan en meses.

2. Medida del diámetro del círculo de papel secante.

El diámetro del papel secante tampoco es un factor determinante de resultado. Se tiene datos de diámetro de papel de 101 muestras. En la **tabla 14** se muestran los diámetros de las muestras en relación a los resultados de rt-PCR ($p=0,441$).

Diámetro papel secante	rt-PCR positiva en sangre seca	Rt-PCR negativa en sangre seca	Total
8	26	18	44
9	0	1	1
12	13	15	28
13	16	9	25
15	1	2	3
	56	45	101

Chi² de Pearson: 3,7370 valor de p = 0,441

Tabla 14. Diámetros de papel secante y su relación con el resultado de la rt-PCR en sangre seca.

3. Carga viral en sangre al nacimiento.

La distribución de la carga viral en sangre al nacimiento no es la misma entre los pacientes con rt-PCR positiva y aquellos con rt-PCR negativa, con $p=0,017$. En nuestro estudio, los pacientes con carga viral más baja tienden a tener rt-PCR negativa en sangre seca. Los resultados se muestran en la **figura 2**.

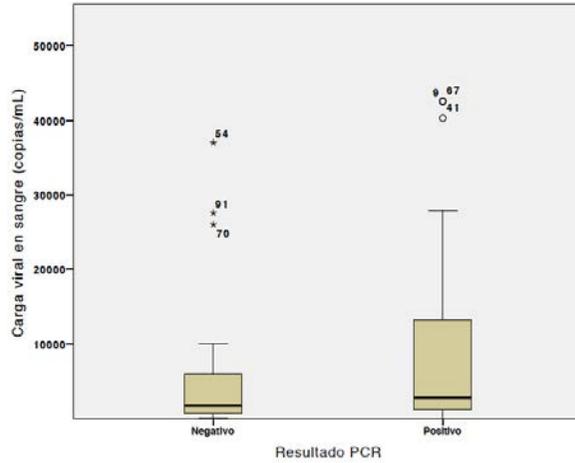


Figura 2. Distribución de las cargas virales en sangre al nacimiento en relación al resultado de rt-PCR

Sin embargo, se ha estudiado si existe correlación entre el resultado de la carga viral al nacimiento y la carga viral en sangre seca, y no se ha encontrado relación lineal entre estos dos parámetros, tal como se observa en la **figura 3**, que demuestra la ausencia de una correlación lineal entre el resultado de la carga viral en sangre seca y la carga viral en sangre al nacimiento.

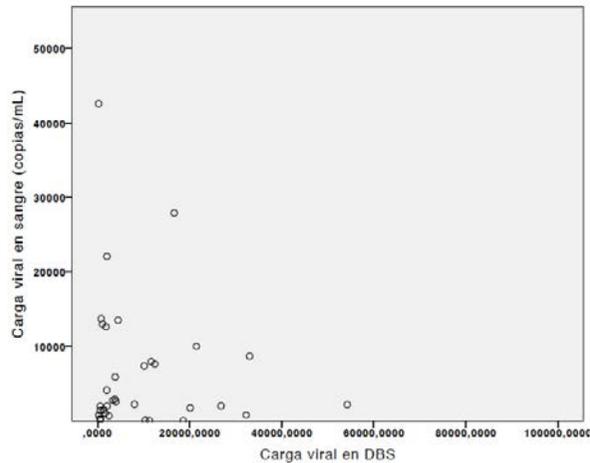


Figura 3. Gráfico donde se observa la distribución de pacientes según carga viral al nacimiento comparada con la carga viral en sangre seca (coeficiente de correlación de Pearson: 0,146).

9. DISCUSIÓN

Este estudio constituye el estudio de análisis de la sensibilidad de la PCR en la sangre seca de la prueba de detección precoz neonatal para la detección de DNA de CMV con mayor número de pacientes entre los publicados hasta la fecha, según nuestros datos. Pone de manifiesto una menor sensibilidad a la descrita en muchos otros estudios, y por tanto es un signo de alerta de cara a no descartar la adquisición congénita del virus ante un resultado negativo en las situaciones en las que el diagnóstico de CMVc debe realizarse de manera retrospectiva, además de demostrar la necesidad de una mejora técnica en este ámbito.

9.1. Características de la población a estudio

Nuestra población a estudio presenta altas proporciones de sintomáticos en comparación con la literatura, pues está extraída de una cohorte de enfermos y, por tanto, sobrevalora relativamente la presencia de síntomas. Como se ha dicho anteriormente, la proporción de asintomáticos suele ser del 85-90%, frente a un 15% de sintomáticos. En nuestro caso, la cifra de sintomáticos sube al 63,1% debido al hecho tratarse de una cohorte y no a un programa de cribado poblacional. Esto condiciona la alta proporción de niños que reciben tratamiento (62,7%). La distribución de los diferentes síntomas sí es consistente con la literatura: así, por ejemplo, hasta un 41,5% de los pacientes sintomáticos presentaban retraso de crecimiento intrauterino (descrito en un 50% en el artículo de revisión de Boppana et al³⁹ y en Remington¹). Si analizamos todos los pacientes, se observa retraso de crecimiento intrauterino en un 26%, que es claramente mayor al dato descrito por Simonazzi⁹², quien informa de un 6,7% de retrasos de crecimiento intrauterino en el global de los niños infectados y del 16% si se analizan únicamente los sintomáticos. En cambio, en nuestro estudio únicamente un 15,4% de niños tenía petequias (frente a un 76% reseñado en Remington), un

18,5% trombocitopenia (frente al 77% de Remington), casi un 13,8% microcefalia (frente al 53% de Remington), o un 3,1% de ictericia frente al 69% de Remington. Un 33,3 % de nuestros pacientes son prematuros, dato consistente con el 34% de Remington¹ y con el tercio de pacientes prematuros del que habla Boppana³⁹. Es imprescindible conocer la realidad local a la hora de interpretar los resultados obtenidos mediante cualquier técnica diagnóstica.

De manera global, en el 27% de nuestros pacientes se observa alteración auditiva a lo largo del seguimiento (con un mínimo de tiempo de seguimiento de 6 meses) y en el 24% de niños alguna alteración neurológica en ese periodo. Si nos centramos únicamente en los pacientes sintomáticos, se detectó hipoacusia en un 38,7% de pacientes, porcentaje inferior al 63% descrito por Goderis⁸⁶. Entre los pacientes asintomáticos se observó hipoacusia en 8,6%, dato concordante con el 8% descrito por el mismo autor. Es difícil dar una razón para esta diferencia de evolución auditiva entre los pacientes sintomáticos, aunque parece concordar con el hecho de que, pese a que hay más número de sintomáticos, los síntomas parecen más leves en nuestra cohorte. Además, se trata de una serie de niños que han recibido en su mayoría tratamiento, por lo que una posible hipótesis sería una mejoría del pronóstico auditivo gracias al tratamiento, tal como se describe en los trabajos de Kimberlin^{77,75}, donde se observa mejoría del pronóstico auditivo a los 6 meses en los neonatos tratados con ganciclovir 6 semanas, y mejoría del pronóstico auditivo a los 12 y 24 meses en los niños tratados con valganciclovir 6 meses. De todos modos, es importante tener presente que la definición de un paciente como sintomático/asintomático o de la presencia de un signo o síntoma concreto varía según los diferentes estudios estando, además, definido de manera poco precisa en muchos de ellos.

Un dato que llama la atención, pese a no ser objeto inicial de esta tesis, es que la carga viral al nacimiento entre pacientes sintomáticos y asintomáticos es superponible, pues las medianas de cargas virales entre uno y otro grupo son

similares, 3,19 log₁₀ en el caso de los asintomáticos (RIC 2,17-3,46) frente a 3,37 en el caso de los sintomáticos (RIC 2,52-4), así como su distribución. Un 9,1% de los pacientes asintomáticos presentó carga viral indetectable al nacimiento frente al 16,1% de pacientes sintomáticos. En otros trabajos, como en los publicados por Ross⁸⁷ y por Boppana⁹³, sí se observan diferencias en la carga viral entre los pacientes sintomáticos y asintomáticos, siendo la carga viral en los dos primeros meses de vida más alta en sintomáticos en ambos trabajos.

9.2. Sensibilidad de la rt-PCR y su relación con las variables estudiadas

Hasta la fecha, múltiples estudios han sido publicados, y de todos ellos destaca un metaanálisis publicado en 2015⁵², que resume los datos de los 14 estudios de mejor calidad publicados entre 1997 y 2012. La cifra de pacientes en estos estudios varía entre 7⁵⁵ y 92³¹. En algunos de estos estudios se mezclan muestras de niños con sospecha de infección⁵⁴ que finalmente no son confirmados, y en otros se realiza cribado poblacional y a la vez muestra de sangre seca como es el caso del trabajo de Boppana et al, publicado en 2010³¹. Ninguno de estos estudios de cribado poblacional tiene más de 100 pacientes con diagnóstico confirmado de CMVc, incluso en aquellos en que hacen cribado a más de 2.000 neonatos.

Las sensibilidades descritas están entre el 28³¹ y el 100%^{55,54,58,60,61,63}. La mayoría de estudios tienen sensibilidades por encima del 80% (en concreto 9/14). Del resto, hay dos con sensibilidades del 50%, dos con sensibilidades del 70%, y uno en el que se publican dos técnicas diferentes que demuestran una sensibilidad del 34 y del 28%, respectivamente³¹. La sensibilidad global reseñada en el metaanálisis es del 84%. En nuestro trabajo obtuvimos una sensibilidad francamente menor, del 56% (47-65%). En los trabajos comprendidos en este metaanálisis la metodología de estudio es diversa: los estudios con sensibilidades más altas son trabajos que incluyen neonatos con sospecha clínica de CMVc por sintomatología, y aquellos con sensibilidades más bajas son trabajos de cribado poblacional, que incluyen

pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos. En nuestro caso no se trata ni de un tipo de trabajo ni de otro, sino que partimos de una cohorte en la cual hay pacientes sintomáticos y otros asintomáticos, pero con alta proporción de sintomáticos.

Como ya se ha explicado anteriormente, la sensibilidad no depende únicamente de la población a estudio, sino también de la técnica utilizada. En los trabajos de Soetens⁵⁶ y de de Vries⁶⁶ se observa que existen técnicas de extracción de DNA más sensibles a la usada en nuestro trabajo, pues ellos obtienen una sensibilidad de la técnica EasyMag[®] (que usamos en nuestro centro modificada) del 73 y 53% respectivamente, y en sus trabajos describen técnicas de extracción de DNA con sensibilidades más altas. De todos modos, la técnica de extracción EasyMag[®] se ha modificado en el laboratorio de nuestro centro, modificando la cantidad de sílica y el número de lavados, y se estandarizó en sangre, consiguiendo más sensibilidad que en el protocolo original. Además, se realizó una comprobación interna con buena sensibilidad. En el laboratorio de microbiología de nuestro centro se optó por usar esta técnica de extracción pues la menor manipulación de las muestras permite disminuir al máximo la probabilidad de contaminación de las mismas y por tanto la presencia de falsos positivos. Hasta la fecha no había ninguna técnica comercializada validada para la extracción de DNA desde la muestra de sangre en papel secante, pero desde el año 2017, y de manera posterior a la realización del presente trabajo, se dispone de una técnica comercial validada para la extracción de DNA desde muestras sólidas como el papel secante (MagCore[®] (RBCBioscience, New Taipei City, Taiwan)), que ya se está usando en el laboratorio de nuestro centro. La rt-PCR realizada en este trabajo sí que está entre las más sensibles del mercado, tal como se indica el trabajo de Soetens⁵⁶.

Los estudios publicados hablan también de especificidades, que resultan francamente altas, entre el 98 y el 100%. La especificidad global descrita en el metaanálisis es del 100%, dato que corroboramos en nuestro estudio.

La única variable entre todas las estudiadas que tiene relación según nuestros datos con el resultado de la rt-PCR en sangre seca es la carga viral al nacimiento: los recién nacidos con cargas virales más bajas al nacimiento tienden a tener rt-PCR negativas en la sangre seca. Este resultado es plausible pues aquellos niños que tengan menores cargas virales en sangre tendrán también menores cargas virales en sangre seca y éstas serán más difíciles de detectar. Además, un círculo de papel secante estándar de 12 mm contiene 50 μ L de sangre, lo que hace más difícil la detección del DNA de CMV pues la cantidad de suero analizada es menor a la que se usa para la rt-PCR en sangre total (que son 110 μ L). De hecho, en el trabajo de de Vries de 2009⁶⁶ que comparaba 8 técnicas de PCR, cuando se miraba la sensibilidad con carga viral baja (2-3 log₁₀ copias/mL), 4 de las 8 técnicas no detectaban el DNA, incluso haciendo la prueba por triplicado, mientras que con carga viral alta (4-5 log₁₀ copias/mL), todas las técnicas detectaban el DNA de CMV si se realizaba la prueba por triplicado.

Pese a que la técnica de la carga viral en sangre seca es una técnica semicuantitativa, se ha estudiado si había relación con la carga viral en sangre mediante el coeficiente de correlación de Spearman, para estudiar si al aumentar la carga viral en sangre total al nacimiento también lo hacía la carga viral en sangre seca, y no se ha podido observar relación entre ambas determinaciones en las muestras en las que se ha podido realizar (51). Las cifras de carga viral en sangre total y en sangre seca no se pueden comparar numéricamente pues para la realización de la carga viral en sangre seca se parte de una muestra sólida que se diluye en líquido y, por tanto, esta dilución (en más o menos líquido) influye en el resultado de la carga viral. En cambio, en un estudio de 2013 en pacientes trasplantados se observaba buena correlación entre la carga viral en sangre total y en sangre seca, en una extracción realizada en el mismo momento⁹⁴. En nuestro trabajo, sin embargo, las fechas de las cargas virales difieren, en su mayoría, de la fecha de la toma de la muestra del talón en unos días. Se sabe que la carga viral no

es estable en el tiempo y fluctúa, como se observa en el trabajo de Ross⁸⁷ donde se ve que cambia de logaritmo en 20 de 50 pacientes, aumentando en 5, disminuyendo en 18 y únicamente en 7 se mantiene estable en el tiempo. Así pues, si las muestras de sangre seca y las muestras de sangre total se recogen en días separados, una posibilidad sería que la carga viral hubiera variado, y por tanto no se pueda correlacionar la carga viral en sangre total con la carga viral en sangre seca.

Cabe destacar que existe un número no despreciable de pacientes con cargas virales no detectables al nacimiento, y que únicamente pueden ser diagnosticados mediante detección o aislamiento del virus en orina o saliva. De hecho, un dato llamativo es que, de los 13 pacientes con carga viral indetectable al nacimiento, 5 presentan rt-PCR positiva en sangre seca. Además, si miramos la sensibilidad centrándonos únicamente los que tienen carga viral detectable al nacimiento (que por tanto son los que presuntamente tienen que tener rt-PCR positiva en sangre seca), la cifra de sensibilidad se mantiene en el 59% (IC 48-69%). Otro posible motivo que podría justificar la ausencia de correlación entre las cifras de carga viral en sangre total al nacimiento y la carga viral en sangre seca sea que la carga viral al nacimiento está realizada en múltiples centros de la geografía española. Los centros que han aportado pacientes son, la mayoría, centros de referencia regionales que, por tanto, recogen niños nacidos y estudiados en diversas maternidades, cada una con una técnica diferente para la realización de la carga viral, de manera que éstas, posiblemente, no son uniformes.

También se ha calculado la sensibilidad separando aquellos pacientes sintomáticos al nacimiento de los asintomáticos, resultando en 54% (IC 42-65%) en el caso de los sintomáticos y en 60% (IC 45-74%) en el caso de los asintomáticos, por lo que no se ven diferencias en este sentido, tal como se expone más adelante.

Algunos estudios han correlacionado la carga viral en sangre seca con la presencia de síntomas al nacimiento^{95,90}, mientras que en otros no se observa esta relación⁵⁶. En nuestro caso, no se observan diferencias en las cifras de carga viral en sangre seca entre los sintomáticos y los asintomáticos.

El diámetro del círculo no se correlaciona, tampoco, con el resultado de la prueba. En el metaanálisis de Wang⁵² sí que se observaban diferencias entre el tamaño del círculo y la sensibilidad, observando que aquellos menores de 5,6 mm de diámetro presentan menor sensibilidad. En nuestro caso todos los círculos eran mayores que este tamaño por lo que, probablemente, no encontramos diferencias en cuanto al tamaño del círculo. Pese a que las características técnicas de los papeles son prácticamente iguales, quisimos ver si podía haber diferencias a este respecto, de manera que se calculó la sensibilidad entre los pacientes de las dos comunidades autónomas que más pacientes habían aportado al estudio: Cataluña y Madrid. Entre los pacientes de la comunidad de Madrid (25) la sensibilidad es del 64% (IC 45-80%) si se compara con la sensibilidad entre los pacientes de Cataluña (74), que es del 55% (IC 44-66%). Son, por tanto, muy parecidas.

Entre los resultados a destacar está el hecho de que el tiempo no ha influido en el resultado, por lo que, según nuestros datos (que además concuerdan con los datos publicados⁵⁶), la muestra parece estable en el tiempo y los hallazgos sugieren que el material genético del virus no se degrada con el tiempo. Así pues, el tiempo transcurrido no es factor que influya en una falsa negatividad.

Cuando se intenta correlacionar la presencia de síntomas (de manera global o síntoma por síntoma) o los datos de evolución (hipoacusia, alteración neurológica) o tratamiento recibido con el resultado de la rt-PCR, éstos tampoco tienen relación. Este punto es importante puesto que uno podría pensar que los pacientes que dejan de diagnosticarse si se usa la rt-PCR en sangre seca pueden ser aquellos menos sintomáticos, y por tanto a los cuales no se ofrecería tratamiento y

presentarían menos secuelas, hecho que no se observa en nuestro trabajo. De hecho, un posible sesgo de nuestro estudio radica en que no es un trabajo de cribado sino una población extraída de una cohorte, que sobredimensiona los sintomáticos y por tanto deja fuera los niños paucisintomáticos y aquellos asintomáticos. De todos modos, la no relación entre la sintomatología y el resultado de la rt-PCR minimiza el impacto de esta limitación. Tampoco las secuelas se han relacionado con el resultado, lo que pone de manifiesto que incluso a niños con secuelas los podemos estar diagnosticando falsamente como no congénitos y perder una oportunidad de tratamiento para ellos. En nuestro trabajo, hasta un 44% de los pacientes hubieran sido falsamente diagnosticados de adquisición posnatal en el caso de haberse realizado un diagnóstico retrospectivo, privándoles de una oportunidad de tratamiento y seguimiento.

En los últimos años algunos autores han estado debatiendo sobre la necesidad de la implantación del cribado poblacional de CMVc, con varios estudios publicados en este sentido^{96,97,98,99}. Cannon⁹⁶ pone de manifiesto que el cribado de CMVc mejoraría el pronóstico de aquellos niños infectados que desarrollarán hipoacusia de forma tardía. Una opción que podría valorarse para este cribado podría ser, aprovechando la estructura ya consolidada del cribado metabólico neonatal mediante sangre seca, usar la propia sangre seca para la detección del virus. Los datos de nuestro trabajo desaconsejan esta estrategia si se usa la técnica de extracción y rt-PCR aquí descritas. En cambio, los trabajos de PCR en saliva seca son prometedores¹⁰⁰ y aparentan sencillez¹⁰¹: se obtiene la saliva introduciendo una torunda en la boca del recién nacido una hora después de haber comido, dejando que se empape de saliva; posteriormente se deja secar y se envía en un contenedor apropiado al laboratorio. Estas técnicas presentan, hasta la fecha, sensibilidades y especificidades muy altas (97,5% y 99,9%, respectivamente, en un trabajo de Boppana¹⁰²), y constituyen una opción prometedora si se piensa en implementar un programa a nivel poblacional.

A la vista de nuestros resultados, queda claro que antes de dar validez a un resultado de rt-PCR en sangre seca, hay que conocer, además de las características del paciente estudiado, la sensibilidad de la técnica que se dispone.

Como conclusión podemos decir que, pese a que la razón de probabilidad positiva de la prueba es alta, y por tanto es útil para confirmar el diagnóstico, ante la baja sensibilidad y la baja razón de probabilidad negativa, un resultado negativo de la rt-PCR por esta técnica en sangre seca no descarta la presencia de una infección congénita por CMV, especialmente en niños con carga viral baja al nacimiento. Por este motivo, si se usa esta técnica, muchos pacientes perderían una oportunidad de tratamiento y seguimiento si su diagnóstico dependiera de la realización de la rt-PCR en sangre seca. Con estos datos, y ante la sospecha clínica fuera del periodo neonatal de la existencia de una infección congénita por CMV, un resultado negativo de la rt-PCR en sangre seca mediante la técnica descrita en este trabajo no podría descartarnos el diagnóstico. Parece evidente que es necesario disponer de una técnica definida en cuanto a muestra, extracción, procesamiento e interpretación que permita el diagnóstico retrospectivo de la infección por CMVc cuando ello sea necesario. En este sentido, sería más útil una estrategia de cribado poblacional que no dejara fuera de diagnóstico los niños menos sintomáticos pero que presentarán secuelas. Si se pensara en estrategias de cribado universal de CMVc, la rt-PCR en la sangre seca del talón, realizada mediante la técnica en este trabajo descrita, no debiera ser la de elección para tal fin.

10. LIMITACIONES

La primera limitación de nuestro estudio se basa en el hecho de que la población estudiada no está extraída de un trabajo de cribado poblacional, sino de una cohorte de pacientes, por lo que la sintomatología está, probablemente, sobredimensionada. Como ya se ha comentado en la discusión, la no relación entre la sintomatología y el resultado de la rt-PCR minimiza el impacto de esta limitación, pero aun así está presente.

Por el mismo hecho de tratarse de una cohorte, los datos se extraen de aquellos datos que constan en REDCap o de los datos que los investigadores aportan mediante la hoja de recogida de datos, no de datos recogidos directamente del paciente o de las historias clínicas, en cuyo caso serían completamente homogéneos y no habría riesgo de pérdidas de datos al ser recogidos por un único observador.

Asimismo, las determinaciones de la carga viral en sangre total al nacimiento están realizadas en múltiples laboratorios de la geografía española, lo que probablemente ha influido en no haber encontrado correlación entre los resultados de carga viral al nacimiento y en sangre seca. El resto de evaluaciones y pruebas complementarias también han sido realizadas por diversos observadores y diversas técnicas. Pese a que la mayoría de los datos recogidos son objetivos, cualquier estudio siempre tiene más validez si tanto las evaluaciones clínicas como las pruebas complementarias están realizadas por los mismos observadores/con las mismas técnicas.

La mayor limitación del trabajo es la falta de técnicas validadas para trabajar en muestras de sangre seca, lo que implica que la mayoría de centros usen modificaciones de las técnicas comerciales, tal como se ha realizado para este trabajo. El principal problema de este hecho es que dificulta la comparación

interlaboratorios, lo que unido a la baja prevalencia de la infección congénita en nuestro medio hace que estas técnicas sean difíciles de estandarizar.

Está descrito en la literatura que existen técnicas de extracción de ácidos nucleicos más sensibles que la técnica easyMag®, pero dicha técnica ha sido modificada en el laboratorio, modificando el protocolo para optimizar la extracción de ácidos nucleicos para aumentar la sensibilidad, por lo que la técnica de extracción de la que hablan en las publicaciones no es la misma que la que hemos usado en este trabajo. Por el hecho de usar una técnica comercial se minimiza la posibilidad de contaminación de las muestras y de falsos positivos que presentan otras técnicas de extracción manual, que son más vulnerables a la contaminación externa. No podemos saber con exactitud, por tanto, si la técnica de extracción ha llevado a una menor sensibilidad o si esta menor sensibilidad es debida a otros motivos. Como se ha dicho anteriormente, desde el año 2017 se dispone de una técnica validada para la extracción de DNA desde muestras sólidas, MagCore® (RBCBioscience, New Taipei City, Taiwan) que, a pesar de no haber podido ser aplicada al presente estudio, ya ha sido incorporada para su uso en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología del Hospital Universitari Vall d'Hebron para la extracción del DNA desde la muestra de sangre seca.

Pese a todas las limitaciones del hecho del uso de una técnica no validada para la extracción de DNA de sangre seca, consideramos que este trabajo abre una puerta a la reflexión sobre la validez de los resultados de la PCR en sangre seca sobre los cuales decidimos la actitud terapéutica y de seguimiento de los pacientes.

Finalmente, consideramos que limitaciones de nuestro estudio son, de hecho, sus fortalezas: se ha realizado en las condiciones de la práctica clínica habitual, recogiendo las muestras de los laboratorios de cribado (y no recogiénolas en el momento del nacimiento y de manera homogénea), enviándolas al centro de referencia, y analizándolas tiempo después de su recogida. Esto pone de

manifiesto que, en la práctica clínica habitual, la sensibilidad de la rt-PCR para detectar la presencia de CMV en la sangre seca de la prueba del talón no es tan alta como se observa en los estudios previamente publicados, y, por tanto, una alta proporción de pacientes perderían oportunidad de tratamiento y seguimiento si se usara como técnica de cribado.

11. CONCLUSIONES

1. La sensibilidad de la técnica de rt-PCR para el diagnóstico retrospectivo de CMVc en nuestro estudio es menor a la descrita en otros trabajos: 56% (IC 47-65%).
2. La especificidad es alta: 98% (IC 91-99%), consistente con la literatura previamente publicada en otros países.
3. Únicamente la carga viral en sangre al nacimiento se ha correlacionado con el resultado de la rt-PCR: los pacientes con cargas virales más bajas tienden a tener rt-PCR negativa con más frecuencia que los pacientes con cargas virales más altas.
4. En nuestro trabajo no se ha podido hallar relación entre la carga viral en sangre total al nacimiento y la carga viral en sangre seca.
5. Ningún dato clínico ni analítico al nacimiento ni durante el seguimiento clínico de los pacientes se ha relacionado con el resultado de la rt-PCR.
6. El tiempo entre la extracción de la muestra y la determinación de la rt-PCR no es un factor determinante de negatividad, por lo que, a pesar de sus limitaciones, el estudio retrospectivo en sangre de talón no debe limitarse a los pacientes de menor edad.
7. En pacientes sintomáticos y con secuelas también se observan falsos negativos de la técnica, por lo que podrían ser diagnosticados falsamente de formas posnatales y perder una oportunidad de tratamiento y seguimiento en pacientes en los que se ha demostrado claramente su utilidad.
8. Por todo ello, pese a que la razón de probabilidad positiva es alta, la baja sensibilidad y baja razón de probabilidad negativa hacen que, con la técnica diagnóstica y metodología utilizadas, ante una rt-PCR en sangre seca negativa no se pueda descartar una adquisición congénita de CMV, especialmente en pacientes con carga viral baja al nacimiento.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Britt W. Cytomegalovirus. In: Wilson CB, Nizet V, Remington JS, Klein JO, Maldonado Y, eds. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. 7th ed. Elsevier; 2011:706-755. doi:10.1016/B978-1-4160-6400-8.00023-7.
2. Pass RF. Cytomegalovirus. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, eds. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 4th editio. Elsevier; 2012:1044-1052.
3. Gabrielli L, Bonasoni MP, Lazzarotto T, et al. Histological findings in foetuses congenitally infected by cytomegalovirus. *J Clin Virol*. 2009;46(SUPPL. 4). doi:10.1016/j.jcv.2009.09.026.
4. Fisher S, Genbacev O, Maidji E. Human Cytomegalovirus Infection of Placental Cytotrophoblasts In Vitro and In Utero : Implications for Transmission and Pathogenesis. 2000;74(15):6808-6820.
5. 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*. 2006;35(2):216-220. doi:10.1016/j.jcv.2005.09.015.
6. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: Description and outcome. *Prenat Diagn*. 2013;33(8):751-758. doi:10.1002/pd.4118.
7. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1366-1371. doi:10.1056/NEJM200105033441804.
8. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal Immunity and Prevention of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Am Med Assoc*. 2003;289(8):1008-1011. doi:10.1097/01.OGX.0000089033.63347.04.
9. Rivera LB, Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 2002;110(4):762-767. doi:10.1542/peds.110.4.762.
10. Puhakka L, Renko M, Helminen M, et al. Primary versus non-primary maternal cytomegalovirus infection as a cause of symptomatic congenital infection – register-based study from Finland. *Infect Dis (Auckl)*. 2017;4235(April):1-12. doi:10.1080/23744235.2017.1279344.
11. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):522-528. doi:10.1086/600882.
12. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Boppana SB, et al. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(3):297.e1-297.e8. doi:10.1016/j.ajog.2009.11.018.

13. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis*. 2010;50(11):1439-1447. doi:10.1086/652438.
14. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*. 2006;43(9):1143-1151. doi:10.1086/508173.
15. Zhao P, Ma D, Xue F, et al. Seroprevalence and risk factors of human cytomegalovirus infection in the eastern Chinese population. *Arch Virol*. 2009;154(4):561-564. doi:10.1007/s00705-009-0339-3.
16. Korndewal MJ, Mollema L, Tcherniaeva I, et al. Cytomegalovirus infection in the Netherlands: Seroprevalence, risk factors, and implications. *J Clin Virol*. 2015;63:53-58. doi:10.1016/j.jcv.2014.11.033.
17. De Ory Manchón F, Sanz Moreno JC, Castañeda López R, Ramírez Fernández R, León Rega P, Pachón Del Amo I. Seroepidemiología frente a citomegalovirus en la comunidad de Madrid. *Rev Esp Salud Publica*. 2001;75(1):55-62.
18. Rojo MD, García M V, Oyonarte S, Mendoza J, Carazo C, Fernández-Montoya A. [Prevalence of antibodies against CMV in Grenada]. *Sangre (Barc)*. 1992;37(4):293-295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1325073>.
19. 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*. 2004;19(1):85-89. doi:10.1023/B:EJEP.0000013253.56343.6f.
20. Pembrey L, Waiblinger D, Griffiths P, Patel M, Azad R, Wright J. Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and varicella zoster virus infection in the first two years of life: a cohort study in Bradford, UK. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):220. doi:10.1186/s12879-017-2319-7.
21. Grosjean J, Trapes L, Hantz S, et al. Human cytomegalovirus quantification in toddlers saliva from day care centers and emergency unit: A feasibility study. *J Clin Virol*. 2014;61(3):371-377. doi:10.1016/j.jcv.2014.07.020.
22. Kuessel L, Husslein H, Marschalek J, et al. Prediction of maternal cytomegalovirus serostatus in early pregnancy: A retrospective analysis in Western Europe. *PLoS One*. 2015;10(12). doi:10.1371/journal.pone.0145470.
23. LAMARRE V, GILBERT NL, ROUSSEAU C, GYORKOS TW, FRASER WD. Seroconversion for cytomegalovirus infection in a cohort of pregnant women in Québec, 2010–2013. *Epidemiol Infect*. 2015;6:1-9. doi:10.1017/S0950268815003167.
24. Jin Q-E, Su J-R, Wu S-N. Cytomegalovirus infection among pregnant women in Beijing: seroepidemiological survey and intrauterine transmission. *J Microbiol Biotechnol*. 2017. doi:10.4014/jmb.1612.12020.
25. Pumarola A, Salleras L, Vidal J, et al. [Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, rubella virus, cytomegalovirus and herpes simplex virus

- in pregnant women of Catalonia]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1989;7(2):83-86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2562317>.
26. Paradiž KR, Seme K, Puklavec E, Paro-Panjan D, Poljak M. Prevalence of congenital cytomegalovirus infection in Slovenia: A study on 2,841 newborns. *J Med Virol*. 2012;84(1):109-115. doi:10.1002/jmv.22230.
 27. Lübeck PR, Doerr HW, Rabenau HF. Epidemiology of Human Cytomegalovirus (HCMV) in an urban region of Germany: What has changed? *Med Microbiol Immunol*. 2010;199(1):53-60. doi:10.1007/s00430-009-0136-3.
 28. Puccio G, Cajozzo C, Canduscio LA, et al. Epidemiology of Toxoplasma and CMV serology and of GBS colonization in pregnancy and neonatal outcome in a Sicilian population. *Ital J Pediatr*. 2014;40:23. doi:10.1186/1824-7288-40-23.
 29. Wujcicka W, Gaj Z, Wilczyński J, Sobala W, Śpiewak E, Nowakowska D. Impact of socioeconomic risk factors on the seroprevalence of cytomegalovirus infections in a cohort of pregnant Polish women between 2010 and 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(11):1951-1958. doi:10.1007/s10096-014-2170-3.
 30. 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*. 2007;17(5):355-363. doi:10.1002/rmv.544.
 31. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, et al. Dried Blood Spot Real-time Polymerase Chain Reaction Assays to Screen Newborns for Congenital Cytomegalovirus Infection. *JAMA*. 2010;303(14):1375. doi:10.1001/jama.2010.423.
 32. Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *Int J Infect Dis*. 2014;22(6239):44-48. doi:10.1016/j.ijid.2013.12.010.
 33. Turner KM, Lee HC, Boppana SB, Carlo W a, Randolph D a. Incidence and impact of CMV infection in very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2014;133(3):e609-15. doi:10.1542/peds.2013-2217.
 34. Marín Gabriel M a., Fernández Ibieta M, González Tomás M^ai., et al. Infección congénita por citomegalovirus en hijos de madres infectadas por el VIH. *An Pediatría*. 2005;62(1):38-42. doi:10.1157/13070179.
 35. Guibert G, Warszawski J, Chenadec JL, et al. Decreased risk of congenital cytomegalovirus infection in children born to HIV-1-infected mothers in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2009;48(11):1516-1525. doi:10.1086/598934.
 36. Yinon Y, Farine D, Yudin MH, et al. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010;32(4):348-354. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=20500943&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/0F7F9616-5B87-4B13-9B6A-13125F285281>.

37. Benoist G, Leruez-Ville M, Magny JF, Jacquemard F, Salomon LJ, Ville Y. Management of pregnancies with confirmed cytomegalovirus fetal infection. *Fetal Diagn Ther*. 2013;33(4):203-214. doi:10.1159/000342752.
38. Baquero-Artigao F. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr*. 2009;71(6):535-547. doi:10.1016/j.anpedi.2009.07.029.
39. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome. *Clin Infect Dis*. 2013;57(suppl 4):S178-S181. doi:10.1093/cid/cit629.
40. Luck S, Sharland M. Postnatal cytomegalovirus: innocent bystander or hidden problem? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2009;94(1):F58-F64. doi:10.1136/adc.2007.131623.
41. Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17(1):53-58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469396>.
42. Schleiss MR. Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection: recent advances. *Curr Opin Pediatr*. 2006;18(1):48-52. doi:10.1097/01.mop.0000192520.48411.fa.
43. Gimeno-Cardona C, Navarro-Ortega D, de Oña-Navarro M, Pérez-Sáenz JL. Diagnóstico Microbiológico De Las Infecciones Por Herpesvirus. 2005.
44. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2008;41(3):192-197. doi:10.1016/j.jcv.2007.10.015.
45. Visentin S, Manara R, Milanese L, et al. Early Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Maternal Hyperimmunoglobulin Therapy Improves Outcomes Among Infants at 1 Year of Age. *Clin Infect Dis*. 2012;55(4):497-503. doi:10.1093/cid/cis423.
46. Bilavsky E, Pardo J, Attias J, et al. Clinical implications for children born with congenital cytomegalovirus infection following a negative amniocentesis. *Clin Infect Dis*. 2016;63(1):39-40. doi:10.1093/cid/ciw237.
47. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(2):476-482. doi:10.1067/mob.2000.106347.
48. Benoist G, Salomon LJ, Mohlo M, Suarez B, Jacquemard F, Ville Y. Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: Comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(7):900-905. doi:10.1002/uog.6129.
49. Capretti MG, Lanari M, Tani G, et al. Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev*. 2014;36(3):203-211. doi:10.1016/j.braindev.2013.04.001.
50. Blázquez-Gamero D. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD

- DE MEDICINA Departamento de Farmacología. 2013.
<http://eprints.sim.ucm.es/21198/>.
51. Goycochea-Valdivia W-A, Baquero-Artigao F, del Rosal T, et al. Cytomegalovirus DNA Detection by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid of Infants With Congenital Infection: Associations With Clinical Evaluation at Birth and Implications for Follow-up. *Clin Infect Dis*. February 2017. doi:10.1093/cid/cix105.
 52. Wang L, Xu X, Zhang H, Qian J, Zhu J. Dried blood spots PCR assays to screen congenital cytomegalovirus infection: a meta-analysis. *Viol J*. 2015;12(1):60. doi:10.1186/s12985-015-0281-9.
 53. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *J Clin Virol*. 2006;35(2):206-209. doi:10.1016/j.jcv.2005.08.010.
 54. Binda S, Caroppo S, Didò P, et al. Modification of CMV DNA detection from dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection. *J Clin Virol*. 2004;30(3):276-279. doi:10.1016/j.jcv.2003.11.012.
 55. Barbi M, Binda S, Primache V, Clerici D. Congenital cytomegalovirus infection in a northern Italian region. *Eur J Epidemiol*. 1998;14(8):791-796. doi:10.1023/A:1007554726449.
 56. 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*. 2008;46(3):943-946. doi:10.1128/JCM.01391-07.
 57. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Pinto PC, Figueiredo LT, Jorge SM. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by the polymerase chain reaction technique. *J Virol Methods*. 2001;97(1-2):159-164.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483226>.
 58. Distéfano AL, González CA, Pardón F, Sarubi MA, Canero Velazco C. [Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in newborn dried blood spots on Guthrie cards. A promissory technique]. *Arch Argent Pediatr*. 2008;106(2):132-137. doi:10.1590/S0325-00752008000200007.
 59. Johansson PJ, Jönsson M, Ahlfors K, Ivarsson SA, Svanberg L, Guthenberg C. Retrospective diagnostics of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. *Scand J Infect Dis*. 1997;29(5):465-468. doi:10.3109/00365549709011855.
 60. Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, et al. Le diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à cytomégalovirus sur le sang séché des cartes de Guthrie : l'expérience en France. *Arch Pediatr*. 2009;16(11):1503-1506. doi:10.1016/j.arcped.2009.06.014.
 61. Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, et al. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect*

- Dis.* 2011;52(5):575-581. doi:10.1093/cid/ciq241.
62. Paixao P, Almeida S, Gouveia P, Vilarinho L, Vaz Osório R. Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull.* 2009;14(9):13-15. doi:19135.
 63. 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 Diagnostics.* 2006;8(2):240-245. doi:10.2353/jmoldx.2006.050075.
 64. Vaudry W, Frcpc M, Pstat RJR, et al. Congenital cytomegalovirus infection in high-risk Canadian infants: Report of a pilot screening study. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2010;21(1).
 65. Vives-Oñós I, Soler-Palacín P, Codina-Grau MG, et al. ¿Podemos descartar infección congénita por citomegalovirus cuando la reacción en cadena de la polimerasa viral es negativa en la prueba del talón? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(9):570-573. doi:10.1016/j.eimc.2013.09.018.
 66. de Vries JJC, Claas ECJ, Kroes ACM, Vossen ACTM. Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 2009;46:S37-S42. doi:10.1016/j.jcv.2009.09.001.
 67. Atkinson C, Emery VC, Griffiths PD. Development of a novel single tube nested PCR for enhanced detection of cytomegalovirus DNA from dried blood spots. *J Virol Methods.* 2014;196. doi:10.1016/j.jviromet.2013.10.029.
 68. Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2017;3099(17):1-12. doi:10.1016/S1473-3099(17)30143-3.
 69. Revello MG, Tibaldi C, Masuelli G, et al. Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *EBioMedicine.* 2015;2(9):1205-1210. doi:10.1016/j.ebiom.2015.08.003.
 70. Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus by changing behaviors: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J.* 1996;15(3):240-246. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8852913>.
 71. Nigro G, Adler SP. Hyperimmunoglobulin for Prevention of Congenital Cytomegalovirus Disease. *Clin Infect Dis.* 2013;57(suppl 4):S193-S195. doi:10.1093/cid/cit586.
 72. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005;353(13):1350-1362. doi:10.1056/NEJMoa043337.
 73. Nigro G, Adler SP, Parruti G, et al. Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy-A case-

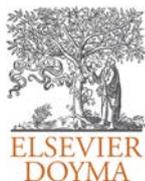
- control study of the outcome in children. *J Infect Dis*. 2012;205(2):215-227. doi:10.1093/infdis/jir718.
74. Leruez-Ville M, Ghout I, Bussi??res L, et al. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(4):462.e1-462.e10. doi:10.1016/j.ajog.2016.04.003.
 75. Kimberlin DW, Lin C-Y, Sanchez PJ, et al. EFFECT OF GANCICLOVIR THERAPY ON HEARING IN SYMPTOMATIC. *J Pediatr*. 2003;143(1):16-25.
 76. Oliver SE, Cloud GA, Sanchez PJ, et al. Neurodevelopmental Outcomes Following Ganciclovir Therapy in Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infections Involving the Central Nervous System. *J Clin Virol*. 2009;46(Suppl 4):S22-S26. doi:10.1016/j.jcv.2009.08.012. Neurodevelopmental.
 77. Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, et al. Valganciclovir for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease. *N Engl J Med*. 2015;372(10):933-943. doi:10.1056/NEJMoa1404599.
 78. Del Rosal T, Baquero-Artigao F, Blázquez D, et al. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection beyond the neonatal period. *J Clin Virol*. 2012;55(1):72-74. doi:10.1016/j.jcv.2012.06.001.
 79. Alarcón Allen A, Baquero-Artigao F. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. *An Pediatría*. 2011;74(1):52.e1-52.e13. doi:10.1016/j.anpedi.2010.05.024.
 80. Gunkel J, Wolfs TF, de Vries LS, Nijman J. Predictors of severity for postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants and implications for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(11):1345-1355. doi:10.1586/14787210.2014.966080.
 81. Mehler K, Oberthuer A, Lang-Roth R, Kribs A. High rate of symptomatic cytomegalovirus infection in extremely low gestational age preterm infants of 22-24 weeks' gestation after transmission via breast milk. *Neonatology*. 2013;105(1):27-32. doi:10.1159/000355306.
 82. Ozkan TB, Mistik R, Dikici B, Nazlioglu HO. Antiviral therapy in neonatal cholestatic cytomegalovirus hepatitis. *BMC Gastroenterol*. 2007;7:9. doi:10.1186/1471-230X-7-9.
 83. Fischler B, Casswall TH, Malmborg P, Nemeth A. Ganciclovir treatment in infants with cytomegalovirus infection and cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;34(2):154-157. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840032>.
 84. Mackenzie Dreher A, Arora N, Fowler KB, et al. Spectrum of Disease and Outcome in Children with Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Pediatr*. 2014;164(4):855-859. doi:10.1016/j.jpeds.2013.12.007.
 85. Fowler KB. Congenital Cytomegalovirus Infection: Audiologic Outcome. *Clin Infect Dis*. 2013;57(suppl 4):S182-S184. doi:10.1093/cid/cit609.
 86. Goderis J, Keymeulen A, Smets K, et al. Hearing in Children with Congenital

- Cytomegalovirus Infection: Results of a Longitudinal Study. *J Pediatr*. 2016;172:110-115.e2. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.01.024.
87. Ross SA, Novak Z, Fowler KB, Arora N, Britt WJ, Boppana SB. Cytomegalovirus Blood Viral Load and Hearing Loss in Young Children With Congenital Infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(7):588-592. doi:10.1097/INF.0b013e3181979a27.
 88. Rosenthal LS, Fowler KB, Boppana SB, et al. Cytomegalovirus Shedding and Delayed Sensorineural Hearing Loss. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(6):515-520. doi:10.1097/INF.0b013e318198c724.
 89. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol*. 2011;52(3):244-246. doi:10.1016/j.jcv.2011.07.005.
 90. Vauloup-Fellous C, Ducroux A, Couloigner V, et al. Evaluation of Cytomegalovirus (CMV) DNA Quantification in Dried Blood Spots: Retrospective Study of CMV Congenital Infection. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3804-3806. doi:10.1128/JCM.01654-07.
 91. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research Electronic Data Capture (REDCap) - A metadata driven methodology and workflow process for providing translational research informatic support. *J Biomed Inform*. 2009;42(2):377-381. doi:10.1016/j.jbi.2008.08.010.Research.
 92. Simonazzi G, Curti A, Murano P, et al. Congenital cytomegalovirus infection and small for gestational age infants. *Prenat Diagn*. 2014;34(8):765-769. doi:10.1002/pd.4362.
 93. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr*. 2005;146(6):817-823. doi:10.1016/j.jpeds.2005.01.059.
 94. Limaye AP, Hayes TKS, Huang ML, Magaret A, Boeckh M, Jerome KR. Quantitation of cytomegalovirus DNA load in dried blood spots correlates well with plasma viral load. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2360-2364. doi:10.1128/JCM.00316-13.
 95. Leruez-Ville M, Ngin S, Guilleminot T, et al. Detection of cytomegalovirus DNA on dried blood spots collected from infants infected with HIV: An in-house method adaptable in resource-limited settings. *J Virol Methods*. 2013;193(2):503-507. doi:10.1016/j.jviromet.2013.07.024.
 96. Cannon MJ, Griffiths PD, Aston V, Rawlinson WD. Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit? *Rev Med Virol*. 2014;24(5):291-307. doi:10.1002/rmv.1790.
 97. Cannon MJ, Davis KF. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*. 2005;5:70. doi:10.1186/1471-2458-5-70.
 98. Din ES, Brown CJ, Grosse SD, et al. Attitudes toward newborn screening for

- cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 2011;128(6):e1434-42. doi:10.1542/peds.2011-1444.
99. Grosse SD, Dollard S, Ross DS, Cannon M. Newborn screening for congenital cytomegalovirus: Options for hospital-based and public health programs. *J Clin Virol*. 2009;46:S32-S36. doi:10.1016/j.jcv.2009.08.019.
 100. Barkai G, Ari-Even Roth D, Barzilai A, et al. Universal neonatal cytomegalovirus screening using saliva - Report of clinical experience. *J Clin Virol*. 2014;60(4):361-366. doi:10.1016/j.jcv.2014.04.024.
 101. Kadambari S, Luck S, Davis A, et al. Evaluating the feasibility of integrating salivary testing for congenital CMV into the Newborn Hearing Screening Programme in the UK. *Eur J Pediatr*. 2015;174(8):1117-1121. doi:10.1007/s00431-015-2506-8.
 102. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med*. 2011;364(22):2111-2118. doi:10.1056/NEJMoa1006561.

13. ANEXO 1. PUBLICACIÓN

Can we rule out a congenital cytomegalovirus infection when the result of polymerase chain reaction in dried blood spots is negative? Vives-Oñós I, et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014 Nov;32(9):570-3. doi: 10.1016/j.eimc.2013.09.018. Epub 2013 Nov 21.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

¿Podemos descartar infección congénita por citomegalovirus cuando la reacción en cadena de la polimerasa viral es negativa en la prueba del talón?



Isabel Vives-Oñós^{a,*}, Pere Soler-Palacín^a, María Gemma Codina-Grau^b, Andrea Martín-Nalda^a, Rosa María López-Galera^c, José Luís Marín-Soria^c y Concepció Figueras-Nadal^a

^a Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^c Programa de Cribado Neonatal, Sección Errores Congénitos del Metabolismo, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de junio de 2013

Aceptado el 27 de septiembre de 2013

On-line el 21 de noviembre de 2013

Palabras clave:

Enfermedades y anomalías congénitas, hereditarias y neonatales
Infección por citomegalovirus
Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
ADN viral
Gota de sangre seca
Cribado neonatal

R E S U M E N

Introducción: La determinación de la presencia de ADN de citomegalovirus (CMV) mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-PCR) en la gota de sangre seca en el papel absorbente usado para la realización de la prueba de detección precoz neonatal ha sido validada para el diagnóstico retrospectivo de infección congénita por CMV (CMVc) en estudios realizados en otros países, pero no en el nuestro. El objetivo de este estudio es analizar el valor diagnóstico de esta técnica en nuestro centro.

Métodos: Estudio retrospectivo transversal observacional de todos los pacientes con diagnóstico confirmado de CMVc entre enero de 2007 y septiembre de 2012.

Se ha determinado la presencia de ADN viral de CMV en las muestra de sangre seca de la prueba del talón de estos pacientes mediante rt-PCR.

Resultados: Se incluyeron 14 pacientes; 4/14 sintomáticos y 4/14 con secuelas. La detección de CMV por rt-PCR fue positiva únicamente en 7 de ellos. Se demostró una relación estadísticamente significativa entre la negatividad de la rt-PCR y cargas virales más bajas al nacimiento.

Conclusión: A pesar del pequeño tamaño muestral, nuestros datos ponen en evidencia la presencia de un número importante de falsos negativos en la detección de CMV por rt-PCR en este tipo de muestras en el diagnóstico de CMVc, especialmente en pacientes con cargas virales bajas al nacimiento.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Can we rule out a congenital cytomegalovirus infection when the result of polymerase chain reaction in dried blood spots is negative?

A B S T R A C T

Introduction: The detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by real time polymerase chain reaction (rt-PCR) in dried blood spots collected routinely for metabolic screening has been assessed for the retrospective diagnosis of congenital CMV (cCMV) infection in many studies, but not in Spain. The aim of this study is to analyze the diagnostic accuracy of this technique in our hospital.

Methods: A cross-sectional retrospective observational study was conducted including all patients born between January, 2007 and September, 2012 with confirmed cCMV infection.

The assessment of CMV DNA was made by using rt-PCR in dried blood spots of these patients.

Results: Fourteen patients were included: 4/14 were symptomatic and 4/14 had sequelae. The detection of CMV DNA by rt-PCR was positive in only 7 patients. A statistically significant relationship between low viral load at birth and negative rt-PCR in dried blood spots was demonstrated.

Conclusions: Despite the low number of patients included, our data highlight an important amount of false negative results in the DNA CMV detection by rt-PCR in these samples for the retrospective diagnosis of cCMV infection, especially in cases with low viral load at birth.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Keywords:

Congenital, hereditary, and neonatal diseases and abnormalities
Cytomegalovirus infection
Real-time polymerase chain reaction
Viral DNA
Dried blood spot testing
Neonatal screening

* Autora para correspondencia.

Correo electrónico: 41911ivo@comb.cat (I. Vives-Oñós).

Introducción

La infección por citomegalovirus (CMV) está considerada la infección congénita más frecuente en los países desarrollados¹, estimándose su incidencia entre un 0,6 y un 0,7%² de todos los nacimientos. En España no se realiza cribado serológico para CMV en las embarazadas por lo que no se conoce la verdadera prevalencia de infección en este grupo poblacional. La transmisión al feto depende del momento del embarazo en que se adquiere la infección, siendo más frecuente en el tercer trimestre pero más grave en el primero. La presentación clínica de la infección en el recién nacido es variable, pudiendo permanecer asintomático o presentar sintomatología preferentemente neurosensorial^{1,3}, cuya intensidad y gravedad van a depender principalmente del momento de la gestación en que tiene lugar la transmisión.

El diagnóstico analítico de la infección congénita debe realizarse mediante la detección de CMV en los primeros 15 días de vida. Suele realizarse por cultivo celular o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN en orina. La positividad en otros líquidos corporales es también diagnóstica, ya que tras producirse la infección el virus replica en la sangre y se elimina en orina y otros fluidos⁴.

Debido a que el recién nacido también puede infectarse en su paso por el canal del parto, a través de la leche materna o por vía horizontal a través del contacto con padres y cuidadores, es importante establecer el tipo de adquisición de la infección pues de ello dependerá la actitud terapéutica y también el pronóstico, que, con los conocimientos actuales, es claramente mejor si la adquisición es posnatal, con menor riesgo de secuelas neurosensoriales a largo plazo.

Cuando más allá de los primeros 15 días de vida se plantea la posibilidad diagnóstica de una infección congénita por CMV (CMVc), es de gran utilidad para establecer el diagnóstico diferencial con las formas posnatales disponer de una muestra biológica del periodo neonatal inmediato en la que poder determinar la presencia o no de CMV. Para ello se ha ensayado la detección de CMV en las muestras de sangre seca del papel (*Guthrie card*) usado para la realización de la prueba de detección precoz neonatal que se hace a todos los recién nacidos. Si en esa sangre no se observa la presencia de CMV, a priori, se podría deducir que la adquisición fue después de las 48-72 primeras horas de vida, y que por tanto no se trataría de una infección congénita, sino de una adquisición posnatal. Sin embargo, para valorar correctamente los resultados de esta prueba, deberíamos conocer su sensibilidad y especificidad.

Este método se ha validado en otros países a través de diversos estudios publicados⁵⁻¹⁷, habiendo demostrado una sensibilidad que oscila entre un 34 y un 100% según los diferentes autores¹⁸, pero no se dispone de datos en nuestro país.

Así, se plantea el presente estudio con el objetivo de valorar la sensibilidad de la técnica de detección de ADN de CMV en la sangre seca del papel de la prueba de detección precoz neonatal en los pacientes con diagnóstico confirmado de CMVc en nuestro centro.

Métodos

Pacientes

Estudio retrospectivo transversal observacional incluyendo a todos los pacientes diagnosticados de CMVc en nuestro centro, entre enero de 2007 y septiembre de 2012, recogidos a partir de las bases de datos de la Unidad de Patología Infecciosa e Inmunodeficiencias de Pediatría y del Servicio de Microbiología, revisándose un total de 86 historias clínicas.

Se incluyeron consecutivamente todos los pacientes diagnosticados de CMVc confirmada durante el periodo del estudio. El

diagnóstico se había establecido mediante la detección por PCR o cultivo viral de CMV en orina o cualquier fluido corporal (sangre, saliva o líquido cefalorraquídeo) en los primeros 15 días de vida.

Se recogieron las siguientes variables: sintomatología al nacimiento, edad gestacional, secuelas auditivas, tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra de sangre hasta su procesamiento y carga viral al nacimiento; y se ha valorado su relación con el resultado obtenido en la muestra de sangre seca del papel absorbente.

Así mismo se han recogido también los siguientes datos: sexo de los pacientes, presencia de seroconversión materna durante la gestación, motivo de la realización del cribado y edad en días al diagnóstico, así como la edad de los pacientes en el momento de realizar el estudio.

Muestras y procedimientos

Se solicitaron al Programa de Cribado Neonatal del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (previo consentimiento informado de las familias) las muestras de sangre en papel absorbente de estos pacientes, obtenidas durante el periodo neonatal. Todas ellas eran muestras excedentes del programa y por tanto no procesadas.

Se utiliza de forma rutinaria papel absorbente Whatman® 903 de la empresa Whatman (GE Healthcare, Kent, Reino Unido). Según las especificaciones técnicas del fabricante, cada círculo de 12,5 mm contiene entre 75 y 80 µl de sangre. Los círculos que se usan son de 8 mm de diámetro. Se calcula que en 8 mm de diámetro hay 25 µl de sangre, que con un hematocrito del 50% correspondería a la mitad de suero.

Estas muestras se procesaron y analizaron en el laboratorio de diagnóstico molecular del Servicio de Microbiología de nuestro hospital: se obtuvieron 2 discos de sangre seca mediante corte con bisturí estéril, se colocaron en tubos de ensayo y se añadió 1 ml de tampón PBS. Se agitó con *vortex* la muestra para facilitar la extracción de la muestra de sangre seca desde el papel a la solución acuosa. Se extrajeron 400 µl de sobrenadante y posteriormente se realizó la extracción de ácidos nucleicos con el sistema automatizado EZ1® (de Qiagen Inc., Valencia, CA, EE. UU.). La técnica consistió en una lisis celular enzimática y una purificación de los ácidos nucleicos por adsorción sobre partículas de sílica magnética. Posteriormente se procedió a la amplificación con una técnica de PCR en tiempo real múltiple Artus CMV PCR kits CE® (de Qiagen Inc., Valencia, CA, EE. UU.) en la que se amplificaron 2 dianas: una región de ADN de CMV (105 bp de una región del gen MIE) y un control interno. Finalmente, se realizó la detección con sondas específicas tipo *molecular beacons*. El termociclador usado fue Smartcycler® (de Cepheid® Sunnyvale, California, EE. UU.).

Según las especificaciones del fabricante esta técnica permite la detección de material genético por encima de 42,5 copias/ml en sangre total.

El estudio de estas muestras no supuso para los pacientes ninguna visita ni ningún procedimiento extraordinario, únicamente la firma del consentimiento informado por parte de los tutores legales para poder disponer de las muestras.

Para la realización de la carga viral en sangre se usaron 110 µl de sangre total. La PCR en sangre total se hizo igual que en la sangre del talón, exceptuando la extracción, para la cual se usó la técnica automatizada NucliSENS easyMag® (bioMérieux, Marcy l'Etoile Francia).

Estudio estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con el programa IBM SPSS Statistics 20 para Mac. Para comparar la distribución no normal de variables continuas respecto a una variable dicotómica se ha usado el test de Mann-Whitney, útil en muestras pequeñas. Para correlacionar 2 variables dicotómicas se ha usado el test exacto de

Tabla 1
Características demográficas y epidemiológicas de los pacientes

Paciente	Sexo	Seroconversión materna durante la gestación	Motivo de realización del cribado	Edad al diagnóstico (días)	Síntomas al nacimiento	CMV en orina	Carga viral CMV sangre (copias/ml)	Alteraciones durante el seguimiento	PCR en la muestra del talón
1	Femenino	ND	RCIU	5	RCIU	Pos	499	No	Negativa
2	Masculino	1. ^{er} trimestre	Seroconversión materna	1	No	Pos	Neg	No	Negativa
3	Masculino	3. ^{er} trimestre	Seroconversión materna	6	No	Pos	3.006	No	Negativa
4	Masculino	3. ^{er} trimestre	Seroconversión materna	1	No	Pos	760	No	Negativa
5	Masculino	ND	RCIU	5	RCIU	Pos	Neg	No	Negativa
6	Masculino	ND	Hijo de madre infectada por VIH	1	No	Pos	Neg	No	Negativa
7	Femenino	ND	RCIU	3	RCIU	Pos	Neg	Hipoacusia	Negativa
8	Femenino	2. ^o trimestre	Seroconversión materna	2	No	Pos	2.017	No	Positiva
9	Masculino	2-3. ^{er} trimestre	Seroconversión materna	1	No	Pos	500	No	Positiva
10	Masculino	1. ^{er} trimestre	Seroconversión materna	1	No	Pos	20.500	Hipoacusia	Positiva
11	Masculino	ND	Hijo de madre infectada por VIH	4	No	Pos	6.390	No	Positiva
12	Masculino	ND	Prematuridad	9	No	Pos	11.420	No	Positiva
13	Masculino	ND	Olígoamnios	4	No	Pos	42.500	Hipoacusia	Positiva
14	Femenino	ND	RCIU	8	RCIU	Pos	1.800	Hipoacusia	Positiva

ND: no disponible; Neg: negativo; Pos: positivo; RCIU: retraso de crecimiento intrauterino; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Fisher, útil en muestras pequeñas. La significación estadística se ha considerado para $p < 0,05$.

Valoración por el Comité Ético de Investigación

Se obtuvo la aprobación del Comité Ético del Hospital, con resolución favorable del 29/06/2012.

Resultados

Entre enero de 2007 y septiembre de 2012 se registraron en nuestro centro un total de 21.922 nacimientos y se diagnosticaron 16 casos de infección congénita por CMV, de los cuales 5 habían nacido en otros centros. En 2 de ellos no se pudo recuperar la muestra del talón por lo que finalmente se procesaron y estudiaron 14 muestras. De los 14 casos, 8 eran de sexo masculino. La mediana de edad de los pacientes estudiados es, en el momento de realizar este estudio, de 2,8 años. La mediana de edad gestacional se sitúa en las 37 semanas. En el momento del nacimiento, 4 de los pacientes se encontraban sintomáticos, siendo la única sintomatología en todos ellos retraso de crecimiento intrauterino. A lo largo de la evolución 4 pacientes han desarrollado hipoacusia neurosensorial. Ninguno presenta deterioro grave del neurodesarrollo. Las características demográficas y epidemiológicas de los pacientes estudiados se recogen en la [tabla 1](#).

El diagnóstico molecular en la prueba del talón detectó presencia de CMV en 7 de las 14 muestras, lo cual supone una sensibilidad del test en dicho tipo de muestra del 50%.

La [tabla 2](#) recoge la relación del resultado de la PCR en la prueba del talón con las variables clínicas estudiadas. Tan solo se halló una relación estadísticamente significativa entre la negatividad de la prueba y cargas virales más bajas al nacimiento.

Discusión

A pesar de considerarse la infección congénita más frecuente en los países desarrollados, en España no se realiza cribado serológico

Tabla 2

Análisis de las variables clínicas potencialmente asociadas con el resultado de la prueba

Variable	p
Años transcurridos entre el nacimiento y la realización de la PCR	0,318
Edad gestacional	1
Síntomas al nacimiento	0,559
Desarrollo de hipoacusia	0,559
Carga viral	0,005

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

En negrita, la variable estadísticamente significativa.

en la embarazada por lo que es relativamente frecuente que se obvie el diagnóstico de CMVc especialmente en el neonato asintomático, ya que a menudo las secuelas aparecen a largo plazo. Cuando se sospecha una infección congénita por CMV en un paciente que supera los 15 días de edad puede resultar difícil la conclusión diagnóstica, por lo que el análisis por PCR de la muestra de sangre seca excedente del Programa de Cribado Neonatal puede ser de extrema utilidad. Si la detección de ADN viral para CMV en esa muestra es negativa, en la actualidad deducimos que la adquisición del virus es posnatal, asumiendo una elevada sensibilidad de la técnica. A pesar de que varios trabajos europeos^{5,6} hablan de sensibilidades entre el 71 y el 100%, en nuestro trabajo únicamente obtuvimos resultado positivo en 7 de los 14 pacientes, sensibilidad claramente inferior (50%) al resto y tan solo comparable al estudio de Boppana et al. en 2010⁸ que muestra una sensibilidad del 34%. Este estudio compara la sensibilidad de 2 técnicas de PCR en sangre seca en pacientes con CMVc confirmado con la sensibilidad de la detección de antígeno en una muestra de saliva, y demuestra que la sensibilidad de la PCR en sangre seca era significativamente menor.

De todos estos trabajos puede intuirse que los resultados dependen del tipo de técnica utilizada¹⁹ y de su posibilidad de detección de diferentes umbrales de viremia, y debe conocerse cuál es la sensibilidad de la técnica propia para valorar adecuadamente los resultados obtenidos.

Además de la técnica utilizada, otra posible explicación a la negatividad de la PCR en sangre seca, como se refiere de nuevo en el trabajo de Boppana et al.⁸, es el volumen de la muestra analizada. En nuestro laboratorio se han usado 110 µl de suero para la realización de la carga viral en sangre fresca. Al usar 2 círculos del cartón de la prueba del talón estamos usando 25 µl de suero, que es una cantidad claramente inferior. Es lógico pensar, por tanto, que cargas virales más bajas en sangre sean detectadas con la PCR en sangre fresca y no con la PCR en sangre seca del talón.

En nuestro caso, 4 de los 7 pacientes en los cuales la PCR en sangre seca es negativa presentaban cargas virales negativas al nacimiento.

En un estudio de Limaye et al.²⁰ publicado en 2013 se muestra una aceptable correlación entre las cargas virales en sangre fresca y en sangre seca en papel absorbente en una población de pacientes trasplantados. Pese a ser una población muy distinta a la de nuestro trabajo, sus resultados pueden ayudar a entender los falsos negativos de nuestro estudio. En su trabajo, 26 de los 106 pares de muestras (sangre fresca/sangre seca) eran negativos en la PCR en sangre seca pero positivos en la sangre fresca (23,6% de falsos negativos). La viremia en estos pacientes era menor en esos casos, con una media de 320 copias/ml frente a la media de todas las muestras, que fue 4.060 copias/ml. Se establece un punto de corte de viremia en 2.700 copias/ml en plasma, a partir del cual la sensibilidad de la prueba en sangre seca es superior al 95%.

Estos 2 últimos puntos son de especial importancia, ya que la carga viral es un parámetro dinámico y no se correlaciona con la gravedad de las manifestaciones clínicas. Por tanto, pacientes con carga viral baja y que en nuestra prueba resultarían negativos, pueden desarrollar sordera neurosensorial progresiva. Así, en un paciente con sordera neurosensorial progresiva y PCR en la prueba del talón negativa no podemos descartar de forma definitiva que se trate de una infección congénita por CMV y deberemos valorar individualmente la indicación del tratamiento antiviral.

En nuestro estudio se ha descartado la posibilidad de que el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y la realización de la PCR desempeñe un papel en la falsa negatividad del resultado por lo que, en principio, se puede utilizar a cualquier edad del paciente. Como se ha comentado, no hemos hallado otros factores clínicos relacionados con estos falsos negativos de la prueba.

Como conclusión, parece que la determinación de presencia viral en la sangre seca de la prueba del talón es una prueba que, si resulta positiva, nos puede ayudar a diagnosticar retrospectivamente a pacientes con CMV, pero no es concluyente si es negativa, por lo que muchas veces el diagnóstico de CMV no se podrá confirmar.

Por ello, parece necesario disponer de una técnica validada y sensible para uso en los laboratorios de nuestro país, y el conocimiento de los clínicos que solicitan la prueba de la sensibilidad de la misma para interpretar correctamente los resultados.

De confirmarse estos resultados en un estudio que incluyera un número significativamente mayor de pacientes, la utilización de la muestra de sangre seca debería considerarse subóptima para realizar cribados poblacionales mediante las técnicas actuales.

Por todo ello, este trabajo abre las puertas a realizar otros estudios similares multicéntricos para la adecuada interpretación de la PCR a tiempo real en la sangre seca del talón en nuestra población.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. 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 (Barc)* 2009;71:535-47.
2. 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* 2007;17:353-63.
3. Rosenthal LS, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF, Schmid DS, et al. Cytomegalovirus shedding and delayed sensorineural hearing loss: Results from longitudinal follow-up of children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:515-20.
4. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels AG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med* 2011;364:2111-8.
5. Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. *Rev Med Virol* 2006;16:385-92.
6. Leruez-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* 2011;52:575-81.
7. 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* 2010;157:191-7.
8. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan Jr RW, Palmer AL, et al. National Institute of Deafness and Other Communication Disorders CMV and Hearing Multicenter Screening (CHIMES) Study. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 2010;303:1375-82.
9. Choi KY, Schimmenti LA, Jurek AM, Sharon B, Daly K, Khan C, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in dried blood spots of Minnesota infants who do not pass newborn hearing screening. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:1095-8.
10. 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* 2009;46:S37-42.
11. Boudewyns A, Declau F, Smets K, Ursi D, Eyskens F, van den Ende J, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: Role in the diagnostic work-up of childhood hearing loss. *Otol Neurotol* 2009;30:943-9.
12. Atkinson C, Walter S, Sharland M, Tookey P, Luck S, Peckham C, et al. Use of stored dried blood spots for retrospective diagnosis of congenital CMV. *J Med Virol* 2009;81:1394-8.
13. Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, Dubreuil P, de Saeger B, Grangeot-Keros L, 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* 2008;46:943-6.
14. Barbi M, MacKay WG, Binda S, van Loon AM. External quality assessment of cytomegalovirus DNA detection on dried blood spots. *BMC Microbiol* 2008;8:2.
15. Vauloup-Fellous C, Ducroux A, Couloigner V, Marlin S, Picone O, Galimand J, et al. Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: Retrospective study of CMV congenital infection. *J Clin Microbiol* 2007;45:3804-6.
16. Yamagishi Y, Miyagawa H, Wada K, Matsumoto S, Arahori H, Tamura A, et al. CMV DNA detection in dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection in Japan. *J Med Virol* 2006;78:923-5.
17. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V, Didò P, Guidotti P, et al. CMV genotypes and outcome of vertical transmission: Study on dried blood spots of congenitally infected babies. *J Clin Virol* 2001;21:75-9.
18. Snijderwind IJ, van Kampen JJ, Fraaij PL, van der Ende ME, Osterhaus AD, Griters RA. Current future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Res* 2012;93:309-21.
19. 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* 2010;48:278-81.
20. Limaye AP, Santo Hayes TK, Huang ML, Magaret A, Boeckh M, Jerome KR. Quantitation of cytomegalovirus DNA load in dried blood spots correlates well with plasma viral load. *J Clin Microbiol* 2013;51:2360-4.

14. ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Número codificación redicCMV

Fecha de nacimiento		
Sexo	M <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>
Fecha de realización de la prueba de cribado metabólico ¹		
¿Se registraron síntomas durante el embarazo?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Motivo de realización de la prueba que llevó al diagnóstico ² :		
Fecha de la primera carga viral en sangre		
Primera carga viral en sangre	copias/mL	
Edad al diagnóstico	Días	
Síntomas al nacimiento	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/> Especificar:
¿Se detecta hipoacusia al nacimiento?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
¿Se detecta hipoacusia durante el seguimiento?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
¿Se detectan alteraciones neurológicas al nacimiento?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
¿Se detectan alteraciones neurológicas durante el seguimiento?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
¿Recibe tratamiento el paciente?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>

¹ Día de la extracción de la prueba, no del procesado

² Por ejemplo: seroconversión materna, madre VIH positiva, síntomas al nacimiento, etc.

15. ANEXO 3. HOJA INFORMATIVA Y HOJA DECONSENTIMIENTO

INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN DE LOS PACIENTES

Sensibilidad de la técnica de PCR en la detección de ADN de CMV en la sangre seca de la prueba de cribado metabólico neonatal para el diagnóstico retrospectivo de la infección congénita por CMV en nuestro medio

El citomegalovirus (CMV) es un virus muy extendido entre la población, que en niños y adultos sanos suele producir manifestaciones banales. Si lo contrae la mujer embarazada puede transmitirlo a su hijo, el cual a su vez puede presentar síntomas o no.

Cuando el diagnóstico de infección por CMV se hace después de los primeros 15 días de vida, nos plantea la duda de si la adquisición fue durante el embarazo o postparto. Para dar respuesta a esta pregunta, y según estudios internacionales, reclamamos la sangre seca de la prueba de cribado metabólico neonatal (la prueba del talón que se realiza los primeros 3 días de vida) y buscamos si en esa sangre había presencia del virus.

La validez de esta técnica se ha comprobado en diversos estudios europeos, asiáticos y americanos, pero en ninguno en nuestro país. Nuestra intención con este estudio es validar esta técnica en España.

Para ello, se recogerá un trocito del cartón sobrante de la prueba del talón de los pacientes en los que la infección por CMV sabemos que fue intraútero, hayan resultado posteriormente asintomáticos o sintomáticos, y se comprobará la existencia del virus en esa sangre.

Según nuestros archivos su hijo es un candidato a entrar en este estudio. El hecho de recoger la muestra de la sangre seca de la prueba del talón no supone para él/ella ninguna visita más a las consultas de seguimiento habitual, ninguna extracción analítica ni ningún perjuicio. Simplemente se recogerá un trocito de su prueba del talón que se encuentra almacenada y se analizará.

Para ello, necesitamos su consentimiento para obtener esa muestra.

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad.

De acuerdo con la legislación vigente, tiene derecho a ser informado de los datos relevantes para su salud que se obtengan en el curso del estudio. Esta información se le comunicará si lo desea; en el caso de que prefiera no ser informado, su decisión se respetará.

Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con el Dr/Dra.....del servicio..... del hospital, en el número de teléfono

O contactar con los coordinadores del proyecto, la Dra Isabel Vives Oñós y el Dr Pere Soler-Palacín, de la Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria. Teléfono: 934893140

Su participación en este proyecto es voluntaria, tiene el derecho a no participar o a retirar el consentimiento una vez puesto en marcha el estudio. Si decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que necesite y la relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

Atentamente le saluda,

Isabel Vives Oñós

Pere Soler Palacín

Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria.

Hospital Vall d'Hebron. Barcelona

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
(MENORES DE 12 AÑOS DE EDAD)**

D/Dña(nombre del padre,
madre o tutor) provisto/a de DNI:

Declaro que.....como Médico especialista
en Pediatría del Hospital me comunica
las características del estudio “**Sensibilidad de la técnica de PCR en la
detección de ADN de CMV en la sangre seca de la prueba de cribado
metabólico neonatal para el diagnóstico retrospectivo de la infección
congénita por CMV en nuestro medio**” de forma detallada y
comprensible.

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

Presto libremente mi conformidad para la participación de
.....,
de quien soy representante legal en dicho estudio.

Soy consciente que la participación en este estudio es voluntaria y puedo
renunciar a la misma en el momento que yo estime adecuado, así como
que la renuncia a participar en el mismo no alterará el manejo clínico de la
enfermedad de mi hijo o representado legal.

....., de de 2014

Firma del representante legal

Firma del investigador

16. ANEXO 4. HOJA INFORMATIVA Y HOJA DE CONSENTIMIENTO

INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN DE LOS CONTROLES

Diagnóstico retrospectivo de CMV congénito a través de la sangre seca de la prueba de detección precoz

El citomegalovirus (CMV) es un virus muy extendido entre la población, que en niños y adultos sanos suele producir manifestaciones banales. Por el contrario, si lo contrae la mujer embarazada puede transmitirlo a su hijo, el cuál a su vez puede presentar síntomas o no.

Cuando el diagnóstico de infección por CMV se hace después de los primeros 15 días de vida, nos plantea la duda de si la adquisición fue durante el embarazo o postparto. Para dar respuesta a esta pregunta, y según estudios internacionales, reclamamos la sangre seca de la prueba de detección precoz (la prueba del talón que se realiza los primeros 3 días de vida) y buscamos si en esa sangre había presencia del virus.

La validez de esta técnica se ha comprobado en diversos estudios europeos, asiáticos y americanos, pero en ninguno en nuestro país. Nuestra intención con este estudio es validar esta técnica en nuestro país.

Para ello, recogeremos un trocito de la prueba del talón de los pacientes en los que la infección por CMV sabemos que fue intraútero, hayan resultado posteriormente asintomáticos o sintomáticos, y comprobaremos la existencia del virus en esa sangre.

Además, estamos recogiendo también un trocito de la prueba del talón de aquellos niños en los que se confirma que no tienen la infección, mediante determinación del virus en orina al nacimiento.

Según nuestros archivos su hijo es un candidato a entrar en este estudio, puesto que se realizó la detección del virus en orina al nacimiento y

resultó negativa, por lo tanto su hijo NO está infectado. El hecho de recoger la muestra del talón no supone para él/ella ninguna visita más a nuestro centro, ninguna extracción analítica ni ningún perjuicio. Simplemente recogeremos un trocito de su prueba del talón que se encuentra almacenada y la analizaremos.

Para ello, necesitamos su consentimiento para obtener esa muestra.

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad.

De acuerdo con la legislación vigente, tiene derecho a ser informado de los datos relevantes para su salud que se obtengan en el curso del estudio. Esta información se le comunicará si lo desea; en el caso de que prefiera no ser informado, su decisión se respetará.

Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con los investigadores responsables, la Dra. Isabel Vives Oñós, pediatra del Hospital Quirón Barcelona, en el teléfono 932554055

Su participación en este proyecto es voluntaria, tiene el derecho a no participar o a retirar el consentimiento una vez puesto en marcha el estudio. Si decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que

necesite y la relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

Atentamente le saluda,

Isabel Vives Oñós

Servicio de Pediatría.

Hospital Quirón. Barcelona

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
(MENORES DE 12 AÑOS DE EDAD)**

D/Dña (nombre del padre,
madre o tutor) provisto/a de DNI:

Declaro que:

D. Isabel Vives Oñós, como Médico especialista en Pediatría del Hospital Quirón Barcelona me comunica las características del estudio **“Sensibilidad de la técnica de PCR en la detección de ADN de citomegalovirus (CMV) en la sangre seca de la prueba de cribado metabólico neonatal para el diagnóstico retrospectivo de la infección congénita por CMV en nuestro medio”**, de forma detallada y comprensible.

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

Presto libremente mi conformidad para la participación de
.....,
de quien soy representante legal en dicho estudio.

Soy consciente que la participación en este estudio es voluntaria y puedo renunciar a la misma en el momento que yo estime adecuado, así como que la renuncia a participar en el mismo no alterará el manejo clínico de la enfermedad de mi hijo o representado legal.

....., de de 2016

Firma del representante legal

Firma del investigador

17. ANEXO 5. NOMBRE DE LOS INVESTIGADORES

PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

María Gema Codina-Grau, Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Antoni Noguera-Julian, Malalties infeccioses i resposta inflamatòria sistèmica en pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; Departament de Pediatria, Universitat de Barcelona, Barcelona; CIBER de Epidemiología y Salud Pública (Ciberesp).

Daniel Blázquez-Gamero, Sección de Enfermedades Infecciosas Pediátricas, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Claudia Fortuny, Malalties infeccioses i resposta inflamatòria sistèmica en pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; Departament de Pediatria, Universitat de Barcelona, Barcelona; CIBER de Epidemiología y Salud Pública (Ciberesp).

Fernando Baquero-Artigao, Servicio de Pediatría Hospitalaria y Enfermedades Infecciosas y Tropicales Pediátricas, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Marie Antoinette Frick, Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Jesús Saavedra-Lozano, Sección de Infectología Pediátrica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Walter Goycochea-Valdivia, Servicio de Pediatría Hospitalaria y Enfermedades Infecciosas y Tropicales Pediátricas, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

María Teresa Rives-Ferreiro, Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos y Área Neonatal, Servicio de Pediatría, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona.

Abián Montesdeoca-Melián, Centro de Salud de Guanarteme, Colaborador en Unidad de Enfermedades Infecciosas, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas.

Olga Calavia-Garsaball, Servicio de Pediatría, Hospital Joan XIII, Tarragona, Spain

Laura Ferreras-Antolin, Unidad de Enfermedades Infecciosas e Inmunología Pediátrica, Hospital Carlos Haya, Málaga.

José Luís Marín-Soria, Programa de Cribado Neonatal de Cataluña, Sección Errores Congénitos del Metabolismo, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona.

Elena Dulín-Íñiguez, Laboratorio de Cribado Neonatal de la Comunidad de Madrid, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.