

Raquel Pinillos Pisón

Estudio retrospectivo de infección  
congénita por citomegalovirus en  
encefalopatías de causa no  
establecida e hipoacusias

Departamento  
Pediatría, Radiología y Medicina Física

Director/es  
López Pisón, Javier  
Samper Villagrasa, María Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

1542

Tesis Doctoral

**ESTUDIO RETROSPECTIVO DE  
INFECCIÓN CONGÉNITA POR  
CITOMEGALOVIRUS EN  
ENCEFALOPATÍAS DE CAUSA NO  
ESTABLECIDA E HIPOACUSIAS**

Autor

**Raquel Pinillos Pisón**

Director/es

López Pisón, Javier  
Samper Villagrasa, María Pilar

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Pediatría, Radiología y Medicina Física

2016





**Universidad  
Zaragoza**

***ESTUDIO RETROSPECTIVO DE  
INFECCIÓN CONGÉNITA POR  
CITOMEGALOVIRUS EN  
ENCEFALOPATÍAS DE CAUSA NO  
ESTABLECIDA E HIPOACUSIAS***

TESIS DOCTORAL

RAQUEL PINILLOS PISÓN

NOVIEMBRE 2015

Don Javier López Pisón y Doña María Pilar Samper Villagrasa, Profesores del Departamento de Pediatría, Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN

que Doña Raquel Pinillos Pisón, Licenciada en Medicina y Cirugía y especialista en Pediatría, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Pediatría, Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza el trabajo **“ESTUDIO RETROSPECTIVO DE INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS EN ENCEFALOPATÍAS DE CAUSA NO ESTABLECIDA E HIPOACUSIAS”**, que se recoge en este proyecto y memoria para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste de acuerdo con la legislación vigente, firman este certificado

Zaragoza, a 13 de noviembre de 2015.



Fdo. Dr. Javier López Pisón



Fdo: Mª Pilar Samper Villagrasa

*“Yo hago lo que tú no puedes, y tú haces lo que yo no puedo.*

*Juntos podemos hacer grandes cosas”*

*Madre Teresa de Calcuta.*

## *Agradecimientos,*

Sólo pensar en escribir esto y me emociono...no sé si voy a ser capaz...tengo tanto de por qué dar las gracias que no se cómo empezar...

En primer lugar a mi maravillosa familia, gracias, gracias y más gracias, por hacer que cada día me despierte ilusionada, por hacer que cada día sea mejor que el anterior, por hacer que cada día haya anécdotas a recordar, por hacer que cada día os quiera más, por estar ahí siempre que lo necesito, simplemente por ser como sois...A ti, Elisa, Javier, Clara y Lucía, Nacho, Virginia, Casandra y Adriana, Sergio, Ester, Javi y Carlos, Carmen, Mariola, Carlos, Mariolita y Damián, Carmen, Alfonso, Julia y Alfonsito, Ana Rosa, Pablo y Gabriel, María José, Toño y Juan...espero no dejarme a nadie...

A mis padres, los más maravillosos que uno pueda imaginar, siempre ahí, siempre la palabra adecuada, el ánimo y el empuje suficientes y siempre dispuestos a ayudar sin pedir nada a cambio, no hay amor más grande...

A mis hijos, muchas gracias porque dais sentido a mi existencia, porque sois lo más bonito que me ha pasado, por esa alegría, fuerza y vida que me transmitís cada día, porque siempre sacáis de mí una sonrisa sincera...porque esto no sería nada sin vosotros. Una pequeña disculpa os tengo que pedir por los ratitos que habéis renunciado a mamá serenamente, ese ha sido vuestro regalo...

A ti, Chema, la verdad es que no tengo palabras, muchas gracias por haber ejercido como el mejor papá del mundo durante este tiempo. Esa ayuda incansable, esa fortaleza y seriedad que te caracteriza y que tanto bien me hace en muchos momentos. Eres la luz de mi vida, como dice esa canción, no te apagues nunca por favor porque yo te necesito siempre.

A Alicia y Javier por su inestimable ayuda desinteresada.

A mis amigos, especial mención a mis dos Marías del alma...vuestra amistad para mí es un auténtico tesoro que espero conservar siempre. Gracias por vuestros ánimos y vuestros consejos.

A mis compañeros, por su apoyo en estos momentos, por su mano abierta cuando la necesito, por esa energía y buen hacer que os caracteriza.

A Ana y a Pilar, porque esto no habría sido posible sin ellas, por estar siempre dispuestas, por su paciencia y tranquilidad, por el trabajo bien hecho.

A Javier, porque tuvo el acierto de presentarme a “Don Citomegalovirus” hacia el año 2004, generando en mí una pasión de la que ya no me he podido desenganchar...por su ímpetu de trabajo, por su forma de ser, por sus ganas de mejorar que me supo transmitir y que luego siempre intento aplicar.

A Pilar, mi directora de tesis, paciente y tranquila pero incansable a la vez, perfeccionista, trabajadora.....en fin, todo cualidades, muchas gracias.

A todos los niños que forman parte de este estudio y a sus familias, por su generosidad conmigo y con la ciencia.

Al Servicio de pediatría del Hospital Infantil Universitario Miguel Servet de Zaragoza, a tantos excelentes profesionales que han contribuido en mi formación y que me hacen crecer como persona y como pediatra cada día.

*A mis padres*

## *Índice abreviaturas*

<b>CIR:</b>	Crecimiento intrauterino restringido
<b>CMV:</b>	Citomegalovirus
<b>CMVc:</b>	Citomegalovirus congénito
<b>DNA:</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>EEG:</b>	Electroencefalograma
<b>FRAXA:</b>	Estudio genético del síndrome de X-Frágil
<b>IgG:</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM:</b>	Inmunoglobulina M
<b>LCR:</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>mL:</b>	mililitro
<b>OEA:</b>	Otoemisiones acústicas
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEAT:</b>	Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral
<b>RMC:</b>	Resonancia magnética craneal
<b>RPM:</b>	Retraso psicomotor
<b>s.E.G:</b>	Semanas de edad gestacional
<b>TAC:</b>	Tomografía axial computerizada
<b>TEA:</b>	Trastorno del espectro autista
<b>VVLL:</b>	ventrículos laterales

# ÍNDICE

## ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
1.1. INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS.....	16
1.1.1. Citomegalovirus. Propiedades.....	16
1.1.2. Epidemiología. ....	16
1.1.3. Manifestaciones clínicas. ....	18
1.1.4. Hipoacusia como secuela de la infección congénita .....	20
1.1.5. Diagnóstico de la infección congénita en periodo neonatal.....	22
1.1.6. Factores pronósticos .....	23
1.1.7. Tratamiento.....	25
1.2. DIAGNOSTICO RETROSPECTIVO DE LA INFECCIÓN CONGENITA POR CITOMEGALOVIRUS.....	27
1.2.1. Justificación de la necesidad de un diagnóstico retrospectivo .....	27
1.2.2. Técnica de detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal.....	28
1.2.2.1. Muestra de sangre seca del papel de filtro. ....	28
a) Extracción y uso de la muestra de sangre seca del papel de filtro.....	28
b) Papel de filtro.....	28
c) Conservación de la muestra de sangre seca de papel de filtro.....	29
d) Influencia del paso del tiempo en la capacidad de extracción de DNA de CMV en la muestra de sangre seca. ....	30
e) Posibilidad de contaminación de la muestra.....	31
1.2.2.2. Técnica de detección de DNA de citomegalovirus sobre la muestra de sangre seca del papel de filtro. ....	31
a) Origen y usos de la técnica.....	31
b) Historia de la técnica. Sensibilidad y Especificidad de distintos protocolos. .....	32

c) Otros factores que pueden afectar a la sensibilidad de la técnica .....	39
e) Influencia de la carga viral y sintomatología al nacimiento en la capacidad de detección de la técnica. ....	40
g) Aplicación de la técnica en pacientes asintomáticos al nacimiento con secuelas posteriores. ....	43
1.2.3.    Otras alternativas para diagnóstico retrospectivo .....	45
1.2.3.1.    Orina seca en papel de filtro .....	45
1.2.3.2.    Cordón umbilical.....	46
1.3.    INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS Y DISCAPACIDAD INTELECTUAL.....	46
1.3.1. Repercusión neurológica de la infección congénita por citomegalovirus.....	46
1.3.2. Neuroimagen y pronóstico en la infección congénita por citomegalovirus. .	48
1.3.3. Encefalopatía prenatal e infección congénita por citomegalovirus.....	51
1.4.    INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS E HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL. ....	53
1.4.1. Hipoacusia neurosensorial. Generalidades. Definición y clasificación. ....	53
1.4.2. Etiología de la hipoacusia neurosensorial .....	54
1.4.3. Infección congénita por citomegalovirus e hipoacusia .....	58
1.4.3.1.    Prevalencia y características de la hipoacusia asociada a infección congénita. 58	
1.4.3.2.    Patogenia de la hipoacusia asociada a la infección congénita por citomegalovirus. ....	62
1.4.3.3. Prevalencia de la infección congénita por citomegalovirus en la hipoacusia neurosensorial.....	64
1.4.3.4. Identificación del citomegalovirus como causa de hipoacusia neurosensorial. ....	67
1.4.3.5. Integración de la detección del citomegalovirus en el cribado auditivo. 68	
1.5.    CRIBADO UNIVERSAL DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS.....	70
1.6.    PREVENCIÓN DE INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS...73	

<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>80</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>82</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	82
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	82
<b>5. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>84</b>
5.1. MATERIAL.....	84
5.1.1. Población a estudio. ....	84
5.1.1.1 Criterios de inclusión .....	84
5.1.1.2. Criterios de exclusión .....	86
5.1.2. Muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal.....	86
5.1.3. Tecnología empleada. ....	88
5.2. MÉTODO. ....	89
5.2.1. Recuperación de los papeles de filtro del cribado neonatal. ....	89
5.2.2. Detección de DNA de citomegalovirus en la muestra de sangre seca del cribado neonatal.....	90
5.2.2.1. Protocolo aplicado.....	90
5.2.2.2. Técnica de detección con el aparato COBAS AMPLIPREP/COBAS TAQ MAN para citomegalovirus.....	91
5.2.2. Controles internos de calidad.....	94
5.2.2.4. Protocolo previsto ante detecciones positivas.....	95
5.2.3. Variables a estudio. ....	95
5.2.3.1. Variables recogidas en el grupo de pacientes afectos de infección congénita por citomegalovirus. ....	95
5.2.3.2. Variables recogidas en el grupo de controles positivos y negativos para valoración de la propia técnica.....	96
5.2.3.3. Variables recogidas en el grupo de pacientes afectos de encefalopatía de etiología no establecida e hipoacusia. ....	96
5.2.4. Análisis estadístico.....	98

<b>6. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....</b>	<b>100</b>
<b>7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....</b>	<b>103</b>
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>107</b>
8.1. RESULTADOS EN EL GRUPO DE PACIENTES AFECTOS DE INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS. ....	107
8.2 EVALUACION DE LA TECNICA DE DETECCION DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN LA MUESTRA DE SANGRE SECA DEL CRIBADO NEONATAL. ....	112
8.2.1. Infección congénita por citomegalovirus y detección de citomegalovirus en el papel de filtro de la prueba del talón. ....	112
8.2.2. Valoración de la sensibilidad/especificidad de nuestra propia técnica. ....	113
8.2.2.1. Controles positivos. ....	113
8.2.2.2. Controles negativos. ....	114
8.2.3. Relación del resultado de la detección con la carga viral al nacimiento.....	114
8.2.4. Relación del resultado de la detección con el tiempo transcurrido desde la extracción. ....	118
8.3 DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN ENCEFALOPATIAS PRENATALES DE CAUSA NO ESTABLECIDA .....	123
8.3.1 Flujo de pacientes afectos de encefalopatía prenatal. Proceso de recuperación de muestras. ....	123
8.3.2. Características de la población a estudio. ....	125
8.3.3. Resultados de la detección de DNA de CMV en el grupo de las encefalopatías de etiología no establecida. ....	137
8.4. DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN EL GRUPO DE PACIENTES AFECTOS DE HIPOACUSIA. ....	139
8.4.1. Flujo de pacientes afectos de hipoacusia.....	139
8.4.2. Características de la población a estudio. ....	141
8.4.3. Detección de DNA de CMV en el grupo de pacientes hipoacúsicos.....	148
8.4.4. Clasificación y aproximación etiológica del grupo de pacientes con hipoacusia. ....	150
8.4.4.1. Clasificación en función de gravedad y lateralidad .....	150

8.4.4.2. Aproximación etiológica de los pacientes con hipoacusia. ....	153
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>157</b>
9.1. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS A PARTIR DE LA MUESTRA DE SANGRE SECA DEL CRIBADO NEONATAL.....	157
9.1.1. Infección congénita por citomegalovirus. Generalidades. Prevalencia de la infección congénita en nuestro medio. ....	157
9.1.2. El diagnóstico de infección congénita por citomegalovirus y la técnica de detección de DNA de Citomegalovirus hasta la actualidad. ....	160
9.1.3. Evaluación de la técnica de detección de DNA de Citomegalovirus en la muestra de sangre seca del talón. ....	163
9.1.3.1. Valoración de la sensibilidad de la técnica.....	163
9.1.3.2. Valoración de la especificidad de la técnica.....	165
9.1.3.3. Factores que influyen en la sensibilidad de la técnica. ....	168
a) Influencia de la carga viral en la capacidad de detección de la técnica.....	168
b) Influencia del tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra de sangre seca y su análisis en la capacidad de detección de la técnica.....	170
c) Influencia de otros factores en la sensibilidad de la técnica.....	172
9.1.3.4. Metodología utilizada. ....	176
9.2. DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN ENCEFALOPATÍAS PRENATALES DE CAUSA NO ESTABLECIDA. ....	180
9.3. DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN EL GRUPO DE PACIENTES CON HIPOACUSIA.....	184
9.3.1. Falso positivo.....	184
9.3.2. Prevalencia de CMV en la hipoacusia. ....	186
9.3.3. Clasificación y aproximación etiológica de los pacientes con hipoacusia....	191
9.4. PROPUESTA DE UN ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS. ....	196
9.4.1. Propuesta de un algoritmo diagnóstico en la infección congénita por citomegalovirus en periodo neonatal.....	196

9.4.2. Propuesta de algoritmo diagnóstico en recién nacidos prematuros menores de 32 semanas de gestación y/o 1500 gramos de peso al nacimiento. ....	199
9.4.3. Algoritmo de diagnóstico retrospectivo de infección congénita por citomegalovirus. ....	201
9.4.4. Propuesta de algoritmo diagnóstico en hipoacusia. ....	204
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>208</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>211</b>
<b>Anexo 1. Anexo I, Documento de Cesión de Muestras.....</b>	<b>238</b>
<b>Anexo 2. dictamen favorable del comité de Ética (Anexo II).....</b>	<b>240</b>

# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN.

---

### 1.1. INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS

#### 1.1.1. Citomegalovirus. Propiedades.

El CMV es un DNA-virus perteneciente a la familia de los Herpes virus, ubicado en el ambiente. Tiene propiedades estructurales específicas incluyendo un DNA lineal de doble hélice, una cápside viral de simetría icosaédrica y una envoltura del virus.

Son características al igual que en otros virus herpes sus propiedades biológicas de latencia y reactivación. Durante periodos de latencia son detectables bajos niveles de replicación y el genoma viral puede estar presente en las células mononucleares de sangre periférica y en la médula ósea. Las infecciones recurrentes pueden ocurrir mediante la reactivación de las cepas endógenas del huésped o mediante reinfección por nuevas cepas. Pueden incluso coexistir distintas cepas en un mismo huésped.

El citomegalovirus tiene una replicación lenta, tardando días o semanas en producir el típico efecto citopático. Sin embargo muestras de orina o saliva de recién nacidos con infección congénita, con elevada carga viral, manifiestan múltiples focos de efecto citopático en pocos días de incubación mientras que muestras con baja carga viral pueden requerir entre una y tres semanas para manifestar el típico efecto citopático del virus.

#### 1.1.2. Epidemiología.

El citomegalovirus (CMV) es la infección viral congénita más frecuente, con una prevalencia del 0,4-2,3% (1). Las tasas varían en función de la seroprevalencia y son más altas en Estados Unidos (1,4% en Washington (2), 1,3% en Alabama (3) y menores en Europa, donde se sitúa entre el 0,3 y 0,6% (4-7). Se estima una prevalencia media de

0,58% en países desarrollados (0,41-0,79) (8) y entre un 1y 6% en países en vías de desarrollo (9) debido a mayor seroprevalencia en madres y por tanto mayor riesgo de exposición, infección y reactivación. Constituye aproximadamente el 60% de las infecciones congénitas y la principal causa de deficiencia neurosensorial adquirida intraútero.

La seroprevalencia en mujeres embarazadas varía de un 35 a un 95% según la literatura en distintas poblaciones (10,11). Las principales sociedades científicas no recomiendan la realización de cribado serológico sistemático durante el embarazo debido a la ausencia de vacuna efectiva, escasa evidencia de eficacia de medidas preventivas y terapéuticas, dificultad para diagnosticar una reactivación y a la posibilidad de infecciones congénitas sintomáticas en hijos de mujeres inmunes (12).

En España se ha publicado una seroprevalencia global del 62,8% en mujeres. Las tasas de seroprevalencia han disminuido en los últimos años lo que podría conducir a un aumento del número de infecciones congénitas en el futuro (13). En España, con más de 490.000 nacimientos anuales y con una prevalencia global estimada del 0,5%, el CMV afectaría a 2.450 recién nacidos cada año (12). En nuestro hospital con una media en los últimos 5 años de 4347 partos anuales y considerando la misma prevalencia tendríamos unos 21 casos anuales de infección congénita por citomegalovirus.

La infección puede ser secundaria a la primoinfección materna o a una recurrencia de ésta, produciéndose la afectación fetal más frecuente secundariamente a la primera. Se acepta que la primoinfección materna tiene consecuencias más graves en cuanto a la tasa de transmisión vertical, gravedad del cuadro clínico y secuelas a largo plazo, siendo más graves los defectos fetales cuando la infección ocurre durante la primera mitad del embarazo. No obstante, la reactivación o reinfección es también causa de enfermedad sintomática o secuelas en una décima parte de los casos (8).La posibilidad de transmisión es mayor en el tercer trimestre (14,15).

En cuanto a la tasa de transmisión madre-hijo, la primoinfección ocurre en un 1-4% de las mujeres seronegativas durante el embarazo (16) y conlleva un riesgo de

transmisión de un 24-75% (promedio de 40%) (17). La reactivación ocurre en un 10-30% embarazos, siendo el riesgo de transmisión mucho menor de un 1-3% (16). Casos de transmisión debido a reactivación han sido referidos en un 1-22% del total. Sin embargo, cada vez hay mayor evidencia sobre que la evolución de una infección congénita secundaria a reactivación puede ser sintomática y severa (18,19).

### **1.1.3. Manifestaciones clínicas.**

La infección cursa con un amplio espectro de manifestaciones, variando desde la infección asintomática hasta un síndrome congénito muy grave. Sólo el 10% de los niños infectados están sintomáticos en periodo neonatal (16). Las petequias, hepatoesplenomegalia, ictericia y microcefalia constituyen el cuadro más frecuente. Son menos frecuentes la prematuridad, retraso de crecimiento intraútero, coriorretinitis y calcificaciones cerebrales. En torno a dos terceras parte de los sintomáticos tendrán afectación del sistema nervioso central incluyendo microcefalia, convulsiones, anomalías en la exploración neurológica, dificultades en la alimentación, hipotonía, letargia, hiperproteíorraquia, hipoacusia neurosensorial y coriorretinitis\_(20).

Se ha comunicado que la infección es presuntamente sintomática al nacimiento entre un 11 (21) y un 12,7 % de los casos (4), con un 13,5% de secuelas en los casos asintomáticos (4), lo que supone una prevalencia de enfermedad entre los recién nacidos infectados de un 24,5% a un 26,2%. Con estos datos y con un prevalencia estimada de la infección en España del 0,5% de los 2450 infectados anuales la prevalencia de enfermedad sería de entre 600 y 641 niños anuales. En nuestro hospital siguiendo el mismo proceso con una media de 4347 partos anuales y 21,7 infectados al año habría entre 2,3 y 2,6 niños que presentarían síntomas al nacimiento y entre 19,1 y 19,4 que estarían asintomáticos al nacer. Pero de estos últimos aproximadamente 2,5 al año presentarían secuelas tardías. Globalmente sólo en nuestro hospital por tanto tendrían enfermedad por la infección congénita 5 niños al año.

No obstante datos recientes indican que hallazgos clínicos sugestivos de infección congénita se objetivaron hasta en un 58% de los casos supuestamente “asintomáticos” detectados mediante cribado después de un estudio completo (22).

Aunque es conocido que la probabilidad de secuelas neurosensoriales es mayor en caso de que la infección sea sintomática en el periodo neonatal, en general, entre un 10-20% de los afectados exhibirán daño neurológico en el seguimiento posterior, cifra que se eleva hasta un 60% en el caso de recién nacidos sintomáticos (1,7,23). Dollard en el 2007 refiere una incidencia de secuelas entre el 40 y 58%, probablemente algo inferior por ser identificados los casos mediante cribado y no incluir sólo a los muy sintomáticos en periodo neonatal (4).

También Mackenzie en el 2014 refiere una sobre estimación de las secuelas en los sintomáticos en la mayor parte de estudios previos, al incluir como tales solamente los niños muy sintomáticos con alta sospecha clínica en periodo neonatal. Estudia 178 niños detectados mediante cribado y casi el 60% tuvieron algún síntoma-signo de la infección congénita tras un estudio exhaustivo. Así, los divide en dos grupos, muy sintomáticos donde la sospecha clínica fue clara y poco sintomáticos que hubieran pasado desapercibidos sino se hubiera hecho cribado universal. Los muy sintomáticos efectivamente tuvieron secuelas en el 72%, pero los poco sintomáticos el porcentaje fue significativamente inferior, de un 49% (22).

La infección congénita por CMV es causa de múltiples anomalías que envuelven al sistema nervioso central, como discapacidad intelectual, trastorno del espectro autista (TEA), trastornos del aprendizaje, parálisis cerebral, epilepsia, déficit visual y auditivo. Un daño severo puede ser fácilmente identificable en periodo neonatal pero con relativa frecuencia es sutil clínicamente o puede permanecer silente durante las primeras etapas del desarrollo (20).

Los hallazgos neuroradiológicos incluyen lesiones multifocales o difusas fundamentalmente en la sustancia blanca profunda (más acusadas en regiones parietales), ventriculomegalia, calcificaciones intracraneales, atrofia cerebral y

encefalopatía destructiva con o sin anormalidades en las circunvoluciones. La presencia de anomalías en la parte anterior del lóbulo temporal, incluidos los quistes subcorticales, es especialmente sugestiva, incrementando la probabilidad de que la infección por CMV esté presente.

La incidencia de coriorretinitis varía de un 15 a un 30% en recién nacidos sintomáticos y es rara su progresión posnatal. Por el contrario, la afectación visual en pacientes sin clínica en periodo neonatal es inusual (24,25).

#### **1.1.4. Hipoacusia como secuela de la infección congénita**

La hipoacusia que es la secuela neurosensorial más frecuente está presente en el 10-15% de todas las infecciones congénitas por citomegalovirus y hasta en un 30-65% de los casos si la infección fue sintomática en periodo neonatal. Dollard la sitúa en un 10%, de todas las infecciones congénitas (4), Mackenzie en el 55% de los pacientes sintomáticos y en el 36% de aquellos poco sintomáticos que hubieran pasado desapercibidos si no hubiera habido un cribado (22) y Goderis en un 12,6% global y en un tercio de los sintomáticos y una décima parte de los asintomáticos (8).

Globalmente es bilateral en dos tercios de los niños. En caso de sintomáticos es mayoritariamente bilateral mientras que en asintomáticos al nacimiento es más frecuente unilateral pero en todos ellos es habitualmente severa o profunda (8).

Yamamoto relaciona la gravedad de la sordera con la uni o bilateralidad, de forma que en 10 pacientes con hipoacusia relacionada con CMV de los 5 en los que fue bilateral fue profunda en el 80% y en los 5 con hipoacusia unilateral fue en todos moderada o severa (26).

Varios estudios la han comunicado sobre todo para altas frecuencias (27-29) y puede ser fluctuante y progresar durante la infancia en un 30-80% (23), de forma que hasta en la mitad de los casos es de establecimiento tardío durante los primeros 6 años

de vida (27,30). Así, la pérdida auditiva sólo es detectable en el 30-50% de los casos durante el primer mes de vida. De forma global, entre un 35-65% de los casos sintomáticos (en los que suele ser más precoz y más grave) y un 7-15 % de los asintomáticos acabarán desarrollando hipoacusia, habiéndose comunicado una media de edad al establecimiento de hasta 44 meses (2,23,28).

Por todo lo anterior se refiere que un programa de cribado neonatal de hipoacusia podría detectar menos de la mitad de los casos de sordera causados por la infección congénita. Los pacientes con cargas virales más altas en sangre y orina parecen tener mayor riesgo de desarrollar hipoacusia neuro-sensorial, independientemente de si son sintomáticos o no (31,32), aunque como se explicará más adelante esto ha sido motivo de controversia.

### 1.1.5. Diagnóstico de la infección congénita en periodo neonatal.

El diagnóstico de infección congénita en periodo neonatal depende del aislamiento del virus en orina, detección del DNA viral en sangre, orina, saliva o líquido cefalorraquídeo o/y detección de anticuerpos inmunoglobulina M en suero durante las 3 primeras semanas de vida.

El cultivo viral se ha considerado tradicionalmente como el estándar. El cultivo convencional es muy poco utilizado porque los resultados pueden demorarse 2 semanas (12). El cultivo de orina en “shell vial” era el método diagnóstico más utilizado por su rapidez (24h) y alta especificidad. Sin embargo, la sensibilidad es algo más baja (94%). El cultivo viral, de excelente sensibilidad y especificidad, ha ido quedando desplazado en la mayoría de las unidades por los métodos de amplificación molecular del DNA viral mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desde que fueran descritos hacia 1985, dada su elevada sensibilidad y especificidad, con un resultado muy precoz, habitualmente en menos de 48 horas (12). Demler y Warren (33,34) objetivaron un 93%- 100% y 89%-95% de sensibilidad y especificidad respectivamente.

La PCR en orina en muchos centros se considera hoy en día la técnica de referencia por la elevada carga viral que muestran los pacientes en orina y por tanto su alta sensibilidad (31,35–37). La sensibilidad es superior a la de la PCR en sangre porque la carga viral en sangre puede ser baja en pacientes asintomáticos o poco sintomáticos. La PCR en líquido cefalorraquídeo (LCR) tiene una sensibilidad más baja y no debe ser la única herramienta en el diagnóstico (12,38,39).

La PCR en saliva ha mostrado una sensibilidad y especificidad similar a la orina. La colección de la muestra es muy sencilla pero es algo más susceptible de error en la muestra por inadecuada cantidad y excepcionalmente pueden existir falsos positivos por contaminación de la saliva con restos de leche materna en la boca (40–42).

También es diagnóstica la detección de antigenemia o de anticuerpos tipo inmunoglobulina M (IgM) frente al CMV, aunque la sensibilidad es inferior habiéndose

comunicado entre el 30–40% y el 70%, respectivamente y su negatividad no invalida el diagnóstico. Además, la IgM puede tener falsos positivos, por lo que siempre debe confirmarse mediante cultivo o PCR. Por ello las serologías no están indicadas en el diagnóstico de rutina de la infección congénita. La presencia de inmunoglobulina G (IgG) puede reflejar únicamente la transferencia pasiva de anticuerpos maternos pero su ausencia prácticamente descarta la infección (31,36).

### 1.1.6. Factores pronósticos

Son varios los factores que se han intentado asociar a peor pronóstico tras la infección congénita por CMV y por tanto entre otras cosas con mayor riesgo de hipoacusia.

- a) Infección primaria versus reinfección o reactivación. Los datos son controvertidos según se ha descrito previamente pero se acepta que los recién nacidos infectados como resultado de una primoinfección tienen más probabilidad de enfermedad sintomática en periodo neonatal y de secuelas posteriores. Sin embargo el riesgo de hipoacusia parece ser similar en ambos grupos (8,27,43).
- b) Periodo del embarazo en el que se produjo la infección. Las secuelas son más severas cuanto antes sea transmitida la infección, sobre todo en el primer trimestre, relacionándose el tiempo en el que se produjo con anomalías concretas en la neuroimagen (44,45).
- c) Presencia de síntomas en periodo neonatal. La enfermedad sintomática se asocia a mayor probabilidad de discapacidad intelectual e hipoacusia, siendo un fuerte predictor de la misma (26). Globalmente hay secuelas entre un 40 y 60% en los sintomáticos (1,7,23) y un 13,5% en los asintomáticos (4).

Goderis sitúa la hipoacusia en un tercio de los sintomáticos y una décima parte de los asintomáticos (8), de forma que en los sintomáticos es mayoritariamente

bilateral y en los asintomáticos bilateral, pero en ambos severa y profunda. La hipoacusia ocurre con la misma frecuencia independientemente de si hay afectación de sistema nervioso central o no y está especialmente ligada a la presencia de petequias, retraso de crecimiento intrauterino y petequias (46). Aunque en el estudio de Mackenzie en el 2014 las petequias de forma aislada no se asociaron a mayor riesgo de sordera (22).

- d) Carga viral al nacimiento. Ha sido objeto de numerosas publicaciones, también con resultados muy dispares. Puesto que según varios estudios la carga viral es mayor en sintomáticos que asintomáticos como hemos descrito previamente teóricamente dicho parámetro podría identificar los de mayor riesgo de secuelas (32,38). Según Lanari una carga viral inferior a 1000 copias tiene un valor predictivo de ausencia de secuelas del 95%, mientras que si es superior a 10.000 copias la probabilidad de secuelas es del 70% (31).

Dos estudios relacionan una carga viral más alta en sangre u orina con mayor probabilidad de hipoacusia independientemente de si son sintomáticos o no, concretamente Boppana relaciona la hipoacusia con una carga viral al nacimiento superior a 10000 copias independientemente de que fuera asintomático (31,32).

Sin embargo un estudio reciente del año 2009 mide la carga viral en 13 pacientes afectados de CMV congénito y no demuestra mayor incidencia de sordera a mayor carga viral pero si la carga viral es inferior a 3500 copias el valor predictivo negativo de ausencia de sordera es del 95%, concluyendo que el valor predictivo de una carga viral alta para hipoacusia es bajo pero una baja carga viral predice bajo riesgo de sordera (47). Paradowska en el 2014 relaciona en 42 recién nacidos con infección congénita una alta carga viral en orina con la sordera (48).

- e) La microcefalia y las anomalías en la neuroimagen. Son en conjunto los factores que implican un peor pronóstico cognitivo (49–51). En las infecciones asintomáticas en periodo neonatal las alteraciones de la neuroimagen son menos frecuentes y más leves, de ahí su mejor pronóstico.

- f) Genotipo de CMV. Otro factor que teóricamente podría influir es el genotipo del CMV aunque los resultados son dispares y no se pueden extraer claras conclusiones de momento. De Vries et al demuestran en 41 niños que es posible en el 80% de los casos el genotipado desde la muestra del sangre seca del papel de filtro de la prueba del talón directamente, aunque sin conclusiones claras. Utiliza 9 microlitros de sangre seca objetivando que es un método rápido y sensible. Parece que hay una limitada asociación del gN4 con secuelas a largo plazo (52,53).

En el año 2013 en un estudio sobre 42 pacientes (54) se objetiva que los serotipos más prevalentes son el gN3b, gN4b y gN4c, sin diferencia entre infección congénita y posnatal, con alta frecuencia de infección por varios serotipos sin que sea predictiva de sordera y sin clara correlación entre carga viral y genotipo. Se discrimina el genotipo gN2 o gN4 como relacionado con manifestaciones más importantes y el gN3b y gN1 como las cepas menos patogénicas. También se relaciona el gN4 con afectación neurológica (54).

Posteriormente en el 2014 el mismo autor correlaciona el genotipo H con la sordera, planteando la posibilidad de que el genotipo H1 se relacione con la sordera y el genotipo H2 pudiera jugar un papel protector (48). Por tanto el genotipado puede ser útil en los próximos años para examinar la patogenicidad de las distintas cepas y valorar su capacidad pronóstica.

### **1.1.7. Tratamiento**

En cuanto al tratamiento, el ganciclovir iniciado antes del mes de vida durante 6 semanas en niños sintomáticos con afectación del sistema nervioso central ha demostrado disminuir la discapacidad intelectual al año y prevenir el desarrollo o la progresión de la hipoacusia (55).

Amir et al en el 2010 demuestran que el tratamiento prolongado con valganciclovir oral también es eficaz (56). Posteriormente un ensayo clínico compara el tratamiento prolongado con el valganciclovir oral hasta 6 meses con el tratamiento oral durante 6 semanas y muestra que el tratamiento prolongado durante 6 meses es superior para mantener y mejorar la audición, el lenguaje y la comunicación a los 2 años (57).

Aunque no hay suficiente evidencia, existen ya algunos datos que apuntan a que el tratamiento incluso puede prevenir la sordera en niños asintomáticos o mejorarla en aquellos en los que es el único síntoma, motivo que puede hacer que se termine implantando definitivamente un cribado universal de la infección congénita (58).

En el caso de los asintomáticos el instaurar un tratamiento es algo muy controvertido porque en principio el 82% no tendrá ninguna secuela (4) pero esto se debe sopesar con el beneficio potencial de prevenir una potencial pérdida auditiva severa y un potencial retraso psicomotor. Para alcanzar el ratio de 10 niños tratados por cada 1 beneficiado el tratamiento debería tener una eficacia en asintomáticos del 70% basándose en la historia natural descrita por Fowler (28).

También empieza a existir cierta evidencia del inicio del tratamiento pasado el periodo neonatal. En el año 2014 Amir et al muestran por primera vez que el tratamiento de niños con sordera de establecimiento tardío con una media de 7 meses al diagnóstico durante 12 semanas (6 de ganciclovir intravenoso y 6 de valganciclovir oral) seguido de una dosis diaria hasta el año o durante 9 meses es eficaz, de forma que en el 60% de los casos mejoró la sordera y ninguno acabó necesitando implante coclear (59). Del mismo modo Núñez-Ramos et al en el 2013 habían comunicado el tratamiento con valganciclovir oral en 4 niños con hipoacusia iniciado a una media de edad de 8,5 meses con una duración media de 4 meses, mejorando 7 de los 8 oídos aunque acabaron necesitando implante coclear el 50% (60).

## **1.2. DIAGNOSTICO RETROSPECTIVO DE LA INFECCIÓN CONGENITA POR CITOMEGALOVIRUS**

### **1.2.1. Justificación de la necesidad de un diagnóstico retrospectivo**

Ante la falta de un cribado rutinario de la infección congénita en el recién nacido, algunas infecciones poco sintomáticas y la inmensa mayoría de las asintomáticas pasan desapercibidas al nacimiento. El porcentaje de secuelas en los niños con infección asintomática es bajo, de alrededor del 13%. Sin embargo, debido a que la infección congénita es mayoritariamente asintomática, dos terceras partes del total de las secuelas se producen en niños sin síntomas al nacimiento (4). En los niños con infección sintomática no diagnosticada, las secuelas de la infección son mucho más evidentes. Estos niños habitualmente se diagnostican de enfermedades neurodegenerativas de peor pronóstico, como leucodistrofias o leucoencefalopatías (61–63).

Pasado el periodo de las primeras 3 semanas ninguno de los procedimientos diagnósticos anteriores permite diferenciar infección congénita de adquirida. En las últimas dos décadas se ha ido estableciendo el papel de la detección de ADN del virus en la muestra de sangre seca de papel de filtro procedente del cribado neonatal realizado para despistaje endocrino-metabólico, proponiéndose como método ideal y único de certeza para un diagnóstico retrospectivo. Así, se trata de una infección, que aún siendo actualmente la infección congénita más frecuente permanece infradiagnosticada puesto que no presenta síntomas en periodo neonatal en porcentaje elevado y no se disponía hasta hace unos años de una herramienta diagnóstica de certeza pasadas las primeras 3 semanas de vida. La detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal supone por tanto la única posibilidad de diagnóstico retrospectivo.

## **1.2.2. Técnica de detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal.**

### ***1.2.2.1. Muestra de sangre seca del papel de filtro.***

#### **a) Extracción y uso de la muestra de sangre seca del papel de filtro.**

La muestra de sangre seca del cribado neonatal es una colección de pequeño volumen, con sólo entre 10 y 80 microlitros de sangre completa, disponible para análisis por lo que es necesario métodos de detección sensibles. Dicha muestra se extrae en la primera semana de vida para el cribado neonatal de metabolopatías y se almacena posteriormente en cada comunidad autónoma durante periodos prolongados de tiempo, habitualmente entre uno y cinco años. Su aporte más significativo, en relación al diagnóstico virológico convencional, es la posibilidad de diferenciar si la infección es congénita o perinatal a una edad en que los análisis de la virología clásica no lo logran.

Estas muestras de cribado neonatal almacenado por corto o largo periodo de tiempo representan un recurso basado en la población que está infrautilizado para diagnóstico retrospectivo de exposiciones a infecciones prenatales y otras exposiciones maternas (64–66). Todo lo anterior convierte a las colecciones de muestras de sangre seca procedente del cribado neonatal en potentes armas de investigación futura, debiendo estar reguladas idealmente.

#### **b) Papel de filtro**

La muestra de sangre seca se almacena en papel de filtro. Actualmente solo hay dos tipos de papel de filtro aprobados como dispositivos médicos de clase II, el Whatman 903 y Ahlstrom 226 (ahora Perkin Elmer 226). Recientemente, además de

comprobar su capacidad para retener la sangre, los dos tipos de papel aprobados han demostrado ser virtualmente idénticos en cuanto a sus prestaciones analíticas (67).

Con los niveles de calidad alcanzados, Mei y colaboradores señalan que: "podría afirmarse que el papel de filtro, como dispositivo de recogida de sangre, ha logrado el mismo nivel de precisión y reproducibilidad que tanto los investigadores como analistas clínicos han de esperar de otros métodos de recogida de sangre, como tubos de vacío y pipetas capilares, y, como estos dispositivos, el papel de filtro tiene asociado un nivel de imprecisión que debe ser caracterizado para estandarizar y minimizar las variaciones en las medidas debidas a la matriz del papel de filtro" (68).

#### c) Conservación de la muestra de sangre seca de papel de filtro.

La conservación de la muestra de papel de filtro ha sido tradicionalmente a temperatura ambiente dada la supuesta estabilidad del DNA, habiéndose obtenido resultados positivos hasta 18 años después (69).

Estudios posteriores sugieren además la importante influencia de las condiciones de almacenamiento de las muestras de sangre seca a la hora de interpretar los resultados, afectando estas a la capacidad de extraer, recuperar y medir de forma segura distintos biomarcadores de forma que si están almacenadas bajo condiciones controladas el DNA podría ser extraído y amplificado durante 25 años (70).

Mei en el año 2011 propone como condiciones ideales para el almacenamiento el que la muestra se conserve a  $-20^{\circ}\text{C}$ , con desecante y expuestos a menos de un 30% de humedad (70). A pesar de dichas recomendaciones la realidad es que el tiempo y las condiciones de almacenamiento son muy variables entre distintos centros y países. En la mitad de los estados de Estados Unidos conservan la muestra al menos 6 meses, existiendo en el otro extremo al menos 14 programas que las conservan durante 21 años (65). En Francia la conservación varía entre 6 meses y 3 años según los distintos centros (71) y sin embargo en los Países Bajos se conservan durante 6 años pero de forma centralizada en el Instituto Nacional de Salud Pública y Medioambiental (72). En varios

hospitales españoles esto ha cambiado en los últimos años, habiéndose aumentado el tiempo de almacenamiento a cinco años en lugar de uno como se venía haciendo hasta el 2011 en el Hospital Doce de Octubre de Madrid por ejemplo (60). En nuestro hospital se amplió dicho periodo a 5 años desde el año 2009 y actualmente se guardan ya durante 6 años.

Habitualmente estas colecciones de sangre seca no forman parte de biobancos. Los biobancos son infraestructuras de apoyo a la investigación que albergan colecciones de muestras biológicas y de datos personales y clínicos bajo estricta supervisión ética y científica, y que están sometidas a los más altos criterios de calidad y garantizan el cumplimiento de la legislación vigente y el respeto de los derechos de los donantes. Las muestras son organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino. Estos constituyen una opción de conservación de muestras garantizando las mejores condiciones de las mismas.

d) Influencia del paso del tiempo en la capacidad de extracción de DNA de CMV en la muestra de sangre seca.

Scanga et al en el año 2006 demuestran que es posible el diagnóstico en muestras recogidas 20 meses antes (73) y Soetens et al en el año 2008 refieren muestras positivas tras casi 11 años (74).

En el año 2009 se comprueban casos de CMV detectable en la prueba del talón en niños de hasta 17 años de edad y el porcentaje de detección por grupos de edad no parecía declinar en edades mayores. Sin embargo, Atkinson et al en dos preparados con sangre CMV positiva obtuvieron un decremento progresivo de la carga viral conforme pasaba el tiempo hasta los 2 años, sobre todo a partir de los 18 meses, pero siempre fue detectable, a pesar de que la carga viral inoculada fue moderadamente baja (15000-10000 copias/ml). Aunque si se hiciera regresión lineal esto podría significar que la carga viral sería indetectable a los 28 meses, no parece ocurrir en vivo porque no podría ocurrir que niños de 17 años fueran positivos a menos que la carga viral al nacimiento fuera superior a  $10^8$ , siendo que la carga viral excepcionalmente es superior a  $10^6$ . Es

decir, que es posible que después de una fase inicial de declinar permanezca estable a cargas bajas durante largos periodos de tiempo (75). Recientemente, otro autor también refiere una disminución progresiva de la carga viral con el paso del tiempo (76).

e) Posibilidad de contaminación de la muestra.

La posibilidad de contaminación de la muestra no se ha confirmado por distintos grupos (7). En un estudio en el año 2009 se introdujeron 3 controles negativos en contacto con 3 positivos y fueron testados repetidamente mensualmente durante dos años sin existir contaminación (75).

### ***1.2.2.2. Técnica de detección de DNA de citomegalovirus sobre la muestra de sangre seca del papel de filtro.***

a) Origen y usos de la técnica

La descripción de la técnica de detección de DNA de CMV mediante amplificación molecular por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a finales de año 85 permitió que posteriormente en 1994 se aplicara a la muestra de sangre seca del papel de filtro cribado neonatal. Fue Shibata et al quienes lo publican por primera vez en muestras de sangre seca del papel de filtro de 11 recién nacidos en comparación con el aislamiento viral (77), simplificándose el método posteriormente y confirmándose en sucesivos estudios.

Como hemos visto la reacción en cadena de la polimerasa en la prueba del talón inicialmente fue propuesta como un método de diagnóstico retrospectivo y ha sido utilizada posteriormente como tal en numerosas ocasiones (1,61,69,73,78–81), pero también ha sido usada como método de cribado en distintos trabajos (7) que serán comentados más adelante.

b) Historia de la técnica. Sensibilidad y Especificidad de distintos protocolos.

Repasando la historia de los trabajos publicados en relación a esta técnica, a continuación se muestra un breve resumen. Los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad los obtuvieron Barbi et al en el año 2006. En series de 500 y 900 neonatos mostró una sensibilidad y especificidad del 100-99% al compararlo con el cultivo de orina, de la misma forma, en casos sintomáticos que asintomáticos (7).

Una sensibilidad discretamente inferior habían objetivado previamente Johansson et al (que aplicaban esta técnica en niños de 12-18 años) (69) y Yamamoto et al, aunque manteniendo la especificidad en torno al 100% (79). Esta menor sensibilidad a la comunicada también por Shibata argumenta que puede deberse a una inhibición de la técnica de PCR con el paso del tiempo.

Barbi et al demostraron en otro trabajo casi paralelo en el tiempo, una sensibilidad del 71–100% y una especificidad del 99–100% comparada con el cultivo de orina (82). Un estudio de prevalencia en Portugal en el que usaban el protocolo modificado de Barbi mostró una sensibilidad y especificidad del 93-100% respectivamente (83). En contraste a lo anterior, el análisis prospectivo y de gran tamaño muestral llevado a cabo por Boppana et al muestra que aunque mantiene una excelente especificidad, cercana al 100%, la sensibilidad de la determinación fue de un 34%, muy lejos de lo publicado hasta entonces. Estos hallazgos parecen no corresponderse a un método de cribado inferior al utilizado previamente, sino que sugieren que no todos los niños con infección congénita por CMV permanecen virémicos al nacimiento (84).

Han sido publicados un número variable de protocolos en la literatura (73,79,81,85,86), algunos ya nombrados previamente, que refirieren variables sensibilidades in vitro dependiendo fundamentalmente del método de extracción.

Comparando la sensibilidad de la detección de ADN de CMV en la prueba del talón referida por cuatro grandes series se ha visto que varía entre un 34 y 100% (74,75,80,84). La verificación entre los estudios es problemática (87), por lo que

inicialmente se deben contrastar las principales características de estas cuatro series.

1. Primera serie. La primera fue la de Barbi et al en el año 2000 que obtuvo una sensibilidad del 81,9-100% y una especificidad del 92,2-99,7%. Se diseñó de forma retrospectiva, incluyendo a 509 pacientes, con una seroprevalencia en ese país en la gestante en torno al 79%. El criterio de inclusión utilizado fue o la presencia de síntomas compatibles o primoinfección materna. Hubo 72 neonatos con infección confirmada, se usaron 3 discos de 9 mm de la muestra de sangre seca de la prueba del talón y la extracción fue mediante shock templado (80).
2. Segunda serie. Soetens et al en el año 2008 se obtuvo una sensibilidad del 73-83%. La seroprevalencia comunicada en esa población fue de en torno al 50%. En este caso también el diseño fue retrospectivo, pero se llevó a cabo con la finalidad de cribado universal sin seleccionar pacientes y fueron 55 los neonatos con infección confirmada. Se utilizó toda la muestra de sangre seca (10 mm) de la prueba del talón, la extracción fue con fenol-cloroformo (83% sensibilidad) y EasyMag (biomerieux) (74).
3. Tercera serie. Posteriormente Atkinson et al en el 2009 presentan una nueva serie, también de diseño retrospectivo que incluyó 70 neonatos con infección ya confirmada por CMV. Utilizan la mitad de la muestra (5mm), el kit comercial QiaAmp DNA Blood miniKit (Qiagen) y obtienen una sensibilidad del 72-74% (75).
4. Cuarta serie. En el año 2010 Boppana (84) presenta unos resultados dispares. Se analizan de forma prospectiva 20448 neonatos en una población con alta seroprevalencia estimada (en torno al 70%) a modo de cribado universal y se objetivan 92 neonatos con infección congénita confirmada. Se utilizan dos discos (6milímetros) y la extracción se lleva a cabo con el Kit Qiagen M48 (Qiagen), obteniendo una baja sensibilidad de entre 28-34%, aunque con una especificidad del 99,9%.

En el año 2008 Barbi et al llevaron a cabo un examen externo de calidad en la detección de ADN mediante PCR en la prueba del talón. Participaron 27 laboratorios,

28 mediante una PCR en tiempo real y 5 con PCR convencional. Obtuvieron un resultado positivo correcto en 91% de los casos en aquellas muestras cuya carga viral superaba los  $8,8 \cdot 10^4$  copias/ml y un 59% y un 12% con cargas virales de  $9,4 \cdot 10^3$  y  $7,3 \cdot 10^3$  copias/ml respectivamente. Así el estudio reveló un límite muy pobre de detección ( $8,8 \cdot 10^4$  copias/ml), lo que estableció una urgente necesidad de mejorar los distintos métodos de detección a partir de la muestra de sangre seca del papel de filtro, incluyendo la optimización de la utilización del mínimo tamaño de muestra para una detección exitosa.

Como causa más probable de falsos positivos (9% de laboratorios y 11% de los datos) se identifica la pérdida de adherencia a las estrictas medidas de seguridad cuyo objetivo es evitar la posibilidad de contaminación y transferencia (88). No hay estándares internacionales disponibles y se ha demostrado que la amplificación del ácido nucleico por métodos como la PCR varía considerablemente entre laboratorios. La influencia del método de extracción y del área utilizada de la muestra de sangre seca podrían explicar los resultados discordantes del primer ensayo clínico europeo sobre la detección de DNA de CMV en la prueba del talón en el rango de carga viral baja. Como puntos críticos Barbi concluye el método de elución y extracción, la cantidad de papel manchado, las características individuales de los test de PCR y el criterio para considerar la positividad.

La evaluación de distintos métodos de extracción y amplificación realizada por De Vries et al en el año 2009 mostró claramente que algunos métodos reportan mayor sensibilidad variando del 32 al 73% (86). De Vries compara un panel de métodos de extracción de DNA desde la prueba del talón disponibles actualmente (73,79,80,85,89) apuntando de entrada que es difícil la comparación por diferencias entre los estudios en relación con origen y volumen de las muestras. Las variables potenciales que influyen la sensibilidad son el origen de la muestra, la cantidad de volumen de sangre seca, el volumen de elución y el método de amplificación.

Como ejemplos aportados en este estudio, con el QuiAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) se ha referido una sensibilidad del 95% con una carga viral de  $3,6 \log_{10}$

copias/ml en un experimento con sangre diluida de un paciente trasplantado (85), mientras que con una modificación del anterior se ha conseguido una sensibilidad del 100% en la prueba del talón de 7 neonatos con CMV congénito de los que sólo 3 eran sintomáticos (73). Como ya se ha referido anteriormente Soetens et al reporta una sensibilidad del 73% de la extracción con Nuclisens Easy Mag cuando testan 53 pruebas del talón de neonatos con infección congénita (de los que sólo 2 fueron sintomáticos) (74).

Considerando la extracción de DNA con medidas de “shock templado”, Yamamoto aporta una sensibilidad del 71,4% en combinación con una n-PCR convencional cuando testan la prueba del talón de 7 neonatos infectados (de los que 5 fueron sintomáticos) (79). El radio de sensibilidad mayor usando este modo de “shock templado” fue obtenido por Barbi et al cuyo método tuvo una sensibilidad del 100% cuando testaron 72 neonatos infectados (26 sintomáticos) usando una muestra de 3 mm testada en triplicado (89).

En el estudio de De Vries del 2009 la potencial influencia de diferencias fue excluida por usar idénticas muestras clínicas de pacientes trasplantados conteniendo DNA extra e intracelular, idénticos volúmenes de entrada y salida e idénticos métodos de amplificación para todas las muestras testadas. La muestra fue pequeña y el poder del estudio no permitió detectar otras diferencias significativas (86). El protocolo que resultó más sensible de los comparados en este estudio fue el descrito por Barbi y colaboradores, modificado y no modificado, el QiAamp DNA Investigator kit, el BioRobot Universal System y el Magna Pure LC. Para todos ellos la mayor sensibilidad fue alcanzada cuando fueron testadas en triplicado.

El protocolo triplicado de Barbi resultó en una sensibilidad del 100-86-50% con cargas virales de 5-4, 4-3, 3-2 log<sub>10</sub> copias/ml. Considerando coste-eficacia el protocolo de Barbi tiene la ventaja de menor coste (menos de 0,30 euros por muestra frente a otros de 7 a 15 euros por muestra).

Göhring et al en el año 2010 estudian y comparan los resultados en cuanto a

sensibilidad, combinando distintos métodos de extracción y técnicas de PCR (90). Ya Soetens en el 2008 mostró que la combinación de Easy Mag DNA extracción con un protocolo de PCR convencional mostró sólo una sensibilidad del 45% (74). Atkinson combinando la extracción con el kit comercial de Qiagen y una PCR a tiempo real (Taq Man), haciendo diluciones seriadas para cuantificación y analizando todas las muestras por triplicado obtuvo una sensibilidad del 72-74%. Añade además que usando la extracción semiautomática EayMag (biomerieux System 2007) se ha demostrado el beneficio añadido de menor tiempo (75). En este trabajo el punto de corte para la detección positiva fue de 1500 copias/ml de sangre completa, una comparación que resulta favorable con el estudio de calidad externo de Barbi en el 2008 donde el 50% de los laboratorios obtuvieron como valor límite 9300 copias/ml (88).

En el ensayo de Göhring la combinación más sensible consistió en una PCR convencional usando “primers” de la región 1E1E4 y extracción con fenolcloroformo usando parches de 1\*6-3\*3 de sangre seca o el QIAmp blood DNA Minikit con la totalidad de la muestra de sangre seca. Usando una PCR a tiempo real con hibridación en prueba la mayor sensibilidad resultó de la extracción con fenolcloroformo y el QIAmp Blood Mini Kit usando la totalidad de la muestra. El peor resultado lo obtuvieron NucliSense Easy Mag y la extracción templada, que fueron ineficientes (las muestras de extracción templada frecuentemente fueron hemolíticas lo que podría explicar la pérdida de sensibilidad en el Light Cycler System debido a efectos inhibitorios de la sangre contaminada). Así concluyen que si se tiene en cuenta que la carga viral media en sangre de cordón publicada por Halwach fue de 2300 copias /ml(70), la mejor combinación de extracción y amplificación puede consistir en extracción con fenolcloroformo o QIAamp Blood Mini Kit en combinación con una n-PCR convencional usando al menos una tarjeta completa de sangre seca.

Esto conlleva fuertes implicaciones de cara al diagnóstico retrospectivo ya que la vasta mayoría de los neonatos infectados son asintomáticos con cargas virales bajas al nacimiento y sólo serían detectados por la combinación óptima. Para el diagnóstico de rutina el QIAmp Blood Mini Kit podría ser buena solución sensible y viable (90). Soetens et al en el 2008 confirman también estos resultados (74). Es sorprendente que el

método de extracción templada descrito por Shibatta y modificado por Barbi no fuera eficaz. Estos resultados conflictivos podrían ser explicados por el protocolo modificado publicado por De Vries en el 2009, donde las muestras fueron inicialmente incubadas a 4°C durante una noche antes de la incubación a 55°C (86). En este estudio se crea un modelo logístico que ayuda a identificar el mínimo número de copias de DNA necesarias para detectar CMV de distintas áreas de muestra mediante distintas combinaciones de métodos con una probabilidad del 99%.

También se han descrito las ventajas adicionales de la PCR a tiempo real sobre la n-PCR convencional como son el menor riesgo de contaminación, mayor facilidad de implementación y un menor coste. El primer estudio que muestra una amplificación con PCR a tiempo real fue el de Scanga et al en el año 2006, donde se validan los métodos de amplificación a tiempo real en lugar de la PCR convencional con el fin de disminuir el tiempo empleado, mejorar el tiempo de carga y descarga y minimizar el riesgo de contaminación. En este caso utilizan siete casos confirmados y siete controles, usando toda la muestra (10mm en lugar de 3 mm) y añaden un step con lisado adicional para aumentar el volumen recogido. En este caso la sensibilidad y especificidad fue del 100% (73). El inconveniente teórico es que la sensibilidad de esta muestra no es tan baja como la descrita en la PCR convencional (1600 copias/ml frente a 400 copias/ml) (1,80,81).

Resumiendo todo lo anterior, han sido tres los estudios comparativos entre distintos métodos con objeto de establecer que los métodos de laboratorio son una variable importante. Ya De Vries comparó distintos métodos de extracción y vio que había grandes diferencias (86,90,91).

Interesantísimo es el artículo publicado en el 2015 donde Koontz et al evalúan 6 métodos de extracción en 25 pacientes postrasplantados con viremia por CMV. Dos de los métodos son manuales basados en solución (Gentra Puregene, termal shock), dos manuales basados en columna de silica (QIAamp DNA Mini, QIAamp DNA Investigator) y 2 automatizados (M48 MagAttract Mini, QIAcube Investigator). Realiza las extracciones en triplicado seguidas por una PCR cuantitativa a tiempo real.

Obtiene que los de mayor rendimiento son el QIAamp Investigator y el termal shock y los de menor rendimiento el M48 MagAttract Mini y el QIAamp DNA mini. Concluyen que la elección del método de extracción es un factor mayor en la capacidad de detectar bajos niveles de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal y es lo que puede explicar el amplio rango de variabilidad entre estudios.

Los 2 métodos de extracción más usados en los distintos estudios han sido el QIAamp DNA Mini y el shock termal. El QIAamp DNA Mini (Qiagen Mini) ha sido utilizado en los protocolos de Leruez-Ville en el 2011, Walter en el 2008, Valoup-Fellous en el 2007 y Atkinson en el 2009 (75,78,85,92). El shock termal ha sido empleado en los protocolos de Shibata en el 1994, Barbi en el 1996, Binda en el 2004, Yamamoto en el 2001 y Kharrazi en el 2010 (77,79,93–95). El método automatizado más utilizado en estudios de cribado hasta la fecha ha sido el M48 MagAttract Mini, concretamente fue utilizado por el mayor cribado hasta la fecha, el cribado multicéntrico de audición y citomegalovirus (CHIMES) (84). Dado que es el que peor rendimiento obtuvo en esta comparativa, esto es lo que podría justificar la baja sensibilidad del mismo (91).

Gohring et al que habían llevado a cabo un estudio comparativo con anterioridad habían mostrado que el QIAgen era superior al shock termal pero no incluyo la importante preincubación que caracteriza al shock termal a 4°C una noche o a temperatura ambiente 2 horas por lo que el resultado no es tan valorable (90). De Vries et al previamente también habían comparado en pacientes con viremia natural 7 métodos de extracción de los que 4 eran coincidentes con este el estudio de Koontz y obtienen concordancia en los resultados, puesto que el QIAamp Investigator y el termal shock fueron los mejores (86).

Los métodos usados como cribado deben ser sensibles, adaptables a la automatización y coste-efectivos. Los que han mostrado mejores resultados en estos estudios comparativos son de bajo rendimiento y no adaptables a un cribado pero con modificaciones comerciales se podrían adaptar a alto rendimiento y bajo coste. El shock termal tiene la ventaja de bajo coste pero el inconveniente de que incluye un paso

de congelación durante una noche.

La detección de DNA de citomegalovirus en la muestra de sangre seca del talón como cribado está claro que es menos sensible que la PCR orina o la saliva pero hay que tener en cuenta que sólo un 15-20% de los neonatos infectados desarrollan discapacidad y estos son los niños con cargas virales más altas, con lo que se podría considerar que esta muestra también tiene una adecuada sensibilidad clínica. Además los métodos de amplificación continúan mejorando. Atkinson en el 2014 con una PCR anidada logró aumentar la sensibilidad (96).

Concluyendo la sensibilidad es mayor si se utiliza un buen método de extracción y amplificación. Pero en todo caso los resultados han de interpretarse con precaución como parte de un proceso diagnóstico y un resultado negativo no permite excluir totalmente el CMV como causa.

### c) Otros factores que pueden afectar a la sensibilidad de la técnica

La sensibilidad de la detección de DNA de CMV en la prueba del talón es mayor si la infección es secundaria a una primoinfección materna, lo que se relaciona con las características de la población a estudio ya que cuando se aplica a poblaciones de alto riesgo y no como cribado universal la sensibilidad fue alta. La sensibilidad a través de cribado también fue muy alta (82%) cuando se aplicó en un país de baja seroprevalencia (74). En esta misma publicación la sensibilidad fue mayor cuando la responsable era una primoinfección respecto a una reactivación o reinfección (82 vs 54%), lo que podría relacionarse con una supuesta carga viral más baja en el segundo caso.

Por otro lado, en el trabajo reciente e importante de Boppana (84) la determinación tuvo pobre sensibilidad (34%) y en este caso la proporción de infección tras reinfección o reactivación no se publica, pero es probable que fuera alta porque la mayoría de madres procedían de grupos étnicos con alta seroprevalencia de CMV (95).

Una amplificación duplicada o incluso triplicada es importante para alcanzar una óptima sensibilidad. La duplicación del test incrementó la sensibilidad de un 58 al 73% en el estudio de Soetens en 2008 (74,90).

Según Leurez-Ville et al, que analizan las principales razones para la discrepancia entre los resultados previos de los diferentes protocolos, el tamaño muestral es un factor importante ya que un tamaño mayor podría aumentar la sensibilidad de la muestra.

En las diferencias de sensibilidad reportadas también pueden influir la parte del genoma de CMV que es detectada y las condiciones de almacenamiento de la muestra. Sin embargo el mayor factor responsable de las discrepancias entre estudios afirmado por distintos autores son las diferencias en los métodos de extracción desde la prueba del talón (97), que son muy heterogéneos (90).

La carga viral al nacimiento constituye un factor muy importante a la hora de obtener una detección positiva o negativa, por lo que se analiza de forma individual a continuación.

e) Influencia de la carga viral y sintomatología al nacimiento en la capacidad de detección de la técnica.

Diversos ensayos han sido publicados sobre la carga viral en sangre de los neonatos infectados. Halwach-Bawman et al (98) reportaron una media de carga viral en sangre venosa de cordón de 2300 copias/ml sin encontrar diferencias entre sintomáticos y asintomáticos. En contraste con lo anterior numerosos estudios han referido niveles de DNA de CMV significativamente mayores en sintomáticos que asintomáticos (31,32,36).

Boppana (32) reporta una media de carga viral en sangre periférica de  $4 \cdot 10^5$  en 18 neonatos infectados sintomáticos, significativamente mayor que en 58 asintomáticos que presentaron  $8,2 \cdot 10^4$ . Además entre los asintomáticos los que en el seguimiento hacían pérdida auditiva tenían una carga viral mayor que aquellos que no ( $8,7 \cdot 10^5$  vs

$1,1 \cdot 10^4$ ) Los mismos resultados obtienen Lanari (31) y Revello (36), con una carga viral significativamente más alta en sintomáticos frente a sintomáticos.

Vauloup-Fellous et al refieren cargas virales significativamente mayores en neonatos sintomáticos y en aquellos con pérdida auditiva (85), resultado consistente con los de Boppana en el 2005 y Lanari donde el 90% de recién nacidos que desarrollarían pérdida auditiva tienen cargas virales al nacimiento superiores a 1000 copias/ml (31,32).

En la publicación de De Vries el 86 % de sensibilidad del protocolo de Barbi se obtuvo con 3-4 log<sub>10</sub> copias/ml lo que combinado con los resultados de Halwach conllevaría que una cantidad de casos no fueran detectados a pesar de utilizar el método más sensible disponible (86).

El estudio de calidad externa de Barbi indica que si tenemos en cuenta el dato de Halwach (carga viral media de 2300 copias/ml) menos del 50% de todos los laboratorios serían capaces de identificar recién nacidos congénitamente infectados, ya que sólo unos pocos laboratorios fueron capaces de detectar cargas de 730 copias/ml (88).

Vauloup-Fellous et al en 2007 sugieren que la cuantificación de la carga viral de la prueba del talón está infraestimada respecto a las muestras de sangre fresca, con una diferencia media de 0,73 log<sub>10</sub> genoma/copias/ml. Los valores límites de detección de DNA de CMV estuvieron en el rango referido en la literatura en su mayoría ( 2000-4000 copias/ml) (73,81) y son mucho más altos que los obtenidos usando sangre fresca (rango de 50-500 copias/ml). Esto se debe a la cantidad de sangre extraída (50 microlitros comparada con 200-500 microlitros de sangre fresca) y a que el protocolo de extracción usado es menos eficiente que con sangre fresca. En una publicación del año 2009 el punto de corte para la detección positiva fue de 1500 copias/ml de sangre completa (75), una comparación que resulta favorable con el estudio de calidad externo de Barbi en el 2008 donde el 50% de los laboratorios obtuvieron como valor límite 9300 copias/ml (88).

Sin embargo aunque la sensibilidad in vitro puede ser relativamente baja los ratios de detección clínica son en general altos en pacientes seleccionados. Además Gurtler et al en el 2014 demuestra que para una determinada carga viral (1000 copias/ml) es más sensible la sangre completa que el plasma, siendo las diferencias muy pequeñas por encima de dicha carga viral (99).

En el estudio de Leurez-ville et al en el 2011 la carga viral de los sintomáticos fue significativamente mayor con el primer protocolo (PCR a tiempo real diseñada por el propio laboratorio y amplificada en duplicado) respecto al kit comercial CMV PCR kit(Abbott) en una amplificación única (92).

También Vauloup-Fellous (85) y Walter et al en el 2008 (78) demuestran que la cuantificación de DNA a partir de la prueba del talón basada en el kit de extracción QiAmp DNA Blood Mini Kit estuvo altamente relacionada con la cuantificación hecha en sangre fresca.

Se ha descrito que puede no haber viremia en el momento del nacimiento (3), pero los datos ya expuestos sugieren que los recién nacidos virémicos al nacimiento tienen más riesgo de desarrollar síntomas neurológicos y que cargas virales más altas están asociadas con más severa pérdida auditiva (32,78). Así mismo entre los asintomáticos, los que en el seguimiento hacen pérdida auditiva tienen una carga viral mayor que aquellos que no (32). Por ello la explicación de que la prueba del talón haya resultado positiva en los casos más afectados podría justificar la detección continuada en niños mayores.

g) Aplicación de la técnica en pacientes asintomáticos al nacimiento con secuelas posteriores.

Numerosos estudios han referido asociación entre elevada carga viral al nacimiento y presencia de secuelas, concretamente los niños con hipoacusia presentan cargas virales más altas en sangre fresca (32,78,85) y una carga viral más alta en sangre fresca se ha asociado a mayor capacidad de detección de DNA de citomegalovirus en la muestra de sangre seca, por lo que una detección positiva en la prueba del talón podría tener incluso valor pronóstico.

En el año 2013 De Vries et al analizan 70 pruebas del talón en niños afectos de hipoacusia severa candidatos a implante coclear, objetivando CMV en 10, lo que supone una prevalencia de CMV en su muestra del 14%, dentro de lo esperado. Por ello concluye que la sensibilidad de la técnica es adecuada en este tipo de paciente. Utiliza el protocolo que había descrito previamente en el año 2009. Utilizó el kit QIAamp DNA MiniKit y una PCR cuantitativa a tiempo real (72).

En contraste con esto, Williams et al en el 2014 analizan 6 talones de CMV congénitos diagnosticados tras no pasar el cribado auditivo y en 4 de ellos resultó negativo a pesar de que uno de ellos tenía una pérdida auditiva profunda. Efectivamente sí que los dos talones que resultaron positivos fueron los que tuvieron una carga viral superior a  $10^4$  copias/ ml pero la carga viral en sangre al nacimiento no se relacionó con la hipoacusia posterior (100).

Tres artículos se publicaron a lo largo del año 2010 en relación a la sensibilidad de la prueba. Dos de ellos, el de Kharrazi y Pass muestran una buena sensibilidad aparente aunque conscientes de que la sensibilidad y especificidad es desconocida en ausencia de un test aplicado a una población amplia y comparativamente con el cultivo (95,101). Curiosamente mientras ambos artículos estaban bajo revisión se publica el trabajo de Boppana que muestra una sensibilidad muy inferior, concluyendo que no es un test adecuado para cribado porque se podrían perder hasta el 70% de los casos (84).

Goderis et al en el año 2014 concluyen que efectivamente la sensibilidad de la prueba varía sobre todo porque las técnicas de la PCR no están bien estandarizadas entre laboratorios, influyendo en una menor sensibilidad en la prueba del talón el que la carga viral sea menor en sangre que orina (39,47,98), que puede no haber viremia al nacimiento (3) y que el tiempo de almacenamiento podría disminuir la carga viral (102).

El problema entonces es que la prueba pierde sensibilidad en niños con cargas virales bajas al nacimiento ( $< 10^4$  copias/ ml). Por tanto, la determinación de la PCR para CMV en sangre seca debe reservarse de entrada para estudios epidemiológicos y para el diagnóstico retrospectivo de la infección, pero no debe sustituir al cultivo o a la PCR en orina como pruebas de elección en el diagnóstico del recién nacido. Pero dado que el objetivo no es diagnosticar todos los infectados (puesto que la mayoría están asintomáticos) sino los que tienen mayor riesgo de secuelas y si la detección en el talón se correlaciona con hipoacusia y retraso psicomotor, la sensibilidad global para toda la infección congénita puede tener menos importancia.

Para concluir, en relación a la sensibilidad de la técnica de detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca de la prueba del talón son muy importantes las variaciones de las cifras comunicadas a lo largo de los últimos 15 años, habiéndose referido previamente los distintos motivos que pueden llevar a ello. Hasta ahora debido a las significativas diferencias entre los distintos estudios y protocolos ha sido muy difícil establecer comparativas. Actualmente y resumiendo todo lo anterior, la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca de talón ha probado un sensibilidad superior al 95% comparado con orina y saliva cuando se aplicó a niños sintomáticos o hijos de madre con seroconversión (80,92). Sin embargo para cribado de niños no seleccionados comparados con orina o saliva ha mostrado una sensibilidad que varía entre el 20 y el 80% (69,79,84).

### 1.2.3. Otras alternativas para diagnóstico retrospectivo

En los últimos años se ha descrito la viabilidad de otras alternativas para detectar la infección congénita argumentando la insuficiente sensibilidad de la muestra de sangre seca de la prueba del talón como estrategia de cribado.

#### 1.2.3.1. *Orina seca en papel de filtro*

El uso de orina seca en papel de filtro ha sido sugerida por Nozawa (103) y Koyano (104) porque la orina habitualmente contiene cargas virales de CMV mayores que en sangre. Es probable que los métodos de extracción de la muestra de sangre seca sean aplicables a la orina.

En el año 2011 Koyano et al llevan a cabo la determinación en más de 21000 recién nacidos a modo de cribado en 6 áreas geográficas de Japón. La infección congénita por CMV fue identificada en 66 casos (0,31%), obteniendo un valor predictivo positivo del cribado del 94%. En 12 y 23 de los casos positivos realizan la determinación también en la prueba del talón y en el cordón umbilical, detectándose en 9 los 12 mediante la prueba del talón y en todos ellos mediante el cordón umbilical. La carga viral del papel de filtro resultó en acuerdo con la carga viral de la orina diluida y la de la muestra de sangre seca de la prueba del talón está en acuerdo justo también con la de una muestra de sangre fresca. Ambas cargas virales en orina fueron mayores que en sangre (104).

La implantación rutinaria de la recogida de una muestra de orina en papel de filtro al nacimiento no supondría una carga excesiva pero sí cierto trabajo añadido. Las limitaciones de estos trabajos es que no se han comparado con un “gol estándar”, por lo que no se pueden descartar falsos negativos, aunque es esperable que con las elevadas cargas virales en orina la sensibilidad aumente, siendo ésta mayor del 90%.

### **1.2.3.2. *Cordón umbilical***

Otra muestra propuesta como arma de diagnóstico retrospectivo fundamentalmente en Japón ha sido el cordón umbilical. Por prácticas culturales cuando se cae el cordón umbilical éste se preserva en casa limpio y seco como símbolo del vínculo madre-hijo durante años, mientras que la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal habitualmente es desechada en torno al año. Son varias las series que demuestran la detección de DNA de CMV en el cordón umbilical después de varios años. Ogawa (105) en el 2006 y Tagawa (106) en el 2009 objetiva un 15 y 12% de infección congénita entre pacientes afectados de hipoacusia bilateral profunda respectivamente.

## **1.3. INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS Y DISCAPACIDAD INTELECTUAL.**

### **1.3.1. Repercusión neurológica de la infección congénita por citomegalovirus.**

Toda infección congénita puede ser causa de amplia variedad de discapacidades neurológicas y concretamente la infección congénita por CMV es causa de múltiples manifestaciones en el sistema nervioso central como discapacidad intelectual, trastorno del espectro autista, trastornos del aprendizaje, hiperactividad, problemas comportamentales con pobre control de los impulsos, sensación de dolor disminuida, parálisis cerebral, epilepsia y déficit visual y auditivo.

La evolución de la infección congénita depende sobre todo del patrón de enfermedad al nacimiento y de la instauración o no del tratamiento antiviral. En numerosos estudios longitudinales, la mayoría realizados antes de que el tratamiento fuera aplicado de forma rutinaria en los sintomáticos, se han referido las siguientes secuelas tardías: sordera en el 50-58% de las ocasiones, discapacidad intelectual (cociente intelectual menor de 70) en un 47-55%, microcefalia en un 37%, estrabismo

en un 37%, enfermedad dental en un 27%, convulsiones en un 23%, déficit visual en un 22%, coriorretinitis en un 20%, parálisis cerebral en un 13-27% y muerte tras periodo neonatal en un 1,7-5,8% (22,25).

En un estudio longitudinal de 178 niños con infección sintomática seguidos durante 4,6 años el 72% tuvieron al menos una discapacidad y el 42% tuvieron múltiples secuelas a largo plazo (22). Según Kenneson et al hasta un 11% de niños con CMV desarrollan alteraciones neurológicas persistentes, sobre todo hipoacusia neurosensorial y discapacidad intelectual (21).

Un daño severo puede ser fácilmente identificable en periodo neonatal, pero con relativa frecuencia es sutil clínicamente o puede permanecer silente durante las primeras etapas del desarrollo. Son numerosos los casos aislados comunicados con retraso psicomotor que pasaron desapercibidos al nacimiento y se diagnosticaron de forma retrospectiva mediante la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca de la prueba del talón (15,60,63).

Bonsjak et al presentan 9 pacientes diagnosticados de CMV en periodo neonatal, todos afectados de retraso psicomotor (RPM) moderado y severo, 5 además con parálisis cerebral infantil y uno con una disfunción motora menor. Recalca que uno estaba aparentemente asintomático y los 8 restantes mostraban algún síntoma pero que sólo era claramente identificable en 4 de ellos (44).

Un incremento en los últimos años de ciertas patologías como el trastorno del espectro autista ha llevado a considerar la posible influencia de factores ambientales, habiéndose demostrado que la exposición intrauterina a varios patógenos ha sido asociada a alteraciones en el neurodesarrollo incluyendo dicho trastorno (107) que ha sido descrito en infecciones congénitas por citomegalovirus tanto sintomáticas (108) como asintomáticas al nacimiento (109).

De igual forma, han sido relacionados los virus neurotrópicos con la parálisis cerebral infantil, reportando una prevalencia del citomegalovirus en torno a un 0,8% de las parálisis cerebrales en Australia (110).

Koyano et al señalan en el año 2011 que hasta un 25% de los casos de discapacidad intelectual de causa desconocida están asociados con la infección y la mitad de las secuelas son de establecimiento tardío (104).

Avettand Fenoel et al sugieren que en todo niño con sordera no genética o retraso psicomotor asociado a anomalías sugestivas en la neuroimagen se busque el CMV (71). Formula un algoritmo diagnóstico donde inicialmente se solicite una serología y sólo en caso de objetivar una IgG positiva que indica contacto previo con CMV proceder a detección de CMV mediante PCR en orina hasta los 3 años y utilizar la muestra de sangre seca del papel de filtro en niños mayores de 3 años.

### **1.3.2. Neuroimagen y pronóstico en la infección congénita por citomegalovirus.**

El tiempo de adquisición de la infección intraútero está fuertemente conectado a una imagen radiológica determinada y al nivel de discapacidad. Una infección temprana entre las 16-18 semanas se ha relacionado con lisencefalia (la más precoz), entre las 18-24 semanas con polimicrogiria y paquirigia (ambas formas de displasia cortical algo menos severas que la lisencefalia) y en el tercer trimestre con un patrón de circunvoluciones anormal. Las calcificaciones y la hipoplasia cerebelosa también son el resultado de una infección precoz. Además se ha relacionado con esquisencefalia, e hipoplasia/agenesia de cuerpo calloso. La infección tardía se ha relacionado con anomalías de la sustancia blanca, incluyendo alteraciones de la mielinización (44,45). Estudios recientes relacionan la infección congénita también con septos ventriculares (111).

En la infección congénita por CMV la neuroimagen tiene un valor pronóstico importante. La ecografía se propone como arma de cribado y permite la detección de ventriculomegalia, pseudoquistes y calcificaciones fundamentalmente. Como ventaja su gran disponibilidad, pero el inconveniente es que es explorador dependiente.

Bopana y Noyola et al defienden la tomografía axial computerizada (TAC) puesto que permite ver mejor las calcificaciones cerebrales. Bopana et al afirman que las anomalías en el TAC, sobre todo calcificaciones, se asocian con un 90% de probabilidades de secuelas. Noyola et al definen la microcefalia y las calcificaciones cerebrales como mejor predictor de discapacidad intelectual. Para ambos un TAC anormal es el predictor más sensible de discapacidad intelectual y afectación motora con una sensibilidad prácticamente del 100% de tal forma que la ausencia de microcefalia, coriorretinitis y calcificaciones se asocian con un desarrollo psicomotor normal en la mayoría de las ocasiones (112,113). Como ventaja que es muy sensible para las calcificaciones y anomalías cerebrales y relativamente accesible y fácil puesto que no necesita sedación. Como inconveniente que conlleva alta radiación y que no detecta alteraciones de la sustancia blanca ni trastornos de la migración igual que la resonancia magnética (RM).

De Vries et al proponen la Resonancia Magnética Craneal (RMC) porque es superior para diagnóstico de malformaciones corticales, quistes temporales, hipoplasia cerebelosa, quistes periventriculares y para definir la forma de los ventrículos laterales (114). La ecografía se plantea como arma para cribado pero la resonancia magnética aporta datos adicionales, aunque está pendiente de terminar de definirse el papel de la misma porque sobre todo con las lesiones de la sustancia blanca aisladas hay todavía incertidumbre. Está claro que la resonancia tiene un valor diagnóstico (114), pero puede aportar pocos datos específicos hecha en periodo recién nacido, donde el problema puede ser diferenciar el retraso normal de la mielinización con alteraciones de la sustancia blanca (115).

Por ello Capretti et al formulan retrasarla a las 4 semanas de vida, hacer secuencias T1 y T2 y coger el brazo posterior de la cápsula interna como referencia de

mielinización porque es una de las estructuras que primero se mieliniza. En este momento se convierte en el mejor predictor tanto en sintomáticos como asintomáticos de déficits tardíos porque las anomalías de la sustancia blanca pueden ser el único signo y se han relacionado con retraso psicomotor moderado y sordera. Tiene alta sensibilidad y alto valor predictivo positivo para predecir un pobre neurodesarrollo. Para este autor tiene la misma sensibilidad en este sentido que el TAC, por lo que podría desplazarlo progresivamente.

En el año 2014 se analizan 40 pacientes afectados de infección congénita por CMV con ecografía y RMC al mes de vida. En 6 de ellos encuentran anomalías en ambas pruebas consistentes en pseudoquistes, calcificaciones e hipoplasia cerebelosa. La RMC aportó información adicional en cuanto a alteración de la sustancia blanca en 3 de los 6, lisencefalia/polimicrogiria en uno y en un quiste anterior del lóbulo temporal. Sin embargo, de los 3 pacientes con calcificaciones pasaron desapercibidas en la RMC en 1. De estos 6 pacientes, 4 mostraron posteriormente severa afectación psicomotora y 5 hipoacusia. Hubo otros 3 pacientes en los que la ecografía fue normal y la RM patológica por alteraciones de la sustancia blanca en 3 e hipoplasia cerebelosa en 1. De estos 3 pacientes todos tuvieron afectación importante y 2 hipoacusia. El autor concluye que la RM aportó información adicional en un 20% de los pacientes (en total 8 de 40) (116).

Duval et al en el 2014 proponen la realización de RMC a todos aquellos niños que no han pasado el cribado auditivo en los que se objetiva el CMV en saliva, orina o en la prueba del talón puesto que hasta en un 33% de los casos objetiva alteraciones a pesar de estar aparentemente asintomáticos por otra parte (117).

Discriminando en función de anomalías concretas, son fuertes predictoras de un pobre neurodesarrollo sin tener en cuenta la sordera las malformaciones corticales, la ventriculomegalia y la displasia hipocámpica. El pronóstico sin embargo es incierto con los quistes periventriculares, las anomalías de la sustancia blanca y la hipoplasia cerebelosa (118).

Nigro, De Vries y Sureka recomiendan descartar de forma retrospectiva mediante la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal en los siguientes hallazgos de la neuroimagen: trastornos de la migración, anomalías de la giración, defectos parenquimatosos, quistes periventriculares y temporales anteriores, anomalías de sustancia blanca sobre todo si es asimétrica con predominio temporoparietal, retraso de la mielinización y calcificaciones periventriculares (45,114,119).

La infección congénita por CMV fue la causa de un 3% de los casos (2) de pacientes con hiperintensidad del lóbulo temporal (45). Zucca et al en el 2003 la objetivan en 4 de cada 10 pacientes con malformaciones corticales (1).

### **1.3.3. Encefalopatía prenatal e infección congénita por citomegalovirus**

Un considerable número de pacientes controlados en las consultas de neuropediatría (incluida la nuestra) padecen encefalopatías prenatales, entendidas como producidas antes del nacimiento. Pueden ser de origen disruptivo, producidas por problemas vasculares durante el embarazo, por drogas, tóxicos o infecciones congénitas o genéticamente determinados, así como obedecer a una enfermedad metabólica. Es destacable el elevado número de pacientes sin diagnóstico etiológico, pese al elevado número de estudios realizados, que son necesarios para identificar muchos de los casos en los que sí se ha llegado determinar.

El diagnóstico etiológico de los pacientes es aquel que permite cerrar el proceso diagnóstico, valorar las posibilidades terapéuticas, establecer un pronóstico y un riesgo de repetición en la familia. Los avances en el ámbito terapéutico, de prevención y de diagnóstico prenatal se acompañan de una creciente demanda de un diagnóstico cada vez más preciso. Con frecuencia no es posible identificar este nivel diagnóstico. Las patologías muestran distintos grados de severidad, pueden estar aisladas o asociadas o ser estáticas o progresivas, siendo las repercusiones permanentes o transitorias.

Las encefalopatías prenatales pueden ser indistinguibles clínicamente y dada la inespecificidad de signos y síntomas de muchas de ellas precisan estrategias de estudios sistemáticos de forma escalonada, que deben estar en permanente actualización. Es parte de nuestro trabajo controlar niños sin diagnóstico etiológico y no es fácil encontrar un equilibrio entre hacer muchos estudios obteniendo poca rentabilidad o conformarse con la ausencia de diagnóstico.

La leucoencefalopatía de la infección congénita por CMV plantea el diagnóstico diferencial con enfermedades neurodegenerativas y la confirmación de dicha infección como causa permite asegurar el carácter no progresivo de la leucoencefalopatía, a diferencia de las de origen metabólico, obviar estudios extensos y costosos y mejorar los resultados diagnósticos en el grupo global de las leucoencefalopatías, de las que hasta un 50% pueden quedar sin diagnóstico (62,120).

Por todo lo expuesto hasta ahora y porque se conoce además que el daño cerebral puede progresar después del nacimiento y un adecuado tratamiento ofrecido a tiempo podría mejorar el neurodesarrollo, pensamos que el CMV debería considerarse con más frecuencia como causa de discapacidad intelectual.

Nos planteamos si el estudio retrospectivo debería plantearse de forma generalizada en toda encefalopatía y en toda discapacidad intelectual o como venimos haciendo hasta ahora solamente ante la presencia de gravedad y asociaciones variables de retraso de crecimiento intraútero, microcefalia, hipoacusia neurosensorial, coriorretinitis, discapacidad intelectual, problemas de conducta especialmente dentro del espectro autista, calcificaciones intracraneales, alteraciones encefaloclasticas, leucoencefalopatía, displasia cortical y malformaciones de lóbulo temporal e hipocampo (63).

## **1.4. INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS E HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL.**

### **1.4.1. Hipoacusia neurosensorial. Generalidades. Definición y clasificación.**

La hipoacusia es el daño sensitivo más frecuente de la infancia. Frecuentemente es definida y cuantificada según los umbrales de medida para tonos puros. Se calcula que la prevalencia global de la hipoacusia en la edad pediátrica, estando probablemente infraestimada, es de 3 cada 1000 recién nacidos vivos, cifra que se eleva hasta 6 por 1000 a la edad de 4 años (121). Fortum et al en el 2001 y Kennedy et al en el 2004 estimaron unas cifras algo inferiores, con una prevalencia de entre 1,2 y 1,86 por 1000 recién nacidos vivos, 2,7 por 1000 en menores de 5 años y de 3,5 por 1000 durante la adolescencia (122,123).

La hipoacusia se clasifica habitualmente en función de 4 umbrales obtenidos a 500 Hz, 1, 2, y 4 KHz para la mejor oreja. La clasificación mayoritariamente seguida es la “european Bureau International d’Audio-Phonologie (BIAP) classification” del 3 de Octubre del 2010 (<http://www.biap.org/en/recommandation/65-ct-2-classification-des-surdites/5-recommandation-biap-021-bis>). Se distribuye en 4 categorías de forma que de 21 a 40 decibelios se considera media, de 41 a 70 decibelios moderada, de 71 a 90 decibelios graves y mayor de 91 decibelios profunda. El término de sordera queda reservado para la hipoacusia profunda exclusivamente (124).

Hay 4 tipos de hipoacusia. La de conducción o transmisión por problemas en el conducto u oído medio es la más frecuente, sobre todo en países desarrollados. La neurosensorial afecta a la coclea o a las vías neurosensoriales y es fundamentalmente a la que nos referiremos a continuación. Mixta se denomina cuando incluye a las 2 anteriores. Recientemente añadida por Starr en el 2008, la cuarta categoría es la neuropatía auditiva (ANSD, auditory neuropathy spectrum disorder) que se caracteriza

por una severa distorsión del código neural primario para la dimensión temporal del sonido que lleva a problemas de comprensión no relacionados directamente con los umbrales auditivos (125).

#### **1.4.2. Etiología de la hipoacusia neurosensorial**

La etiología de la hipoacusia bilateral, a diferencia de la unilateral, está más definida, constituyendo la genética hasta el 50-60% de la hipoacusia bilateral severa y profunda. Los factores ambientales suponen por tanto el 40-50% restante (126). Furutate et al teniendo en cuenta hipoacusia uni y bilateral conjuntamente, objetivan causa genética en un porcentaje significativamente inferior, el 20% (127) y en el extremo opuesto Avettand-Fenoel et al la encuentran hasta en el 70% de los casos, considerando como probable origen familiar si existe historia de un miembro de la familia con hipoacusia antes de la edad de 40 años o consanguinidad (128).

Etiológicamente la sordera sindrómica supone aproximadamente el 30% y la no sindrómica el restante 70%.

Existen más de 400 síndromes que pueden implicar hipoacusia, entre los que se nombran por más frecuentes el síndrome de Usher asociado a retinitis pigmentaria, el de Pendred y el de Jervell y Lange-Nielsen caracterizado por prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma. Ambos tres son de herencia autosómica recesiva. Dos a mencionar por posibilidad de tratamiento si el diagnóstico es precoz son la deficiencia de biotinidasa que asocia retraso psicomotor, epilepsia e hipertonía y el síndrome de Refsum que asocia retinitis pigmentaria, neuropatía periférica y ataxia cerebelosa.

Otros también fácilmente reconocibles son el síndrome de Alport que asocia hematuria, el de Waardenburg con pigmentación anormal del iris, del pelo y piel y la secuencia CHARGE que asocia coloboma, defecto cardíaco, atresia de coanas, crecimiento retardado, hipoplasia genital y anomalías del pabellón auricular o sordera y

que ha sido recientemente redefinido tras descubrir una mutación en CHD/ en el 2004 (129).

Avettand-Fenoel et al en el 2013 analizan 85 casos de hipoacusia neurosensorial menores de tres años con estudio completo y objetivan 13 casos de origen sindrómico (15,3%): tres con síndrome de waanderburg, 6 casos de síndrome de Usher, un caso de síndrome de Angelman, 2 casos de mucopolisacaridosis y otra enfermedad metabólica (128).

En cuanto a las hipoacusias no sindrómicas hereditarias hay una gran heterogeneidad bajo el punto de vista genético, habiendo descritas más de 150 entidades, tanto autosómicas dominantes y recesivas como mitocondriales. Dentro de la sordera no sindrómica las causas hereditarias suponen hasta el 60%, siendo la más frecuente las mutaciones de la conexina 26 con un 37-50% del total según Delterene y Cryns respectivamente (130), codificada por el Gen GJB2 y que es responsable de la sordera no sindrómica autosómica recesiva. En el 2013 de un total de 85 pacientes en 61 (71,8%) se objetivó un origen genético, siendo esta por tanto la causa más frecuente con diferencia. Dentro de las causas genéticas el primer lugar lo ocuparon las mutaciones del gen GJB2 o GJB6 con 22 pacientes (25,9%). Un paciente presentó una mutación en el gen de la otoferlina (1,2%) (128). En una publicación del año 2011 las causas genéticas supusieron un 21% de la sordera bilateral, porcentaje que aumentó a un 32% en caso de la sordera severa y profunda (127).

La conexina 26 es una proteína de membrana esencial para reciclar potasio a la endolinfa en el oído interno para la estimulación celular. La más frecuente de éstas de forma aislada es la 35 delG en homocigosis. El segundo lugar con un 15% lo ocupan las mutaciones del gen SLC 26A4, relacionado con un acueducto vestibular amplio, por lo que algunos autores proponen la realización de TAC de peñascos en todas las sorderas (124).

De forma global la mayoría de las hipoacusias neurosensoriales hereditarias son enfermedades monogénicas. Más allá de las técnicas citogenéticas tradicionales y de los

síndromes basados en microdelecciones que han sido conocidos durante décadas (Williams-Beuren, Prader-Willis, Angelman, Smith-Magenis y síndrome 22q11) han emergido nuevas tecnologías de micro arrays que permiten detectar microdelecciones o microduplicaciones de menos de 50 kilobases, habiéndose descrito recientemente 58 nuevos síndromes de microdelección incluyendo en algunos de ellos hipoacusia, discapacidad intelectual y trastorno del espectro autista (131).

Las anomalías del oído interno también juegan un papel importante. En una publicación objetivan malformaciones en el hueso temporal en un 9,4% de pacientes con hipoacusia neurosensorial entre las que se incluyen agenesia coclear, malformación de Mondini y acueducto vestibular amplio (128).

La prematuridad ha sido referida como causa de hipoacusia hasta en un 7,1% de los casos, siendo factores de riesgo añadidos el distrés respiratorio y estancia prolongada en cuidados intensivos (128).

Dentro de las hipoacusias adquiridas que supondrían aproximadamente el restante 40 %, la principal causa son las infecciones TORCH, siendo el CMV la más frecuente, con hasta un 21% (124,127). El citomegalovirus es la causa más frecuente de hipoacusia neurosensorial adquirida intraútero y la segunda más frecuente de hipoacusia después de las mutaciones de las conexinas. Si se restringe a la sordera profunda el porcentaje de CMV asciende a un 15,4%, aproximándose al de la conexina (128).

Un estudio del año 2011 que incluye 134 hipoacúsicos encuentra una incidencia de CMV, en torno a un 9% tanto en la hipoacusia unilateral como en la bilateral mediante la detección de DNA de CMV en el cordón umbilical. En la sordera severa y profunda este porcentaje ascendió a un 14%. Este fue el primer estudio que asocia el CMV como causa de sordera unilateral en un grupo importante de pacientes ya que los estudios previos se habían referido fundamentalmente a casos aislados o grupos de menor tamaño muestral. Ogawa la había señalado en 1 de 4 pacientes, un 25% (105) y Barbi en 8 de 40, lo que supone un 19% (132).

Existen datos que sugieren que portadores heterocigotos de determinadas mutaciones del gen GJB2 si coexisten con la infección congénita por CMV pueden desarrollar hipoacusia, cuando dicho gen habitualmente forma parte del panel de las hipoacusias autosómicas recesivas y por tanto sólo la produce en principio si está en homocigosis (133).

Leenheer et al en el año 2011 hacen una propuesta de algoritmo etiológico en la hipoacusia y proponen la identificación tanto del CMV como de la conexina 26 desde el principio puesto que son las 2 principales causas de sordera (134).

Delterene et al establecen unos prerrequisitos antes del estudio genético entre los que incluye por orden un estudio electrofisiológico buscando neuropatía auditiva ya que tiene un mecanismo molecular específico. En segundo lugar una buena historia familiar incluyendo el origen de al menos tres generaciones y consanguinidad. Una herencia a través de línea materna y diabetes mellitus insulino dependiente podría orientar a origen mitocondrial. En tercer lugar una exhaustiva exploración física buscando rasgos fenotípicos que puedan estar asociados a determinados síndromes. En cuarto lugar propone un TAC de peñascos por la contribución al diagnóstico de CHARGE y la asociación del acueducto vestibular amplio con la mutación SLC26-A4. En quinto lugar un cribado analítico de enfermedades metabólicas especialmente de enfermedades mitocondriales si se asocia con diabetes mellitus o convulsiones. Incluye al menos lactato, aminoácidos (alanina), y ácidos orgánicos. Si hay hipertransaminasemia o defecto visual asociado se deberán incluir ácidos grasos de cadena muy larga, ácidos biliares y ácido fitánico buscando enfermedades peroxisomales. Glicosaminglicamos en orina si hay esplenomegalia, fenotipo característico, distensión abdominal o otitis media crónica buscando enfermedades lisosomales (124).

Avettand-Fenoel et al en el 2013 proponen un algoritmo diagnóstico algo diferente. Partiendo de la hipoacusia no genética determinan la IgG para CMV y sólo en caso de positividad se continua con la búsqueda del CMV mediante PCR en orina o en

la muestra de sangre seca del talón en los menores y mayores de 3 años respectivamente (128).

### **1.4.3. Infección congénita por citomegalovirus e hipoacusia**

#### ***1.4.3.1. Prevalencia y características de la hipoacusia asociada a infección congénita.***

La hipoacusia constituye la secuela permanente más frecuente de la infección congénita por CMV, con una prevalencia de entre el 22 y el 65% en caso de infección sintomática y de un 6 a un 23% en caso de recién nacidos asintomáticos.

Dollard et al la refieren en más del 50% de los casos sintomáticos y entre un 8 y 18 % de los asintomáticos (4). Más del 5% de los CMV congénitos asintomáticos presentarán pérdida auditiva antes de los 3 meses según Leenheer (134).

La hipoacusia de la infección congénita es de naturaleza inestable, con fluctuaciones y progresión y puede ser de establecimiento tardío hasta los 6 años, aunque sobre todo se produce en el primer año.

En el caso de pacientes sintomáticos es bilateral en el 71% y casi en el 80% de ellos es profunda. Globalmente en estos es bilateral y severa y profunda en el 65%. En estos niños generalmente la identificación es más precoz. Por otro lado, en los pacientes asintomáticos al nacimiento es unilateral en el 56% y severa o profunda en el 77%, de forma que el porcentaje de sordera bilateral severa o profunda desciende al 42%. En estos pacientes puede ser de establecimiento o diagnóstico más tardío por menor gravedad de la misma (8).

No obstante la gravedad y lateralidad de la hipoacusia relacionada con CMV no es patognomónica, puesto que también ocurre en las mutaciones de las conexinas y las anomalías cocleovestibulares (117).

Tradicionalmente se ha referido en sucesivas publicaciones que la hipoacusia por CMV pasa desapercibida en más de la mitad de los casos. Sin embargo, el estudio CHIMES, un cribado multicéntrico de citomegalovirus y audición en 7 países de Estados Unidos indica que los niños afectados de infección congénita pasan menos frecuentemente el cribado auditivo que los que no están infectados, concluyendo así que el cribado auditivo sí que sería capaz de detectar la mayoría de los casos en los que la hipoacusia ya esté presente al nacimiento. No se detectarían aquellos con pérdidas auditivas menores y los de establecimiento tardío (135). Es importante que Furutate en los 8 pacientes en los que objetivó CMV como causa de hipoacusia 5 habían pasado el cribado auditivo neonatal (127).

Es característico del CMV congénito que los umbrales auditivos son inestables, pero no sólo en aquellos niños que finalmente desarrollan sordera y que la mejoría de los umbrales se produce con más frecuencia en los niños que fueron asintomáticos al nacimiento. Dicha mejoría ha sido referida hasta en el 48% de los asintomáticos al nacimiento frente al 21 % de los sintomáticos, con un rango medio de mejoría de entre 15 y 31 decibelios (30).

Las fluctuaciones están presentes en el 16,2% de los casos de forma global según algunos autores (136), en el 30% de los asintomáticos al nacimiento y hasta el 50 % de aquellos en los que la infección fue sintomática según otros (137). Si son importantes, superiores a 30 decibelios es más probable que los niños acaben desarrollando hipoacusia permanente (136). Datos algo contradictorios muestra la revisión sistemática de Goderis et al en el año 2014, mostrando una fluctuación y progresión ligeramente superior en asintomáticos (24 y 20 % respectivamente en asintomáticos frente a un 21 y 18% en sintomáticos) (8).

Como hemos dicho la posibilidad de progresión caracteriza a la hipoacusia relacionada con CMV congénito, oscilando las cifras entre un 43 y un 63% (27,30,43,138). La mayor incidencia de progresión la obtuvo Williamson pero calculado sólo sobre 8 niños. Fowler refiere que tiene lugar hasta en el 50% de niños

asintomáticos al nacimiento con hipoacusia posterior, durante un periodo aproximado medio de 18 meses. Un estudio más reciente sobre 68 pacientes afectados de CMV congénito muestra un porcentaje de progresión mucho menor, en torno a un 27%, con un periodo medio de progresión también inferior de en torno a los 7 meses (136).

La progresión se produce con la misma frecuencia en sintomáticos que asintomáticos pero con mayor gravedad y grado de progresión en los primeros. Globalmente la progresión es más frecuente en los sintomáticos no tratados (55% de sintomáticos sin tratamiento versus 36% de los asintomáticos), mientras que en los asintomáticos es más probable la estabilidad según Royackers y colaboradores (139).

Publicaciones iniciales referían que el establecimiento tardío ocurría muy frecuentemente, entre el 30 y 50% de las ocasiones, con una edad media de 11 meses y de la misma forma en sintomáticos que asintomáticos (23). Datos más recientes refieren que es menos frecuente pero tampoco desdeñable, en torno a un 4,3 % en global y entre un 1,3 y un 2,9% en caso de los asintomáticos al nacimiento (136). Sin embargo, Goderis et al en el año 2014 consideran, tras una revisión sistemática que incluye 37 estudios previos que un número considerable de hipoacusias unilaterales de diagnóstico en edad escolar son por CMV y que el inicio tardío ocurre un 18% de los casos sintomáticos y un 9% en caso de los asintomáticos (8), cifras intermedias entre las anteriores.

En lo que realmente hay acuerdo en la literatura es que esta posibilidad de establecimiento tardío existe hasta los 5-6 años de vida (27,136), aunque se han comunicado casos aislados de inicio después de los 6 años (136,140). Duval comunica un caso por otra parte asintomático de establecimiento a los 9 años (117).

La sordera por CMV puede ocurrir tanto si la infección es resultado de una primoinfección como si es una reinfección o reactivación, de hecho la infección por CMV es mayoritariamente procedente de madres con inmunidad previa. Aunque las probabilidades de pérdida auditiva son menores si es secundaria a una reinfección, los

niños de madres seroinmunes no están completamente protegidos, contribuyendo significativamente a la sordera, aunque de menor severidad (137).

Además existen casos de hipoacusia profunda y bilateral tras una reactivación o reinfección. Yamamoto et al en su serie del 2011 de 10 niños con hipoacusia 6 procedían una infección no primaria y encuentra en una población de alta seroprevalencia (donde las infecciones congénitas son secundarias a reactivaciones o reinfecciones un porcentaje considerable) una frecuencia de sordera similar a la comunicada en poblaciones de baja seroprevalencia (donde son secundarias a primoinfecciones habitualmente) (26).

Fowler en el año 1992 y Foulon en el 2008 objetivan en casos de citomegalovirus congénitos producto de primoinfección materna que el 15 % desarrollaron hipoacusia, siendo el 50% severa y/o bilateral (29,141). Por otro lado en pacientes afectados de CMV congénito secundario a reinfección-reactivación, Ross et al encuentran una incidencia de hipoacusia menor, en torno a un 11%, siendo unilateral el 75% de los casos (142).

Sin embargo datos recientes contradictorios sugieren que la primoinfección y la reactivación suponen el mismo el porcentaje de infección sintomática y la misma frecuencia y la severidad de la hipoacusia (142–144).

Una revisión sistemática en el 2014 explica que cuando la hipoacusia es secundaria a una reinfección o reactivación el riesgo es similar a una infección asintomática, que frecuentemente conlleva una hipoacusia media y es menos frecuente que sea bilateral, reafirmando la menor frecuencia y severidad comunicada inicialmente (8).

### *1.4.3.2. Patogenia de la hipoacusia asociada a la infección congénita por citomegalovirus.*

A pesar de haberse descrito la sordera asociada al CMV hace aproximadamente 40 años la patogenia no está del todo clara. Se piensa que el CMV induce una laberintitis, habiéndose detectado en la perilinfa entre 1 y 19 años después del nacimiento (72,145).

De Vries et al presentan un caso asintomático al nacimiento que posteriormente desarrolla una sordera profunda objetivando en una muestra obtenida durante la colocación del implante CMV en perilinfa, lo que refuerza la hipótesis de que la sordera está asociada a replicación activa en el oído interno durante años después del nacimiento (72).

La excreción prolongada en orina durante una media de 4 años sirvió para hipotetizar que lo mismo podría ocurrir en el oído (49). Así Rosenthal objetivó que los niños que eliminaban CMV por orina durante más tiempo tenían más riesgo de establecimiento tardío de la sordera (47). Contrariamente Noyola en un pequeño estudio asocia menos tiempo de eliminación con mayor probabilidad de sordera y progresión (49). Y es que no siempre se ha demostrado correlación entre lo que ocurre en el oído interno y la carga viral sistémica (146).

El propio daño a las estructuras endolinfáticas y a la estría vascular que provoca un desbalance de potasio y una degeneración secundaria de estructuras sensoriales podría jugar un papel importante, junto al propio efecto citopático del virus en sí mismo contra las estructuras del oído interno (8).

La particular respuesta inmune puede tener mayor responsabilidad incluso, porque se ha demostrado una respuesta inflamatoria muy potente en el oído y se ha descrito una mejor evolución de la sordera en un animal inmunodeprimido (147).

Hay evidencia indirecta de que la patogenia está asociada a la replicación viral puesto que hay publicaciones que han relacionado la carga viral al nacimiento y la sordera (31,32,47,78,98,148), que es posible un establecimiento tardío junto a progresiones y fluctuaciones que podrían relacionarse con periodos de reactivación y mayor replicación viral y que existe un beneficio del tratamiento en disminuir la progresión de la sordera al disminuir o negativizar la carga viral (55).

### *1.4.3.3. Prevalencia de la infección congénita por citomegalovirus en la hipoacusia neurosensorial.*

Se estima que la infección congénita es responsable de un 15-20% de la hipoacusia neurosensorial en la infancia (132,149), siendo la principal causa de hipoacusia neurosensorial no genética, suponiendo desde un 7% según algunos autores (150) hasta un 36% (29) según otros.

Una revisión sistemática en el año 2014 concluye que el CMV supone entre el 10 y el 20% de la hipoacusia de forma que globalmente es un 10% pero si excluimos las causas conocidas alcanza el 20% (8). El CMV explica según Morton un 21% de las hipoacusias adquiridas al nacimiento y hasta un 25 % de las adquiridas hasta los 4 años (121).

Acotando a la hipoacusia neurosensorial severa y profunda Kenneson et al afirman que es causada por CMV entre un 15 y 20% (21), Karltop et al en un 20% (151), Avettand et al en un 13,7% (8 infecciones por CMV entre 59 niños afectados de hipoacusia profunda) (128) y Korver et al entre el 23 y 43% (152).

En el estudio DECIBEL en el 2008 en niños entre 3 y 5 años con hipoacusia neurosensorial mayor de 40 decibelios encuentran el CMV en un 8% (152). Posteriormente en el año 2013 los mismos investigadores analizan 70 pruebas del talón en niños que han recibido un implante coclear, objetivando la infección congénita en 10 niños, lo que supone un 14%, uno de cada 7 de niños afectados de hipoacusia profunda (72). En este caso objetiva la prevalencia esperada de CMV mediante la detección de DNA en la prueba del talón, de lo que se deduce una sensibilidad adecuada de la técnica. Para ello usa el protocolo descrito por él mismo en el 2009 (86).

Como un valor añadido de la muestra de sangre seca es posible el genotipado del CMV hasta en el 75-80% de los casos, aunque la asociación de los distintos genotipos con secuelas es controvertida.

En el 2013 se analizan las pruebas del talón de 100 niños menores de tres años afectados de hipoacusia, detectando DNA de CMV en 8 de ellos, lo que supone una prevalencia de un 8% (128), similar a la del estudio DECIBEL (Korver J Clin Virol 2009) en el 2008 y a otros grupos Europeos, Japoneses y de EEUU que estiman una prevalencia entre el 6 y el 15% (2,153–156). Se argumenta que probablemente la inclusión de sordera unilateral así como de niños de más de 3 años hubiera llevado a tasas de detección más altas por haber incluido los casos de establecimiento tardío pero en Francia sólo tienen disponibles las tarjetas del cribado neonatal durante tres años.

Agrupando la información referida previamente son por tanto diversos los estudios que han utilizado la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del talón para estimar la prevalencia de la infección congénita por CMV en pacientes con hipoacusia. Varios lo han hecho en una población en la que había fallado el cribado auditivo, encontrando una prevalencia de CMV de un 2,7% Choi, un 7,3% Boudewins y un 10,1 % Kimani (150,156,157). Otros lo han realizado sobre pacientes afectados de hipoacusia de causa desconocida, objetivando una prevalencia Barbi de 11,4% en el 2003, 22,9% Walter en el 2008, 20% Karltop en el 2012 y un 8 y 14% Avettand – Fenoel y De Vries respectivamente en el 2013 (72,78,128,132,151).

Se concluye que los factores que explican la variación de la sensibilidad entre unos estudios y otros son fundamentalmente dos. En primer lugar la sensibilidad intrínseca de la PCR sobre todo de los métodos de extracción (como ya se ha referido anteriormente), sabiendo que la extracción automatizada tiende a ser menos eficiente. En segundo lugar el tipo de población estudiado porque generalmente ha mostrado una buena sensibilidad sobre poblaciones de alto riesgo (75,92) y baja cuando ha sido utilizado como cribado a gran escala (84).

El CMV es por tanto una causa mayor de hipoacusia neurosensorial prelingual no presente al nacimiento. La sordera por CMV supone el mayor coste asociado a la infección congénita, estimado en 4 billones al año, similar al que supone la otitis media globalmente (117). A pesar de todo esto, de implicar hasta un 20% de las causas y de que la sordera por CMV tiene efectos detrimentales sobre el lenguaje, actualmente la infección congénita por CMV permanece infradiagnosticada y la sociedad americana de otorrinolaringología pediátrica en el año 2011 reconoce que el número de test con intención de detectar CMV en niños con hipoacusia por parte de los otorrinolaringólogos es muy bajo (158). Es sorprendente también que en un guía clínica de actuación de hipoacusia en el año 2013 no se hace ninguna referencia al CMV (159).

El cribado auditivo está implantado en la mayoría de los países desarrollados de alguna forma. La identificación y rehabilitación precoz de la pérdida auditiva en el recién nacido es ya un estándar aceptado y la necesidad de un protocolo etiológico está emergiendo, siendo necesario identificar la causa pero limitando el número de exploraciones dirigiéndolas a las causas más prevalentes.

Actualmente y a pesar de que esta asociación entre CMV e hipoacusia ha sido descrita hace ya 50 años, sigue siendo una de las causas principales de hipoacusia neurosensorial y más de la mitad de la hipoacusia debida a CMV se produce en niños sin ningún síntoma aparente al nacimiento (149).

El citomegalovirus es un auténtico problema de salud pública por su frecuencia y su papel en la sordera neurosensorial en niños. En Estados Unidos se estima que entre 800 y 1200 niños con síntomas por citomegalovirus y otros 1800-2700 sin síntomas en periodo neonatal tendrán una hipoacusia relacionada con CMV (137). En la Unión Europea, con una prevalencia estimada del 0,7% y con unos nacimientos anuales en torno a 5,4 millones, 37800 niños están infectados anualmente por CMV, de los que aproximadamente 6807 (el 18% de los infectados) tendrán secuelas permanentes, siendo la más frecuente la hipoacusia (160).

Aplicando la misma reflexión a nuestro país, partiendo de una prevalencia del 0,5% y calculando aproximadamente que el 50% de los sintomáticos la presenten y el 13% de los asintomáticos, de los 2450 infectados anuales presentarían hipoacusia 122 de los sintomáticos al nacimiento y 286 de los asintomáticos, globalmente 409 niños anualmente.

#### *1.4.3.4. Identificación del citomegalovirus como causa de hipoacusia neurosensorial.*

Debido a que la infección es mayoritariamente asintomática en el periodo neonatal hasta dos terceras partes del total de las secuelas se producen en niños sin síntomas al nacimiento (o con síntomas sutiles que pudieron pasar desapercibidos) (12). La hipoacusia, que es una de las secuelas neurosensoriales más frecuentes puede no detectarse tampoco en el periodo de recién nacido hasta en un 30-50% de los casos con los programas de cribado auditivo, debido a que puede ser de instauración tardía, fluctuante y progresiva (23), aunque datos recientes mencionados sugieren que este porcentaje es inferior (84).

Sería necesario objetivar factores que predigan qué pacientes de los infectados por CMV tendrán secuelas o desarrollarán pérdida auditiva y si existe en cuales será progresiva pero aparte de si es sintomático o asintomático al nacer no se han identificado claramente a día de hoy. Muy importante además es que la hipoacusia por CMV congénito puede ser progresiva hasta los 5 años de edad (18 meses como media) lo que justificaría en caso de confirmarse la infección congénita como causa de la hipoacusia la realización de potenciales auditivos bianuales o incluso trimestrales hasta los 6 años como mínimo debido a las fluctuaciones, posibilidad de progresión y posible establecimiento tardío que caracteriza a la hipoacusia producida por citomegalovirus.

Además el atribuir como responsable de la hipoacusia a la infección congénita por CMV también podría permitir el obviar otros estudios (no realizados con tanta

frecuencia en el caso de las hipoacusias), mejorar los resultados diagnósticos en este grupo, descartar probablemente un origen genético, y con ello el riesgo de repetición.

Identificar el CMV como causa supone además cerrar un proceso diagnóstico, facilitando un porqué a nuestros pequeños pacientes y su familia, puesto que todos merecen un diagnóstico adecuado. Por todo lo anterior se considera que el CMV debe ser excluido en todos los niños con sordera de causa desconocida (150) e incluso se plantea a día de hoy la posibilidad de implantar un cribado de la propia infección congénita por CMV que ya se ha explorado a modo de investigación en los últimos años.

#### ***1.4.3.5. Integración de la detección del citomegalovirus en el cribado auditivo.***

Generalmente cuando se ha venido detectando el CMV como causa de hipoacusia es demasiado tarde. En el Reino Unido el cribado auditivo implantado en el 2006 detecta pérdidas auditivas superiores o iguales a 40 dB, de forma que tras 2 otoemisiones negativas realizan potenciales evocados, alcanzando el objetivo de detectar el 90% de las hipoacusias antes de los 6 meses.

El Comité de la infancia y audición ya concluye en su argumento de posición en el año 2007 que debería descartarse el CMV en todos los cribados auditivos alterados siendo especialmente importante la concienciación a los padres de todos los niños afectados por CMV congénito del seguimiento auditivo muy frecuente. Es importante tener en cuenta que tanto en caso de sintomáticos como asintomáticos son los de mayor riesgo aquellos que presentan fluctuaciones en umbrales auditivos sobre todo mayores a 30 decibelios y persistentes después del año de vida (136).

Con el propósito de no perder oportunidades, Kadambari et al proponen en el 2013 la integración del CMV dentro del cribado auditivo mediante la detección en saliva (161). Ya Fowler en 256 niños que no pasaron el cribado objetiva 16 CMV

congénitos, lo que supone un 6,25%, teniendo en cuenta además que el 75% no presentaba ningún otro órgano afecto (27).

Yamamoto et al en el 2011 en una población de alta seroprevalencia encuentra infección congénita por CMV en un 1% de los que no pasan el cribado auditivo mediante la detección en saliva (26).

En febrero de 2013 se introdujo en la legislatura de Utah el despistaje de CMV a todos aquellos que no pasaran su cribado auditivo por segunda vez en las primeras tres semanas de vida, publicando sus resultados en *Laryngoscope* en el año 2014. Sugieren un paradigma diagnóstico secuencial en el que está incluido la detección de CMV a través de la PCR en saliva si son menores de 3 semanas o mediante la prueba del talón, asumiendo que la negatividad no excluye la infección y proponiendo entonces Resonancia Magnética en búsqueda de hallazgos típicos de la infección, puesto que hasta el 33% objetivan alteraciones en niños aparentemente asintomáticos. De 83 niños testados muestran un 30% de hipoacusia en relación con CMV (162).

Williams et al en el 2014 mediante la detección en saliva en el estudio BEST objetivan una incidencia de CMV en niños que no han pasado el cribado de sólo un 1,5% y de sordera relacionada con CMV de sólo un 0,7% (100), tasa inferior a la comunicada por otros estudios (153,157) y comunican posteriormente que el coste-beneficio es favorable (163).

Kadambari et al obtienen unos resultados similares en el 2015, ya que identifica CMV en relación con hipoacusia en 2 niños de 203 que no pasaron el cribado auditivo, obteniendo una incidencia de CMV en un 1% de los casos (164).

Teniendo en cuenta que el CMV constituye por tanto la principal causa de hipoacusia neurosensorial no genética, que es la única potencialmente tratable y que la mayoría de niños con hipoacusia en relación al CMV están “asintomáticos” al nacimiento, la inclusión del CMV en el cribado auditivo puede reducir retrasos entre

diagnóstico y tratamiento de la propia hipoacusia habiéndose demostrado que la intervención precoz mejora el lenguaje y permite ofrecer un tratamiento.

### **1.5. CRIBADO UNIVERSAL DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS.**

Dollard refiere que actualmente el cribado de la infección congénita por CMV satisfaría los criterios de Wilson-Junger (87), sobre todo en dos concepciones: posibilidad de prevención del deterioro auditivo en recién nacidos sintomáticos mediante el tratamiento, ya que se ha demostrado una eficacia del ganciclovir del 69% en este sentido (55), beneficio del tratamiento en el desarrollo neurológico incluyendo lo social, personal y motor y beneficio de la detección temprana de la hipoacusia de establecimiento tardío por medio de seguimiento audiológico a los infectados.

Esto es muy importante teniendo en cuenta que la edad media de detección de la hipoacusia según Ciorba et al son 2 años y que el retraso en la detección en los primeros tres años tiene consecuencias importantes en el lenguaje, así como que las prótesis auditivas y los implantes cocleares son más efectivos en menores de 6 meses (165).

El Colegio Americano de Genetistas estableció unos principios básicos para que una patología fuera susceptible de cribado neonatal y seleccionó 84 condiciones para considerarlo entre las que incluyó al CMV pero quedó aplazado para ser valorado por expertos (166). Entre las condiciones se encontraba que fuera una patología que pudiera ser identificada a tiempo con el cribado y no identificada por sospecha clínica, con un test de detección de apropiada sensibilidad y especificidad, que se obtuvieran beneficios de la detección precoz y que hubiera un tratamiento eficaz.

En cuanto a la muestra que sería preferible para el cribado universal, Leurez-Ville en el 2011 mediante la detección en la prueba del talón, comparada con la PCR en orina, obtuvo una sensibilidad en el caso de recién nacidos sintomáticos o hijos de madre con seroconversión durante el embarazo de hasta un 95-100%, con una especificidad del 98-

99% y un valor predictivo positivo y negativo del 94-97% y 99-100% respectivamente, proponiéndolo como arma para cribado (92). Pero esta población tiene una probabilidad pretest mucho más alta que la población general susceptible de cribado universal. Además como inconveniente se encontró una tasa de falsos positivos de entre el 1,5 y 1,9% (4 de 207 y 3 de 205).

Si el no tratar a los recién nacidos infectados siempre llevara a discapacidad o muerte y un tratamiento muy efectivo estuviera disponible una tasa alta de falsos positivos sería aceptable en un cribado universal, pero este no es el caso.

Kharrazi, para quien el cribado universal significa una oportunidad, obtiene una seroprevalencia mediante la detección del DNA de CMV en la prueba del talón a través de cribado universal similar a la esperada, de lo que se deduce una buena sensibilidad de la técnica (95).

Pero realmente sólo un estudio había aplicado la detección de CMV en el papel de filtro del cribado neonatal en una escala que se aproxima a un cribado universal, comparando el resultado con cultivo rápido de saliva y los resultados fueron decepcionantes, con una sensibilidad máxima de un 34% (84). Independientemente de las diferencias en la población estudiada la PCR casera y convencional de Leurez Ville tiene mucha más sensibilidad (92). Sin embargo, Kharrazi en el 2011 la aplica como estudio de prevalencia en 3972 recién nacidos del programa de cribado de California sin comparativa y obtiene una seroprevalencia similar a la esperada, de un 0,6 a un 0,9% (95).

En el caso del cribado universal para CMV a la utilización de la muestra de sangre seca del talón se proponen como alternativas de mayor sensibilidad la orina o saliva al nacimiento por tener cargas virales muy superiores a sangre. Boppana et al proponen la saliva, encontrando una sensibilidad y especificidad del 100 y 99,9 % si es saliva fresca y algo inferior si es seca después de impregnar el papel de filtro, un 97 y 99,9 % respectivamente. La ventaja frente a la orina es que la recogida de la saliva es muy sencilla y que no requiere extracción previa a la amplificación en el laboratorio. A

cambio de una sensibilidad significativamente superior a la sangre seca del papel de filtro, como inconveniente esto supone un gasto añadido por la toma de las muestras y el salirse de la ruta habitual del cribado neonatal complicaría las cosas (42).

Duval en el 2014 también utiliza la saliva para niños que no han pasado el cribado auditivo, obteniendo resultados esperados. Objetivan dos falsos positivos que atribuyen a probables restos de leche materna en la boca, por lo que sugieren esperar al menos 90 minutos después de una toma para la muestra (117).

También Williams en el 2014 objetiva que el cribado mediante la muestra de saliva es posible y aceptable (100).

No obstante, la implantación del cribado mediante la muestra de sangre seca de la prueba del talón tampoco sería sencilla porque actualmente se testan 29 enfermedades mediante tándem masas de forma automatizada y aunque la PCR se podría automatizar no está en la misma plataforma y supondría modificación de protocolos. En ese caso serían los ensayos clínicos que han mostrado mayor sensibilidad (Leurez Ville CID 2011) los que pudieran ser adaptados con advertencias de la especificidad.

Como inconvenientes a la implantación del cribado tan discutida en la actualidad se argumenta que no existe un test validado de alto rendimiento, que no hay protocolos estandarizados, una ansiedad parental importante cuando el 80% globalmente de los infectados están asintomáticos y sin secuelas, que a día de hoy sólo hay evidencia para el tratamiento de los sintomáticos, que se podrían diagnosticar en parte en periodo neonatal y que el tratamiento mejora la audición y el neurodesarrollo pero no previene toda la discapacidad (95,167).

Compensando a lo anterior se encuentra el que dos terceras partes de los niños que desarrollan discapacidad intelectual son asintomáticos al nacimiento y el cribado permitiría identificarlos para intervención precoz, que nos permitiría conocer la prevalencia global y la historia natural para ayudar a desarrollar una vacuna y que se

harían exámenes auditivos seriados frecuentes por el riesgo de progresión que caracteriza a la hipoacusia relacionada con CMV (117).

El que Mackenzie en el 2014 detectara algún hallazgo clínico hasta en el 58% de los niños detectados mediante cribado hace pensar que probablemente estos serían los que si no fuera por el cribado pasarían desapercibidos, con lo cual el porcentaje de niños sintomáticos al nacimiento probablemente no sería de un 10% sino superior (22).

Mientras este cribado no esté implantado es esencial por tanto disponer de una herramienta para diagnóstico retrospectivo, dada la posibilidad de lesión neurológica pese a la ausencia de síntomas en periodo neonatal. Pasado el periodo de tiempo que incluye las primeras 2/3 semanas de vida, ninguno de los otros procedimientos diagnósticos permite diferenciar infección congénita de adquirida lo que convierte a la detección de DNA en la sangre seca del talón en una poderosa arma en el diagnóstico etiológico de la hipoacusia y anomalías neurológicas.

## **1.6. PREVENCIÓN DE INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS**

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección congénita, la intervención óptima sería la prevención. Aunque el lavado de manos y evitar el contacto estrecho con enfermos y niños pequeños durante el embarazo han mostrado ser medianamente eficaces, el desarrollo de una vacuna sería prometedor para llegar a erradicarla. Algún estudio en fase I y II ha mostrado una disminución del riesgo de adquisición de primoinfección en mujeres seronegativas pero no hay evidencia de momento. Pass demostró una prevalencia de infección en el 1% de las vacunadas frente al 3% en el grupo de las no vacunadas (168).

Como obstáculo para el desarrollo de la vacuna se encuentra el que se necesita un marcador inmune que prediga la protección, incompleto conocimiento de la epidemiología y la transmisión y alta frecuencia de infecciones mixtas por distintas

cepas, sabiendo además que la exposición previa a la infección natural no confiere completa protección, por lo que la vacuna tendrá que ser superior a la propia seropositividad (117).

# JUSTIFICACIÓN

## 2. JUSTIFICACIÓN.

---

La infección congénita por citomegalovirus es la infección viral congénita más frecuente, con una prevalencia entre el 0,4 y el 2,3% (1). Constituye aproximadamente el 60% de las infecciones congénitas y la principal causa de deficiencia neurosensorial adquirida intraútero. En España, con más de 490.000 nacimientos anuales y con una prevalencia global estimada del 0,5%, el CMV afectaría a 2.450 recién nacidos cada año (12).

Es causa de múltiples anomalías que envuelven al sistema nervioso central, como retraso mental, trastorno del espectro autista, trastornos del aprendizaje, parálisis cerebral, epilepsia, déficit visual y es la segunda causa más frecuente de hipoacusia neurosensorial después de las causas genéticas. Estos niños habitualmente se diagnostican de enfermedades neurodegenerativas de peor pronóstico, como leucodistrofias o leucoencefalopatías.

Se trata de una infección, que aún siendo actualmente la infección congénita más frecuente permanece infradiagnosticada porque con relativa frecuencia es sutil clínicamente o puede permanecer silente durante las primeras etapas del desarrollo, de forma que hasta dos tercios de las secuelas se producen en niños asintomáticos en periodo neonatal. Por ello es esencial en ausencia de cribado generalizado de la infección congénita al nacimiento disponer de un arma de diagnóstico retrospectivo.

En las últimas dos décadas se ha ido estableciendo el papel de la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal, siendo la única herramienta de diagnóstico retrospectivo. Dado que un porcentaje elevado de pacientes no muestran síntomas en periodo neonatal y que no existe un cribado neonatal de la infección congénita consideramos de vital importancia evaluar la técnica en primer lugar y en segundo lugar poder aplicarla en grupos de pacientes sin etiología en los que el citomegalovirus constituye una causa potencial.

Un considerable número de pacientes controlados en las consultas de neuropediatría (incluida la nuestra) padecen encefalopatías prenatales, que pueden ser indistinguibles clínicamente dada la inespecificidad de signos y síntomas que muchas de ellas presentan. Es destacable el elevado número de pacientes sin diagnóstico etiológico, pese al elevado número de estudios realizados, que son necesarios para identificar muchos de los casos en los que sí se ha llegado determinar.

El diagnóstico etiológico de los pacientes es aquel que permite cerrar el proceso diagnóstico, valorar las posibilidades terapéuticas, establecer un pronóstico y un riesgo de repetición en la familia. Los avances en el ámbito terapéutico, de prevención y de diagnóstico prenatal se acompañan de una creciente demanda de un diagnóstico cada vez más preciso que con frecuencia no somos capaces de identificar.

La importancia de la confirmación de la infección como causa de la encefalopatía radica en que permite asegurar el carácter no progresivo de la misma, obviar estudios extensos y costosos, mejorar los resultados diagnósticos en el grupo de las leucoencefalopatías (de las que hasta un 50% queda sin diagnóstico), así como establecer un riesgo de repetición similar al resto de la población en sucesivos embarazos, dando con todo lo anterior respuestas a familiares y a los propios médicos, incluido el pronóstico.

La hipoacusia constituye la secuela permanente más frecuente y la única potencialmente tratable. Pasa desapercibida en más de la mitad de los casos y puede ser progresiva hasta los 5 años de edad (18 meses como media) lo que justificaría la realización de potenciales auditivos bianuales si el diagnóstico es confirmado antes de los 5 años. El atribuir como responsable a la infección congénita por CMV permite mejorar los resultados diagnósticos en este grupo e incluso la posibilidad de ofrecer tratamiento si el diagnóstico se realiza antes de los 6-12 meses.

A nuestro conocimiento no hay grupos nacionales que trabajen en el momento actual en la misma línea, no al menos según la planteamos nosotros, con el fin de estimar el impacto de la infección congénita sobre una patología concreta con la finalidad de aclarar la etiología de la misma de forma retrospectiva.

# HIPÓTESIS

### 3. HIPÓTESIS

---

La detección de DNA de CMV mediante PCR en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal permitirá identificar casos de infección congénita por citomegalovirus causantes de una parte significativa de encefalopatías prenatales de etiología no establecida e hipoacusias.

## OBJETIVOS

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Estimar la utilidad de la detección de DNA de CMV mediante PCR en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal y la prevalencia de la infección congénita por CMV como causa de encefalopatía de etiología no establecida y de hipoacusia neurosensorial.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la técnica de detección de DNA de CMV utilizada en nuestro laboratorio a partir de la muestra de sangre seca del cribado neonatal.
- Analizar la prevalencia de infección congénita por citomegalovirus en encefalopatías de causa no establecida.
- Establecer la prevalencia de la infección congénita por citomegalovirus en pacientes con hipoacusia neurosensorial a los que se les ha realizado potenciales evocados auditivos de estado estable.
- Actualizar el protocolo diagnóstico de encefalopatías prenatales de etiología no identificada, estableciendo la indicación de estudio de infección congénita por citomegalovirus.
- Actualizar el protocolo diagnóstico de hipoacusia neurosensorial, estableciendo la indicación de estudio de infección congénita por citomegalovirus.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 5.1. MATERIAL.

#### 5.1.1. Población a estudio.

Se estudian tres grupos de pacientes. El primero se constituye por pacientes afectados de infección congénita por citomegalovirus (grupo 1), el segundo grupo por pacientes afectados de encefalopatía prenatal de etiología no establecida (grupo 2) y el tercer grupo por pacientes afectados de hipoacusia (grupo 3). Se explican con detalle a continuación criterios de inclusión y exclusión de cada uno de ellos.

##### 5.1.1.1 Criterios de inclusión

-Grupo 1: Se analizan todos los pacientes con diagnóstico de infección congénita por citomegalovirus en periodo neonatal o de forma retrospectiva a partir de la base de datos de la unidad de Neuropediatría en el periodo comprendido entre mayo de 1990 y Octubre de 2015 y todos los casos con diagnóstico principal o accesorio de “citomegalovirus congénita” de la base de datos de la unidad de neonatología (Neosoft, Alce Ingeniería) desde Enero de 2007 (momento en el que se inicia el ingreso de pacientes en la misma) hasta Octubre de 2015.

Los casos de diagnóstico retrospectivo se subdividen en casos confirmados, para lo que se requiere detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal y casos probables por datos clínicos y de neuroimagen altamente sugestivos sin haberse localizado la prueba del talón.

Para diagnóstico en periodo neonatal se requiere aislamiento del virus en cultivo

de orina o detección de DNA de CMV por PCR en orina o plasma.

-Grupo 2: se constituye por casos de encefalopatía prenatal de etiología no establecida, independientemente de su gravedad, procedentes de la base de datos de la consulta de Neuropediatría desde el 1 de Enero de 2010 hasta el 31 de Diciembre de 2014.

El término encefalopatía se ha utilizado obedeciendo a su significado etimológico de padecimiento encefálico, independientemente de su carácter difuso o localizado y de sus repercusiones clínicas. El diagnóstico de encefalopatía prenatal se ha establecido considerando criterios clínicos y/o de neuroimagen. Como datos clínicos apoyan el origen prenatal la presencia de un polihidramnios, rasgos dismórficos faciales, malformaciones extraneurológicas asociadas, así como la no evidencia de noxa perinatal o posnatal. Se consideran también los casos de deficiencia mental y trastorno del espectro autista criptogénicos. La identificación por neuroimagen de agenesia de cuerpo calloso, trastornos de la migración neuronal o de otras anomalías prenatales son también diagnóstico de encefalopatía prenatal. Quedan excluidos los casos sin evidencia de encefalopatía prenatal de cuadros regresivos, síndromes neurocutáneos y enfermedades de la unidad neuromuscular. El término criptogénico de acuerdo a su significado etimológico se refiere a problemas de causa no conocida.

-Grupo 3: se analizan los casos de hipoacusia del conjunto de pacientes nacidos entre el 1 de Enero de 2010 y 31 de Diciembre de 2014 a los que desde el servicio de otorrinolaringología se les ha solicitado y realizado en planta potenciales de estado estable, indicados fundamentalmente en los casos de hipoacusia severa y profunda. Este grupo se constituye por 44 pacientes.

### 5.1.1.2. Criterios de exclusión

-Grupo 1 (infección congénita por citomegalovirus): no hay ningún criterio de exclusión.

-Grupo 2 (encefalopatía de etiología no establecida) y 3 (hipoacusia): el único criterio de exclusión es la no localización del papel de filtro del cribado neonatal.

### 5.1.2. Muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal.

La técnica se va a aplicar sobre la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal, extraído a todo recién nacido entre las 48 y 72 horas de vida.



*Figura 1. Método de extracción del cribado neonatal mediante punción de la parte lateral del talón e impregnación por capilaridad del papel de filtro.*

El papel de filtro que se ha utilizado de forma rutinaria para conservación de la sangre seca del cribado neonatal hasta hace dos años ha sido papel absorbente Whatman®903, de la empresa Whatman (GE Healthcare, Kent, Reino Unido). Desde hace dos años se ha utilizado el papel absorbente Perkin Elmer 226 de la empresa Perkin Elmer, de EEUU. Actualmente solo estos dos tipos de papel de filtro están aprobados como dispositivos médicos de clase II, el Whatman 903 y Ahlstrom 226 (ahora Perkin Elmer 226), que están fabricados al 100 % con fibras de algodón y no

contienen aditivos. En los papeles de filtro dedicados al cribado neonatal, el cumplimiento de estos requisitos es controlado por el Newborn Cribado Quality Assurance Program que ha desarrollado un procedimiento para evaluar la uniformidad del papel y sus propiedades de absorción por medida del tiempo de absorción y del diámetro de los círculos generados, así como del volumen de sangre o suero retenido en discos de 3.2 mm de diámetro (67,68).

Recientemente, además de comprobar su capacidad para retener la sangre, los dos tipos de papel aprobados como dispositivos médicos de clase II fueron sometidos a un estudio comparativo midiendo la concentración de los analitos determinados habitualmente en el cribado neonatal (68). Como puede verse en la Figura 1, ambos papeles son virtualmente idénticos en cuanto a sus prestaciones analíticas.

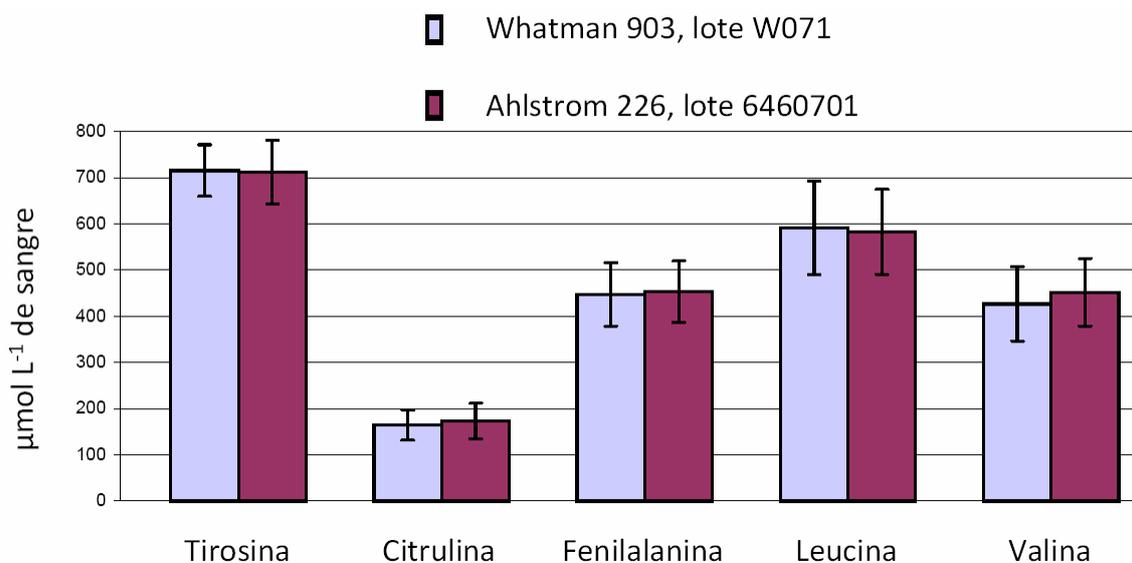


Figura 2. Ensayo comparativo de los papeles Whatman 903 y Perkin Elmer 226 para distintos analitos determinados en los programas de cribado neonatal.

### 5.1.3. Tecnología empleada.

El equipo utilizado es COBAS AmpliPrep/TaqMan de Roche, un equipo automatizado e integrado que realiza extracción y amplificación de ácidos nucleicos y consta de dos módulos: el COBAS AmpliPrep: que automatiza todo el proceso de preparación de muestras y de la extracción de ácido nucleico y el COBAS TaqMan 48 que es un sistema automático de amplificación y detección en tiempo real de ácidos nucleicos que utiliza la tecnología de la 5'-nucleasa.



*Figura 3. Equipo COBAS AmpliPrep/TaqMan de Roche utilizado en nuestro laboratorio de diagnóstico molecular de la unidad de microbiología.*

## **5.2. MÉTODO.**

### **5.2.1. Recuperación de los papeles de filtro del cribado neonatal.**

Para llevar a cabo el estudio se han recuperado del servicio de bioquímica de ambos hospitales los papeles de filtro del cribado neonatal de los niños implicados tras elaborar y firmar junto con el responsable de ambos servicios un documento de cesión de muestras (Anexo I, Documento de Cesión de Muestras). Durante el periodo de estudio las muestras pasarán a ser custodiados por el servicio de microbiología, siendo posteriormente devueltos a bioquímica para su custodia definitiva.

El proceso de localización de muestras ha sido algo complejo. En primer lugar hay que localizar el código asignado a cada papel de filtro en el sistema informático “Modulab” propio del laboratorio de la unidad de Bioquímica. El sistema de codificación no es siempre uniforme, habiendo pacientes codificados incluso dos veces de dos formas distintas. Una vez localizado el paciente hay que identificar cual de todas las muestras codificadas es la del cribado neonatal y ver qué número de cartón tiene asignado. En función del número y de la fecha de la extracción del cribado neonatal se procede a la localización del papel de filtro que se encuentra almacenado en cajas de cartón rotuladas con fecha en intervalos aproximados de 1-2 meses. Dentro de cada caja están organizados por el día de la extracción. En el Hospital Clínico la localización ha sido mucho más laboriosa puesto que dentro de cada caja están agrupados y envueltos sin codificar el día de la extracción.

Dichas muestras de sangre seca están almacenadas desde Enero de 2011 en todos los casos en el Hospital Universitario Miguel Servet independientemente del lugar de nacimiento, puesto que el cribado neonatal ampliado mediante tecnología “tándem masas” sólo se realiza en dicho hospital y funciona a pleno rendimiento para toda la comunidad autónoma desde esa fecha. Las pruebas del talón de los niños nacidos durante el año 2010 se almacenan en el Hospital Clínico Universitario o en el Hospital

Miguel Servet en función de donde hayan nacido y a qué zona pertenezcan. El almacenamiento en el Hospital Universitario Miguel Servet ha tenido lugar a temperatura ambiente hasta Enero de 2015, fecha a partir de la cual se almacenan congelados. El almacenamiento en el Hospital Clínico Universitario ha tenido lugar en frío, a 4 grados centígrados. Estas muestras se encuentran almacenadas y custodiadas en el servicio de bioquímica en ambos hospitales. No se conservan de forma indefinida, siendo el objetivo de conservación real unos 5 años en el Hospital Clínico y 6 años en el Hospital Miguel Servet.

## **5.2.2. Detección de DNA de citomegalovirus en la muestra de sangre seca del cribado neonatal.**

### ***5.2.2.1. Protocolo aplicado.***

El proyecto consiste en llevar a cabo a todos los pacientes que constituyen la muestra anteriormente descrita la detección de DNA de CMV mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal, extraído a todo recién nacido entre las 48 y 72 horas de vida.

Las muestras se han procesado y analizado en el laboratorio de diagnóstico molecular del Servicio de Microbiología de nuestro centro. La técnica de detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal se lleva a cabo mediante dilución, extracción, amplificación y detección del DNA por reacción en cadena de la polimerasa. Se obtiene un resultado definitivo en aproximadamente 4 horas.

Se ha utilizado un kit comercial que hace la determinación de PCR en tiempo real cuantificada, lo que supone que la fase de amplificación y detección se llevan a cabo al mismo tiempo y cuantifica la carga viral. Se trata de un sistema totalmente automatizado de amplificación y detección de ácidos nucleicos en tiempo real, que utiliza la tecnología 5' nucleotidasa. El nombre comercial del equipo utilizado es

COBAS AmpliPrep/TaqMan de Roche. En combinación con el cobas® AmpliPrep, los sistemas cobas® TaqMan permiten automatizar todos los pasos, desde la preparación de la muestra hasta la obtención de los resultados. La utilización de un patrón de cuantificación y el formato de tubo cerrado garantizan la integridad de los resultados y la reducción del riesgo de contaminación.

Las determinaciones se han llevado a cabo en el laboratorio de diagnóstico molecular del Servicio de Microbiología del hospital Miguel Servet. Se recortó un disco de sangre seca de 10 mm de diámetro con tijeras estériles, se colocaron en eppendorf estériles y se añadió un ml de buffer de lisis ATL (Qiagen®). Para facilitar la extracción de la sangre del papel absorbente a la solución se agita con vortex durante 10 minutos. Se centrifugan 10 segundos y se extraen 600 microlitros de sobrenadante para la determinación de DNA de CMV por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por el método PCR TaqMan de Roche Diagnostics para virus CMV.

La prueba puede cuantificar el ADN del CMV en el intervalo de 150 a 10.000.000 copias/mililitro. Una copia de ADN del CMV (definida con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV) equivale a 0,91 unidades internacionales (UI) [1,1 cp/UI] según el primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano (NIBSC 09/162)40. El límite de detección según el mismo estándar es de 91 UI/mililitro, es decir 100 copias/mililitro.

#### ***5.2.2.2. Técnica de detección con el aparato COBAS AMPLIPREP/COBAS TAQ MAN para citomegalovirus.***

A continuación se describe detalladamente la técnica en sí misma. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV permite la preparación automatizada de la muestra seguida de la amplificación mediante PCR y la detección de ADN del fragmento objetivo del CMV y ADN del estándar de cuantificación (QS) del CMV también automatizadas. El reactivo de mezcla maestra contiene cebadores y sondas específicas tanto para el ADN del CMV como para el ADN del QS del CMV. La

detección del ADN amplificado se realiza utilizando sondas oligonucleótidas doblemente marcadas específicas para el fragmento objetivo y para el QS respectivamente que permiten la identificación independiente del amplicón del CMV y el amplicón del QS del CMV.

La amplificación del ácido nucleico es un proceso de producción de numerosas copias de DNA a partir de una región de DNA o RNA original diana. La amplificación se lleva a cabo en el equipo COBAS® AmpliPrep que realiza la lisis de las partículas víricas mediante incubación a alta temperatura con una proteasa y un tampón que libera los ácidos nucleicos y protege al DNA liberado de las DNAsas presentes en el suero o plasma. Junto con el reactivo de lisis y las partículas magnéticas, se introduce en cada muestra proteasa y un número conocido de moléculas de DNA del estándar de cuantificación (QS) del CMV.

Posteriormente se incuba la mezcla del DNA del CMV y del QS correspondiente y se unen a la superficie de las partículas magnéticas de vidrio. Las sustancias no unidas se eliminan al lavar estas partículas. Tras la separación de las perlas y completar los pasos de lavado, se libera el ácido nucleico adsorbido a temperatura elevada con una solución acuosa. Esta muestra procesada se añade a la mezcla de amplificación (Master Mix) y se transfiere al analizador Cobas TaqMan 48.

Seguidamente tiene lugar la amplificación bajo dos aspectos, la amplificación del objetivo se lleva a cabo con el termociclador del COBAS TaqMan 48, calentando la mezcla de reacción para desnaturalizar el híbrido ADN bicatenario y exponer las secuencias objetivo específicas del iniciador. A medida que la mezcla se enfría, los iniciadores hibridan al DNA objetivo. La ADN polimerasa termoestable de *Thermus spp*, extiende los iniciadores hibridados a lo largo de la plantilla del objetivo para producir una molécula de DNA bicatenario llamada amplicón.

El número de ciclos necesarios está programado en el analizador. La amplificación tiene lugar solamente en la región del genoma del CMV situada entre los iniciadores. Posteriormente, la amplificación selectiva del ácido nucleico objetivo de la

muestra se logra mediante el uso de la enzima Amperasa (uracil-N-glicosilasa) y trifosfato de deoxiuridina (dUTP). La enzima Amperasa reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen deoxiuridina, pero no del ADN que contiene deoxitimidina. El ADN natural carece de deoxiuridina, pero sin embargo está siempre presente en el amplicón. El dUTP se incluye en los reactivos de la mezcla maestra; por lo tanto sólo el amplicón tiene deoxiuridina. Esto hace que el amplicón contaminante y cualquier producto inespecífico que se pueda formar, sea susceptible de ser destruido por la enzima AmpErase antes de la amplificación del objetivo. La enzima AmpErase que se incluye en la mezcla maestra, cataliza la escisión del ADN que contiene deoxiuridina. Cuando se calienta en el primer paso del ciclo térmico, la cadena ADN del amplicón se rompe en la posición de la deoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no pueda amplificarse.

A continuación se lleva a cabo la detección de los productos de la PCR mediante tecnología PCR “en tiempo real”. El uso de sondas fluorescentes doblemente marcadas permite detectar en tiempo real la acumulación de productos de la PCR monitorizando la intensidad de emisión de indicadores fluorescentes (“reporter”) liberados durante el proceso de amplificación. Las sondas son oligonucleótidos específicos frente a una región conservada de DNA del CMV y del QS correspondiente con un fluoróforo indicador (reporter) que emite fluorescencia y un fluoróforo que la inhibe (quencher). Cuando las sondas están intactas, el “quencher” inhibe la fluorescencia del reporter” por proximidad. Durante la fase de extensión los fluoróforos “quencher” y “reporter” se separan y cesa la actividad inhibidora emitiendo y midiéndose la fluorescencia del reporter.

La amplificación del DNA del CMV y el DNA del QS correspondiente, se miden de forma independiente a distintas longitudes de onda. Este proceso se repite durante un número de ciclos predeterminado, aumentando en cada ciclo la intensidad de emisión de cada uno de los colorantes fluorescentes individuales indicadores, lo que permite la identificación independiente del DNA del CMV y del DNA del QS correspondiente. El ciclo de PCR en el que la curva de crecimiento adquiere forma exponencial está relacionado con la cantidad de material de partida presente al inicio de la reacción PCR.

La medición de la fluorescencia se lleva a cabo por medio de un sistema fluorométrico, en el que la fuente de excitación es una lámpara de wolframio. Los valores de referencia se utilizan en el cálculo de los resultados para corregir cualquier desviación producida en la excitación. El fotodetector es un circuito integrado específico de la aplicación (Photo ASIC). Éste permite la lectura simultánea de todos los canales.

### **5.2.2. Controles internos de calidad.**

Como controles internos de la calidad de nuestra propia técnica con el fin de extraer conclusiones se ha procedido a llevar a cabo la detección de DNA de CMV en las muestras de sangre seca del cribado neonatal de controles positivos y negativos.

Como controles positivos se han utilizado 15 pacientes (del Grupo 1) con diagnóstico de infección congénita por CMV en periodo neonatal que habían sido diagnosticados mediante PCR de CMV en sangre u orina durante el periodo neonatal. Se comparan los resultados de nuestra técnica en la actualidad con los resultados previos. Con objetivo de ver la influencia del paso del tiempo se analiza una prueba del talón de un caso de diagnóstico retrospectivo.

Como controles negativos se han utilizado aquellos pacientes de ambos grupos de estudio (encefalopatías de etiología no establecida e hipoacusias) donde ya constaba descartado el CMV en periodo neonatal mediante muestra de sangre u orina. Este grupo consta de 6 pacientes del grupo de las encefalopatías y 3 del grupo de las hipoacusias.

#### ***5.2.2.4. Protocolo previsto ante detecciones positivas.***

Está previsto que en cada uno de los pacientes en los que la detección resulte positiva (en caso de haberlos), se procederá a confirmarla mediante una segunda determinación. Una vez confirmada se contacta telefónicamente con la familia para generar una cita en consulta para informar del resultado y se emitirá un informe médico. Se completará estudio diagnóstico mediante PCR de CMV en orina y serologías de CMV en sangre y se incluirá en un programa de seguimiento específico ajustado a sus necesidades. Se anularán otros estudios analíticos y genéticos si los tuviera previstos.

#### **5.2.3. Variables a estudio.**

De forma paralela se han analizado las historias clínicas de todos los pacientes, incluidas las exploraciones y pruebas complementarias realizadas hasta el momento. A continuación se exponen las variables recogidas.

##### ***5.2.3.1. Variables recogidas en el grupo de pacientes afectados de infección congénita por citomegalovirus.***

Se recogen trece variables clínicas: presencia/ausencia de sintomatología manifiesta al nacimiento (petequias, trombopenia, hepatoesplenomegalia que se analizan además de forma individual), afectación del sistema nervioso central (microcefalia, clínica neurológica, coriorretinitis, sordera, PCR de CMV positiva en líquido cefalorraquídeo y alteraciones en la neuroimagen y que se analizan también por separado), retraso de crecimiento intrauterino y desarrollo psicomotor hasta la actualidad. Se recogen las siguientes pruebas diagnósticas: serología (IgM), PCR de CMV en sangre, carga viral (disponible desde el año 2010), cultivo de CMV en orina, PCR de CMV en orina y detección positiva en papel de filtro de la prueba de cribado neonatal.

### *5.2.3.2. Variables recogidas en el grupo de controles positivos y negativos para valoración de la propia técnica.*

En los controles positivos se recoge la positividad o negatividad de la detección, la carga viral del paciente en sangre al nacimiento y el tiempo transcurrido desde la realización de la prueba del talón hasta el análisis en la actualidad.

En los controles negativos se recoge la positividad o negatividad de la técnica en la actualidad.

### *5.2.3.3. Variables recogidas en el grupo de pacientes afectados de encefalopatía de etiología no establecida e hipoacusia.*

Las variables a recoger de cada paciente se definen a continuación agrupadas por categorías:

-Variables de tiempo: fecha de nacimiento (edad actual) y edad a la que fue remitido a la consulta en primera ocasión.

-Motivo por el que fue remitido a la consulta y procedencia.

-Diagnóstico: presencia o ausencia de discapacidad intelectual, retraso psicomotor, trastorno del espectro autista, epilepsia/convulsiones, hidrocefalia, parálisis cerebral. Se incluyen también otros diagnósticos.

-Antecedentes familiares: antecedentes familiares de patología neurológica, antecedentes de hipoacusia, enfermedades hereditarias, consanguinidad.

-Antecedentes obstétricos: abortos previos, control del embarazo, ecografías prenatales, cuadros sugestivos infecciosos, hábitos tóxicos, serologías durante el embarazo, serología de CMV, otra patología intercurrente, presencia de retraso de crecimiento intrauterino.

-Periodo neonatal: tipo de parto, semanas de edad gestacional, apgar, síntomas/signos al nacimiento o en periodo neonatal sugestivos de enfermedad por inclusión citomegálica: fiebre, petequias, hepatoesplenomegalia, ictericia, elevación de transaminasas, coagulopatía, colostasis, trombopenia, distrés respiratorio, septicemia u otros signos/síntomas sugestivos de infección congénita, encefalopatía, hiper/hipotonía, paresia, retraso de crecimiento intraútero, microcefalia, hipoacusia neurosensorial, coriorretinitis, otras alteraciones oculares, ingreso en la unidad de neonatología.

-Variables antropométricas: peso, talla y perímetro cefálico del recién nacido.

-Realización y presencia o ausencia de alteraciones en la neuroimagen: Alteraciones en ecografía prenatal, ecografía transfontanelar, tomografía axial computerizada y resonancia magnética craneal. Se especifica presencia o ausencia de ventriculomegalia, calcificaciones intracraneales, alteraciones encefaloclasticas, leucoencefalopatía, displasia cortical, malformaciones del lóbulo temporal e hipocampo. Se describen otras alteraciones.

-Realización y presencia o ausencia de alteraciones en otras exploraciones complementarias: potenciales evocados auditivos, exploración oftalmológica, perfil analítico neurometabólico, estudios genéticos y otras exploraciones complementarias.

-Carga asistencial: periodicidad de las consultas, número visitas en consulta, número de informes y número de ingresos en relación con la patología actual.

-Detección de DNA de citomegalovirus en la muestra de sangre seca del cribado neonatal.

Las alteraciones relevantes en neuroimagen, perfil neurometabólico y estudios genéticos también son descritas.

#### **5.2.4. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos se ha realizado con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Mac, versión 21.0.

En la estadística descriptiva univariada, las variables cualitativas se han presentado mediante la distribución de frecuencias o porcentajes de cada categoría, y para las variables cuantitativas se han dado indicadores de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar). Previamente al análisis, se ha comprobado la normalidad de las variables cuantitativas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

En la estadística analítica, para comprobar la asociación entre las diversas variables se han utilizado pruebas de contraste de hipótesis, con comparación de proporciones cuando ambas sean cualitativas (chi cuadrado, prueba exacta de Fisher); comparaciones de medias cuando una de ellas sea cuantitativa (t de Student, ANOVA, y si no siguen distribución normal el test de la U de Mann – Whitney o el de Kruskal – Wallis).

El límite mínimo de significación aceptado en todo cálculo estadístico ha sido del 95% ( $p < 0,05$ ).

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

## 6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

---

El estudio se ha llevado a cabo siguiendo las normas deontológicas reconocidas por la Declaración de Helsinki (59ª Asamblea General, Seúl, Corea, Octubre 2008 (169), las Normas de Buena Práctica Clínica (170) y cumpliendo con la legislación vigente y la normativa legal española que regula la investigación clínica en humanos (Real Decreto 223/2004 sobre ensayos clínicos (171) y Ley 14/2007 de Investigación Biomédica (172).

Se trata de un estudio que no implica ninguna extracción analítica ni ningún otro procedimiento directamente con el paciente por lo que no existe riesgo ni se puede derivar ningún daño o efecto secundario.

El trabajo no interfiere con las tareas propiamente asistenciales del centro puesto que los papeles del cribado neonatal serán recuperados por la investigadora principal fuera de su horario habitual sin interferir con el funcionamiento del servicio de bioquímica y la investigadora colaboradora del servicio de microbiología va a realizar las determinaciones fuera del horario habitual de trabajo, por lo que no genera en ningún caso demora en las tareas propias del centro ni aumento de la lista de espera. Tampoco afecta a la distribución de recursos puesto que el único recurso utilizado (el reactivo para la detección de DNA de CMV) es aportado por la investigadora principal.

El proyecto se entiende como una acción clínica, donde se trata de llegar a un diagnóstico con una muestra de la que ya se dispone previamente. Se utiliza el procedimiento para obtener una serie de conclusiones.

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica de Aragón. Se adjunta el dictamen favorable del comité de Ética (Anexo II).

En el caso de que la determinación salga positiva se emitirá un informe médico y comunicación telefónica con la familia para generar una cita inmediata en consulta donde informar del resultado, completar el estudio y establecer un programa de seguimiento adecuado.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

## 7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

---

### *Limitaciones relativas a las muestras de papel de filtro*

-Limitación del tiempo de almacenamiento. Dado que el periodo de almacenamiento actual en nuestra comunidad es de unos 5 años esto nos ha obligado a limitar las fechas del periodo de estudio y no haber podido incluir pacientes que tuvieran más de 5 años, haciendo que el tamaño muestral sea relativamente pequeño.

-Extravío de papeles de filtro. Ambas colecciones no tienen carácter oficial, no están registradas, están accesibles y hay algunas muestras que a pesar de que deberían estar no han aparecido. Al no firmarse un documento de cesión de muestras como norma hay papeles de filtro que constan como cedidos a otras unidades pero que no han llegado a ser devueltos.

-Compleja identificación del código asignado para su posterior búsqueda. No se han podido localizar varias pruebas del talón creemos que por errores a la hora de codificación del paciente en el momento de su incorporación al sistema informático ya que ha sido frecuente que el mismo paciente estuviera codificado de dos formas distintas en el sistema informático. La no localización de determinados papeles de filtro ha podido influir sobre el resultado.

-Las condiciones de almacenamiento de los papeles de filtro en nuestro centro no son las óptimas. Aunque es así, a temperatura ambiente y sin control de la humedad, como ha estado almacenado en una gran parte de hospitales nacionales e internacionales hasta ahora. Esto puede afectar a la capacidad de extracción del DNA desde el papel de filtro y puede condicionar la presencia de sustancias inhibitorias que inhiban la propia técnica.

### ***Limitaciones de la técnica***

-Es una técnica cuyo papel se ha ido estableciendo en las últimas dos décadas y cuya sensibilidad ha sido objeto de controversia, habiéndose comunicado sensibilidades muy bajas cuando ha sido utilizada como cribado. La sensibilidad puede verse influida por la carga viral al nacimiento y el tiempo transcurrido hasta el análisis fundamentalmente. El hecho de que en el trabajo la llevamos a cabo sobre pacientes supuestamente sintomáticos, tratando de atribuir dicha sintomatología a la infección congénita, hace pensar en una carga viral suficiente al nacimiento (probablemente superior a 1000 copias) que daría probablemente un resultado positivo. Además existe la posibilidad de pacientes no virémicos al nacimiento bien por una infección temprana durante la gestación o por una viremia intermitente y que por tanto podrían no ser detectados por la prueba, que constituirían los falsos negativos.

-También está descrita la posibilidad de falsos positivos, aunque considerando la alta especificidad referida por la mayoría de los autores es muy improbable. Está descrita la posibilidad de contaminación de la muestra desde las tarjetas vecinas a la hora del almacenamiento, pero esta posibilidad tampoco ha sido confirmada por distintos grupos.

### ***Tamaño muestral***

-Nuestro tamaño muestral es relativamente pequeño, lo que puede condicionar los resultados y hacer que estos no sean extrapolables al global de las hipoacusias o de las encefalopatías.

### ***Base de datos de neuropediatría y neonatología***

Con respecto a las bases de datos de neuropediatría y neonatología es importante tener en cuenta que cuentan con una gran cantidad de variables y registros, así como varias personas que introducen los datos, lo que aumenta las probabilidades de sesgo

dada la dificultad de su manejo. La base de datos se encuentra en continua evolución, adaptándose a los avances científicos, con introducción progresiva de nuevos datos, incluso diagnósticos. La selección de los pacientes afectados de encefalopatía se realizó en función de un diagnóstico llevado a cabo por el neuropediatra en función de criterios clínicos o de imagen, sujeta a cierta variabilidad por tanto.

## RESULTADOS

## 8. RESULTADOS

---

### 8.1. RESULTADOS EN EL GRUPO DE PACIENTES AFECTOS DE INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS.

En la base de datos de la consulta de neuropediatría (desde 1 Mayo 1990) hasta la actualidad de un total de 18814 pacientes tenemos 14 casos de CMV congénito, de los que 10 son confirmados y 4 figuran como diagnóstico probable. De los 10 casos confirmados, 3 son de diagnóstico en periodo neonatal y 7 de diagnóstico retrospectivo. Los 4 que figuran como diagnóstico sólo probable lo hacen por unos datos clínicos y de neuroimagen altamente sugestivos sin haber podido confirmar la infección por no disponer del papel de filtro de la prueba del talón.

En la base de datos de la unidad de Neonatología figuran 16 casos codificados con el diagnóstico principal o accesorio de “citomegalovirus congénita”. De estos 16 son 15 confirmados y uno probable por elevada sospecha clínica pasadas las tres primeras semanas de vida pero que no se ha podido confirmar al resultar la prueba del talón negativa).

Conjuntamente por tanto se han obtenido un total de 30 casos de infección congénita por CMV, de los que 25 son confirmados (18 en periodo neonatal y 7 retrospectivos) y 5 son sólo probables.

Se resumen las principales características en las siguientes tablas.

**ESTUDIO RETROSPECTIVO DE INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS EN ENCEFALOPATÍAS DE CAUSA NO ESTABLECIDA E HIPOACUSIAS**

Caso	Año nac.	Síntomas al realizar el diagnóstico	Neuroimagen	Otros datos diagnóstico	Evolución
1	1993	CIR, ictericia ,hepatitis colostática primer día de vida	Eco Tf y TAC craneal normales	Cultivo orina IgM positiva	<b>Discapacidad intelectual, microcefalia</b>
2	1996	Ictericia, hepatoesplenomegalia, trombopenia, púrpura y depresión neurológica	Eco Tf: calcificaciones periventriculares. RM: dilatación triventricular asimétrica, megacisterna magna, hipertintensidades corticosubcorticales multifocales	Cultivo orina IgM positiva	<b>PCI, discapacidad intelectual, epilepsia refractaria, microcefalia, hipovisión</b>
3	2008	CIR, microcefalia., <i>ventriculomegalia prenatal</i> , y depresión neurológica	Eco Tf: ventriculomegalia y calcificaciones periventriculares TAC: ventriculomegalia, megacisterna magna, calcificaciones diseminadas y lisencefalia RM: Lisencefalia, hidrocefalia, afectación difusa de sustancia blanca	Cultivo orina IgM positiva <b>PCR sangre DNA CMV talón</b>	<b>PCI, encefalopatía, epilepsia refractaria, microcefalia y déficit visual</b>
4	2007	Microcefalia, sospecha de sepsis: taquipnea, púrpura y trombopenia. Coriorretinitis bilateral no progresiva	Eco Tf normal	Culivo orina IgM positiva PCR sangre <b>Cultivo virus LCR positivo</b>	<b>Normalidad</b>
5	2009	<i>Ventriculomegalia prenatal</i> . Pérdida de bienestar fetal Trombopenia, púrpura y hepatoesplenomegalia coriorretinitis	Eco Tf: ventriculomegalia y calcificaciones periventriculares TAC: colpocefalia y calcificaciones hemisféricas, en núcleos dentados y periventriculares. Atrofia encefálica (temporal) y cerebelosa y escasa formación de surcos. Colpocefalia	Cultivo orina IgM negativa PCR sangre <b>PCR LCR +</b>	<b>PCI, retraso mental severo, epilepsia, microcefalia</b>
6	2010	Microcefalia, trombopenia, púrpura y hepatoesplenomegalia	Eco Tf: ventriculomegalia discreta TAC: dilatación astas temporales (derecha) en relación con encefalomalacia secundaria patología infecciosa RM: atrofia lóbulos temporales, extensa afectación de sustancia blanca, polimicrogiria occipital y parietal	Cultivo orina IgM positiva DNA CMV sangre PCR LCR neg	<b>Discapacidad intelectual, trastorno espectro autista, hipoacusia bilateral profunda (doble implante)</b>
7	2011	Púrpura y trombopenia. Coriorretinitis.	Eco Tf: quistes subependimarios ventriculomegalia discreta y calcificaciones periventriculares TAC: ventriculomegalia, colpocefalia, calcificaciones caudotalámicas RM: Dilatación triventricular de predominio occipital. Secuela de encefalopatía. Hiperseñal periventricular.	Cultivo orina negativo. IgM negativa PCR en sangre <b>PCR LCR +</b>	<b>PCI, discapacidad intelectual, trastorno de la deglución, epilepsia</b>
8	2011	Prematuridad, pérdida de bienestar fetal, trombopenia y coagulopatía transitoria	Eco Tf normal TAC normal	IgM negativa PCR sangre PCR LCR neg	<b>Normalidad</b>
9	2012	CIR, prematuro tardío y discreta trombopenia	Eco Tf: quistes subependimarios surco caudo-talámico. Ventriculomegalia discreta TAC: discreta colpocefalia. Hipodensidad de sustancia blanca difusa RM: pequeñas lesiones hiperintensas subcorticales frontales y parietales sugestivas de isquemia crónica	Cultivo orina negativo IgM positiva PCR sangre PCR LCR neg	<b>Retraso psicomotor, discapacidad intelectual, TDHA. Microcefalia. Hipoacusia severa unilateral.</b>

Caso	Año de nacim.	Síntomas al realizar el diagnóstico	Neuroimagen	Otros datos diagnóstico	Evolución
10	2012	Prematuridad. Asintomático Crisis convulsivas a 5 días de vida, con normalización de electroencefalograma a los 2 meses.	Eco Tf: normal	Cultivo orina negativo IgM negativa PCR sangre PCR LCR neg	<b>Normalidad</b>
11	2012	Prenatal: microcefalia, calcificaciones, hepatoesplenomegalia. RN: Trombopenia, púrpura, hepatoesplenomegalia y coagulopatía	Eco Tf: quistes subependimarios bilaterales en hendidura caudotalámica y calcificaciones periventriculares	Cultivo orina IgM negativa PCR sangre <b>PCR talón</b>	<b>Normalidad</b> <b>Hipoacusia severa unilateral</b> <b>Vitíligo</b>
12	2012	Asintomática. Citomegalovirus materna en el embarazo	Eco Tf: normal	IgM negativa PCR sangre PCR LCR neg	<b>Normalidad</b>
13	2013	CIR , prematuro moderado, pérdida bienestar fetal, microcefalia, trombopenia, purpura, hepatoesplenomegalia	Eco Tf: ventriculomegalia discreta. Dudosas calcificaciones	Cultivo orina negativo IgM positiva PCR sangre PCR LCR neg	<b>Normalidad</b> <b>Alteración en electroencefalograma inicial, control posterior normal</b>
14	2013	Prematuro moderado, pérdida de bienestar fetal y trombopenia y neutropenia	Eco Tf: quistes subependimarios caudotalámicos RM: pequeñas aéreas puntiformes de baja señal periventricularres izquierdas que podrían corresponderse a calcificaciones	Cultivo orina PCR sangre PCR LCR neg	<b>Normalidad</b> <b>Hipoacusia bilateral, severa unilateral</b>
15	2015	Prematuro moderado. Diagnóstico casual. Dudosas calcificaciones ecográficas no confirmadas en TAC	Eco Tf: dudosas calcificaciones periventriculares no confirmadas TAC: normal	PCR orina IgM negativa PCR sangre PCR LCR neg <b>PCR talón</b>	<b>Normalidad</b> <b>Potenciales: discreta alteración bilateral.</b>
16	2015	Diagnóstico casual por cribado en <1500 gramos. Embarazo mal controlado. Prematura de 28 sEG	Eco Tf: normal	PCR orina. PCR sangre PCR LCR neg.	<b>Normalidad</b>
17	2015	Seroconversión materna 24 sEG	Eco Tf: quiste subependimario TAC: dudosas hipodensidades	<i>PCR orina</i> <i>PCR sangre</i>	<b>Normalidad</b>
18	2015	<b>Diagnóstico casual por cribado en &lt;1500 gramos. Prematura 25 sE.G</b>	<b>Eco Tf:: ventriculomegalia moderada</b>	<i>PCR orina</i> <i>PCR sangre</i> <i>PCR LCR neg</i>	<b>2 meses</b>

Tabla 1 (Continuación). Citomegalovirus congénito de diagnóstico en periodo neonatal. CIR (crecimiento intrauterino restringido), Eco Tf (ecografía transfontanelar), LCR (líquido cefalorraquídeo), neg (negativa), PCI (parálisis cerebral infantil), PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RM (resonancia magnética), sEG (semanas de edad gestacional), TAC (tomografía axial computerizada),+ (positivo).

**Citomegalovirus congénito confirmado de diagnóstico retrospectivo.**

Caso	Año nacim. / Edad Diagnós.	Síntomas RN /diagnóstico	Neuroimagen	Otros datos diagnóstico	Evolución
19	2000 2 años	RN: CIR 3 años: Retraso psicomotor, microcefalia, hipoacusia, 2 <b>manchas acrómicas</b>	TAC: calcificaciones periventriculares RM: encefalopatía difusa con afectación de sustancia blanca, calcificaciones periventriculares y malformación hipocámpica bilateral	No	<b>Retraso psicomotor, discapacidad intelectual, microcefalia e hipoacusia. TEA</b>
20	2001 5 meses	RN: Hepatoesplenomegalia 5meses: Microcefalia. Retraso psicomotor	Eco Tf: discreta ventriculomegalia asimétrica TAC: vetriculomegalia, , disgenesia cuerpo calloso y displasia cortical difusa	Cultivo orina IgM negativa	<b>PCI, discapacidad intelectual, microcefalia, epilepsia, moderada hipoacusia bilateral.</b>
21	2005 4años	RN: CIR Desde los 13 meses retraso psicomotor	RM: quiste aracnoideo temporal izquierdo Hiperintensidades en sustancia blanca periventricular y subcortical de predominio posterior	No	<b>Retraso psicomotor, discapacidad intelectual, trastorno espectro autista</b>
22	2006 7meses	RN: CIR y microcefalia 7 meses: Crisis convulsiva. EF: paresia EESS izquierda y microcefalia	Eco Tf: calcificaciones periventriculares TAC: mínimas calcificaciones apenas perceptibles	Cultivo orina IgM negativa	<b>PCI, retraso psicomotor, discapacidad intelectual, microcefalia , epilepsia e hipoacusia bilateral</b>
23	2007 5 meses	RN: Prematuro moderado, CIR, microcefalia, pérdida de bienestar fetal, hepatoesplenomegalia, colostasis 5m: Retraso psicomotor	Eco Tf: colpocefalia asimétrica RM: atrofia cortico-subcortical generalizada con leve colpocefalia	Cultivo orina IgM negativa	<b>Retraso psicomotor, discapacidad intelectual, trastorno espectro autista</b>
24	2007 26 meses	RN: Asintomático Desde los 7 meses plagiocefalia, retraso psicomotor, <b>hipoacusia profunda bilateral.</b>	TAC: hipodensidad difusa sustancia blanca supratentorial corticosubcortical, predominio anterior y mayor posterior RM: hiperintensidad sustancia blanca difusa predominio periventricular y subcortical posterior	No	<b>Retraso psicomotor, discapacidad intelectual, hipoacusia profunda bilateral(implante) , TDHA sintomático, hipermetropía (lentes correctoras desde 15 meses)</b>
25	2007 10 meses	RN: asintomático A 10 meses epilepsia	<b>EcoTf: calcificaciones periventriculares puntiformes, algunas lineales y parenquimatosas</b> TAC: calcificaciones, malformación hipocámpica bilateral, sustancia blanca	Cultivo orina IgM negativa	<b>Retraso psicomotor, discapacidad intelectual. epilepsia y leucoencefalopatía</b>

Tabla II. Citomegalovirus congénito confirmado retrospectivo. CIR (crecimiento intrauterino restringido), Eco Tf (ecografía transfontanelar), IgM (Inmunoglobulina M), PCI (parálisis cerebral infantil), RM (resonancia magnética), RN (recién nacido), TAC (tomografía axial computerizada), TDHA (trastorno por déficit de atención e hiperactividad), TEA (trastorno espectro autista)

### Citomegalovirus congénito probable

Caso	Año nacim. / Edad Diagnós.	Síntomas RN /diagnóstico	Neuroimagen	Otros datos diagnóstico	Evolución
26	1988 3 años y medio	RN: Asintomático 3 años: Microcefalia, epilepsia, tetraparesia espástica	TAC: ventriculomegalia, calcificaciones periventriculares	No	<b>PCI, discapacidad intelectual, epilepsia, déficit visual, microcefalia</b>
27	1988 3 años 7 meses	Convulsiones neonatales 3 años 7 meses: Retraso psicomotor y crisis convulsiva	TAC: calcificaciones periventriculares	No	<b>PCI, discapacidad intelectual, epilepsia, hipovisión e hipoacusia</b>
28	1991 14 años	RN: Asintomático Epilepsia desde 2 años, retraso psicomotor, coloboma coroides y catarata ojo izquierdo.	TAC-RM: malformación hipocámpica izquierda y calcificaciones periventriculares y parenquimatosas.	No	<b>PCI, epilepsia, discapacidad intelectual, trastorno ocular</b>
29	2002 21 meses	RN: CIR 21 meses: Retraso psicomotor, PCI (diplejía espástica), estrabismo convergente	RM: afectación multifocal sustancia blanca bilateral y malformación hipocámpica bilateral	No	<b>PCI, retraso psicomotor, discapacidad intelectual, estrabismo convergente</b>
30	2010 1mes	RN: Prematuridad (30 sEG), pérdida bienestar fetal, trombopenia y coagulopatía transitoria	Eco Tf: hemorragia intraventricular II. TAC: normal RM: normal	PCR orina positiva a 4 semanas (No leche materna) IgG CMV +	Hipoacusia profunda bilateral(implante coclear), estrabismo convergente

Tabla III. Citomegalovirus congénito probable. CIR (crecimiento intrauterino restringido), Eco Tf (ecografía transfontanelar), PCI (parálisis cerebral infantil), PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RM (Resonancia magnética), RN (recién nacido), sEG (semanas de edad gestacional), TAC (tomografía axial computerizada).

## **8.2 EVALUACION DE LA TECNICA DE DETECCION DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN LA MUESTRA DE SANGRE SECA DEL CRIBADO NEONATAL.**

### **8.2.1. Infección congénita por citomegalovirus y detección de citomegalovirus en el papel de filtro de la prueba del talón.**

En la actualidad los pacientes controlados en las Unidades de Neuropediatría y Neuroneonatología con el diagnóstico de infección congénita por CMV son 30, pero 5 son sólo probables por no poder confirmarse al no localizarse en su momento la prueba del talón en 4 y en uno resultar negativa. Hay 25 pacientes con la infección congénita confirmada. De estos 25 casos, 7 de diagnóstico retrospectivo, habiéndose demostrado la infección mediante la detección de CMV en la prueba del talón. Los otros 18 son CMVs congénitos de diagnóstico en periodo neonatal, mediante cultivo de orina o PCR en sangre u orina.

De los 18 casos de infección congénita por CMV confirmada en periodo neonatal hasta ahora se había llevado a cabo la detección de DNA de CMV en 12 pacientes. En tres, igual que ahora, no se pudo localizar la prueba del talón en su momento (casos 1, 2, 4) y en los últimos tres casos del año 2015 (casos 16, 17 y 18) no estaban analizada. Constaban hasta el momento 8 detecciones positivas (casos 3, 5,7,9,11,12,14,15) y 4 negativas (6,8,10,13), estimando así una sensibilidad aproximada de la prueba hasta la actualidad de un 66,6%.

Hasta la actualidad se ha llevado a cabo la detección de DNA en sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal con intención de diagnóstico retrospectivo en 51 ocasiones, obteniéndose resultado positivo en 7 (casos 19,20,21,22,23,24,25) y ha sido negativa en 1(caso clínico número 30).

## **8.2.2. Valoración de la sensibilidad/especificidad de nuestra propia técnica.**

### **8.2.2.1. Controles positivos.**

Se ha procedido a la localización de todos los pacientes con infección congénita por CMV diagnosticada en periodo neonatal y se ha procedido a la detección de DNA de CMV mediante la PCR en la muestra de sangre seca del cribado neonatal.

No se ha podido localizar el talón en tres pacientes porque ya no estaban disponibles al ser pacientes nacidos en los años 1993, 1996 y 2007 respectivamente (casos 1, 2, 4). Un paciente a pesar de ser del 2008 el talón se había guardado aparte y sí que estaba disponible. Por tanto todos los análisis se han hecho sobre un total de 15 pruebas del talón. Tras llevar a cabo la detección del DNA de CMV en dichas muestras se han obtenido un total de 12 positivos (casos 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) y 2 negativos (casos 3, 6 y 8). Con esto estimamos una sensibilidad de nuestra propia técnica de un 80% (Sólo en tres pacientes cuya infección congénita estaba confirmada en periodo neonatal no se ha podido detectar el CMV en la muestra de sangre seca desde el papel de filtro del cribado neonatal, que constituirían dos falsos negativos (casos 3, 6 y 8).

Comparando los resultados actuales (12 positivos sobre 15 pacientes) con la misma técnica hasta la actualidad (8 positivos sobre 12) hay 8 pacientes que habían sido positivos previamente y ahora 7 (porque uno se ha negativizado con el paso del tiempo). De los 4 pacientes que eran negativos hasta ahora dos se han positivizado en esta ocasión (casos 10 y 13), precisando tres de ellos repetir la técnica por inhibición durante el proceso. Los tres pacientes en los que se ha llevado a cabo por primera vez han sido positivos.

Se ha analizado una prueba del talón en un paciente con diagnóstico retrospectivo de infección congénita por CMV (caso 24) (previamente positiva en el año 2009) que ha resultado al repetirla negativa habiendo transcurrido 98 meses desde la extracción y 72 meses desde su análisis en el año 2009.

#### **8.2.2.2. Controles negativos.**

Como controles negativos se han utilizado 9 pacientes en los que ya en periodo neonatal se había descartado la infección congénita por CMV mediante PCR y/o cultivo en orina o PCR en plasma. En todos ellos se ha procedido a localizar la prueba del talón y llevar a cabo la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca. Los 9 casos han resultado negativos, no se ha detectado DNA de CMV en ninguno de ellos, no habiendo obtenido por tanto ningún falso positivo en este grupo.

#### **8.2.3. Relación del resultado de la detección con la carga viral al nacimiento.**

Se ha procedido a intentar relacionar la positividad/negatividad de la técnica con la carga viral al nacimiento.

En cuanto a la carga viral al nacimiento esta cifra sólo la tenemos disponible desde el 2010 porque hasta ese momento la PCR que se hacía era sólo cualitativa, con lo que sólo se obtenían positivos o negativos sin cuantificar el resultado. Por tanto para llevar a cabo esta comparativa se dispone de 13 pacientes.

-Los dos pacientes (casos 6 y 8) cuya detección ha sido negativa: tuvieron una carga viral al nacimiento de 1230 y 982 UI/ml respectivamente, con una media de carga viral de  $1106 \pm 175,36$ .

-Los 11 pacientes cuya detección ha sido positiva tuvieron una carga viral al nacimiento de: 137 (caso 18), 305 (caso 12), 734 (caso 10), 1870 (caso 15), 1904 (caso 14), 3514 (caso 16), 4022 (caso 11), 4105 (caso 17), 6414 (caso 13), 19500 (caso 9) y

123000 (caso 7) con una media de 15045,91. Dado la dispersión de los valores de la muestra apporto la mediana de 3514 y el rango de 122863.

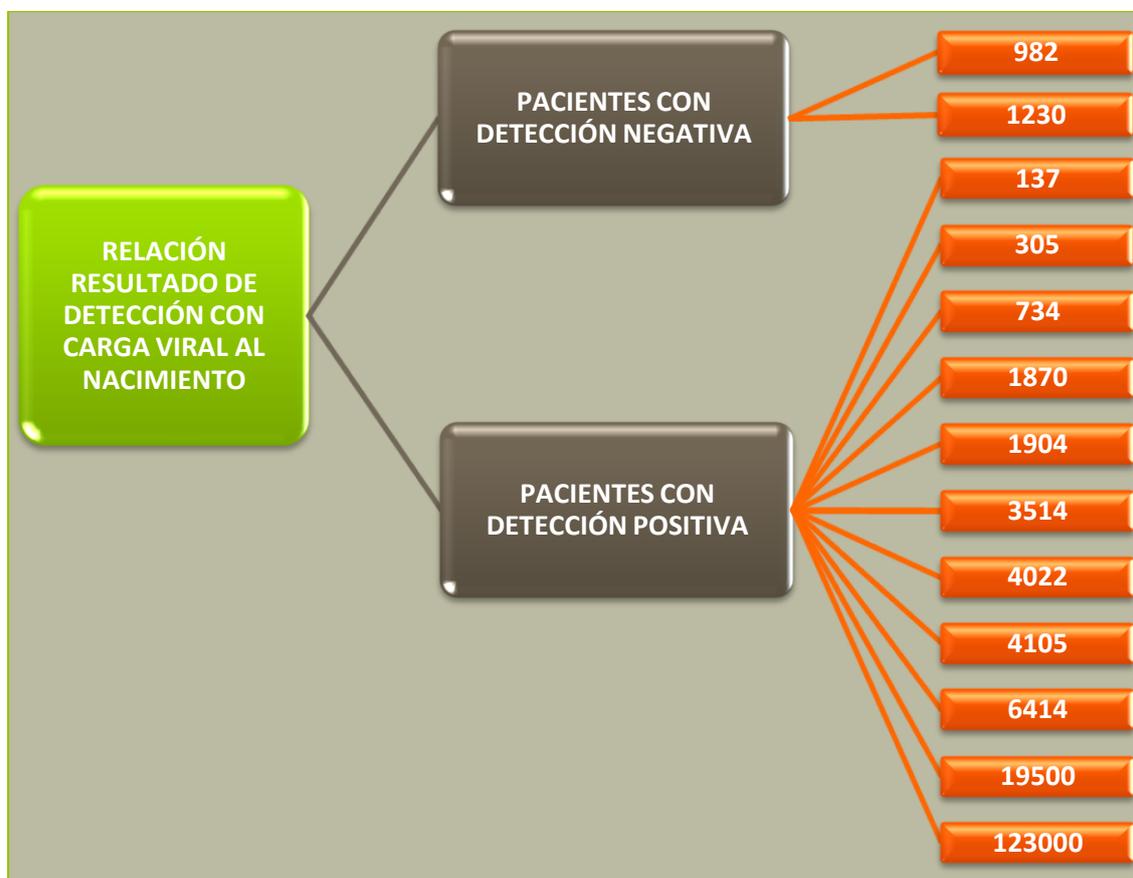


Figura 4. Relación resultado de detección con carga viral al nacimiento

Aunque es evidente que la media de carga viral en el grupo de los positivos es significativamente superior a la de aquellos en los que la detección ha resultado negativa al ser los grupos tan pequeños la diferencia no resulta estadísticamente significativa.

En dos pacientes con carga viral baja (137 UI/ml y 305 UI/ml) el resultado de la detección ha sido positivo. En uno de los casos (carga viral de 137 UI/ml) el análisis ha sido muy próximo al nacimiento puesto que se trata de una prematura extrema que está ingresada actualmente en la unidad con 2 meses y medio. El otro (305 UI/ml) presenta también una carga viral muy baja y se ha analizado a los 36 meses desde su extracción.

Si en lugar de tener en cuenta la media de carga viral al nacimiento de forma global los **dividimos en dos grupos según carga viral al nacimiento inferior o igual o superior a 1500 UI/ml**, cifra referida en la literatura en numerosos trabajos obtenemos los siguientes resultados:

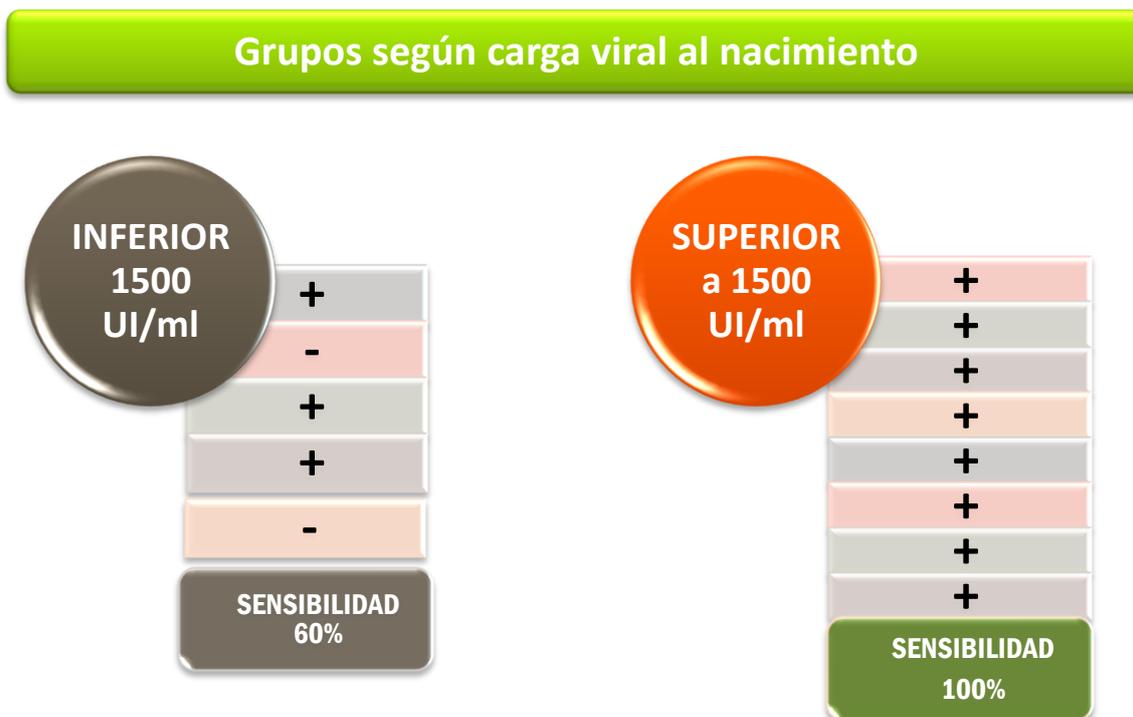


Figura 5. Relación resultado de detección con carga viral al nacimiento

-Los pacientes con una carga viral al nacimiento inferior a 1500 UI por mililitro son 5 casos (casos 6, 8, 10, 12,18). La detección ha sido positiva en tres y negativa en dos, con lo que se estima una sensibilidad en torno al 60% cuando la carga viral es baja.

-Los pacientes con una carga viral al nacimiento superior a 1500 UI/ml son 8 pacientes ( casos 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17) y en todos ellos la detección ha sido positiva, confirmando una muy buena sensibilidad si la carga viral es alta, en este caso de un 100%.

Se aplica la prueba de chicuadrado para comparación de variables cualitativas. Al ser tamaños muestrales tan pequeños, de 5 y 8 pacientes, no resulta válida por ser la frecuencia mínima esperada inferior a 1.



De los cinco pacientes con una carga viral “baja” (inferior a 1500 UI/ml), que son 5, en los que la detección fue positiva el tiempo que había transcurrido desde la extracción al análisis es de 2, 5, 36 y 38 meses, mientras que los otros dos en los que la detección fue negativa había transcurrido un tiempo de 54 y 58 meses respectivamente.

### 8.2.4. Relación del resultado de la detección con el tiempo transcurrido desde la extracción.

Analizando los resultados de los 15 pacientes hemos relacionado la detección positiva/negativa con el tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta el análisis de la muestra de sangre seca.



Figura 6. Relación resultado de detección con tiempo transcurrido desde extracción (meses).

-En los casos de detección negativa (3): ha transcurrido un periodo de tiempo de 54, 58 y 90 meses. La media ha sido de 67,33 +/-19,73 meses. (Mediana 58, rango 36)

-En los casos de detección positiva (12): han transcurrido 0,5, 35, 2,5, 4, 5, 24, 31, 32, 36, 38, 54 y 80 meses respectivamente. La media ha sido de 28,5 +/-23,6 (mediana 31,5 y rango 79,5). El tiempo transcurrido entre la extracción y el análisis de los casos no detectados es significativamente superior al que ha transcurrido en los casos que se han detectado (p: 0,025).

**Si agrupamos los casos de detección positiva/negativa según hayan transcurrido más o menos de 6 entre la extracción y el análisis:**

-transcurrido menos de 6 meses desde la extracción: 4 pacientes todos positivos. Cuando ha transcurrido menos de 6 meses el 100% de los casos ha sido detectado.

-transcurrido más de 6 meses desde la extracción: 11 pacientes, 3 negativos y 8 positivos. Cuando ha transcurrido más de 6 meses ha sido detectado en el 72,7%.

Aunque hay una clara diferencia entre una detección del 100% de los casos cuando transcurren menos de 6 meses con un 72,7% cuando transcurre más de 6 meses las diferencias no resultan estadísticamente significativa puesto que en la prueba de chi-cuadrado la frecuencia mínima esperada es 0,8 inferior a 1. En un caso la detección ha sido positiva a pesar de tener una carga viral baja, incluso de menos de 137 UI/mL en sangre.



Figura 7. Casos de detección positiva/ negativa según tiempo entre extracción y el análisis.

**Si agrupamos los casos de detección positiva/negativa según haya transcurrido más o menos de 36 meses entre la extracción y el análisis:**

-transcurrido menos o igual a 36 meses desde la extracción: 10 pacientes, todos positivos. Cuando han transcurrido menos de 36 meses desde la extracción en 100% de los casos ha sido detectado.

-transcurrido más de 36 meses desde la extracción: 5 pacientes, 2 positivos y 3 negativos. Cuando han transcurrido más de 36 meses desde la extracción sólo el 50% (o 40%) de los casos se ha detectado.

Hay un 100% de detección si han pasado menos de 36 meses y un 40% de detección cuando han pasado más de 36 meses, pero la diferencia no resulta estadísticamente significativa al ser los grupos pequeños y la frecuencia mínima esperada del test de chi-cuadrado de 1.

De los dos pacientes que persisten positivos pasados 36 meses en uno la carga viral es de 123000 (caso 7), la más alta de todas las cargas virales al nacimiento y presenta a día de hoy tetraparesia distónica y retraso psicomotor. Del otro paciente

desconocemos la carga viral por ser la PCR cualitativa en su momento pero presentó clínica muy importante durante el periodo neonatal (caso 5).

En los tres pacientes a los que se les ha realizado esta prueba en periodo neonatal anteriormente (caso 3, caso 11) y otro en la actualidad (caso 15) han sido positivos. El caso 3 (transcurridos 90 meses) se ha negativizado y el caso 11 (transcurridos 35 meses) persiste positivo. Los tres últimos casos en los que hemos hecho la prueba muy próxima al periodo neonatal han resultado también positivos.

Hay dos detecciones que eran positivas previamente, una de diagnóstico confirmado en periodo neonatal (caso3) y otra de diagnóstico retrospectivo (caso24) que se han negativizado al repetirlas actualmente.

INFECCIÓN CONGÉNITA POR CMV DIAGNOSTICADA EN PERIODO NEONATAL			
PACIENTES	ANTERIOR	ACTUAL	
		1ª REPETICIÓN	2ª REPETICIÓN
Caso 3	+	-	
Caso 5	+	+	
Caso 6	-	INHIBICIÓN	-
Caso 7	+	+	
Caso 8	-	INHIBICIÓN	-
Caso 9	+	+	
Caso 10	-	INHIBICIÓN	+
Caso 11	+	+	
Caso 12	+	+	
Caso 13	-	+	
Caso 14	+	+	
Caso 15	+	+	
Caso 16		+	
Caso 17		+	
Caso 18		+	

Tabla IV. Infección congénita por CMV diagnosticada en periodo neonatal.

### **8.3 DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN ENCEFALOPATIAS PRENATALES DE CAUSA NO ESTABLECIDA**

#### **8.3.1 Flujo de pacientes afectos de encefalopatía prenatal. Proceso de recuperación de muestras.**

Los pacientes codificados en el apartado diagnósticos como “no etiología de encefalopatía prenatal” de la base de datos de la consulta de neuropediatría son 184. Ya se ha comentado que el único criterio de exclusión es la no localización de la prueba del talón puesto que por tanto no se puede analizar. Las pruebas del talón del año 2010 están repartidas como se ha comentado entre el Hospital Clínico Universitario y el Miguel Servet. Desde Enero de 2011 todos los cribados neonatales están centralizados en el Hospital Miguel Servet. A continuación expongo el número de los que no se han podido localizar agrupados por años:

-Año 2010: en el servicio de bioquímica de Hospital Universitario Miguel Servet no se localizaron de entrada 17 talones. Uno era del propio Hospital Universitario Miguel Servet pero constaba como cedido a la sección de fibrosis por una tripsina elevada y posteriormente no había sido devuelto. De los restantes 16 se localizaron 8 en el Hospital Clínico Universitario y uno que era del 11 de Enero de 2010 constaba ya como destruido. Finalmente 9 entre ambos hospitales no fueron localizados, uno por haber sido ya destruido, otro por haberse cedido y no recuperado posteriormente y los otros 7 por mala codificación a la hora de integrarlos a la colección o por proceder de otras comunidades.

-Año 2011: 6 cartones no localizados. Tres por no poder identificar al paciente en el sistema informático y con ello no poder localizar el número ni la fecha del cartón para proceder a la búsqueda. Existe la posibilidad de que la codificación al incorporarlo a la colección no fuera adecuada o de que el cartón estuviera en otra comunidad. Otros dos

porque la caja de Junio de 2011 no forma parte de la colección (ha sido destruida por error) y otro por haberse cedido a otro servicio y no recuperarlo posteriormente.



Figura 8. Diagrama de flujo de pacientes afectados de encefalopatía prenatal de etiología no establecida por año.

-Año 2012: 3 cartones no localizados. No se identifican los pacientes en el sistema informático. Error de codificación de la muestra o procedente de otra comunidad.

-Año 2013: Un cartón no localizado. No se identifica al paciente en el sistema informático. Error de codificación o procedente de otra comunidad

-Año 2014: Todos los cartones localizados

Finalmente los talones no localizados son 19, con lo que nos queda una muestra final de 165 pacientes para análisis y estudio.

### 8.3.2. Características de la población a estudio.

A continuación se resumen las características de la población a estudio. Se trata de 165 pacientes controlados en la consulta de neuropediatría y que han sido codificados con el diagnóstico “No etiología de encefalopatía prenatal” nacidos entre el 1 de Enero de 2010 y el 31 de Diciembre de 2014.

La **edad media** a la que los pacientes han sido remitidos por primera vez para ser valorados por neuropediatría ha sido a los 20,62 +/- 12,24 meses con un rango que ha oscilado entre recibir una primera valoración durante su hospitalización en periodo neonatal, como es el caso de 4 pacientes, hasta 4 pacientes que reciben su primera valoración en la unidad pasados los 4 años de vida (uno con 4 años y 11 meses).

La **edad actual** de la población estudiada lógicamente por los criterios de inclusión oscilará entre los 10 meses y los 5 años y 10 meses, con una media de 45,51 +/-15,28 meses.

En cuanto a la **procedencia** de los pacientes, es decir desde donde han sido remitidos o desde que unidad se nos ha solicitado una interconsulta:

-32 pacientes procedían de hospitalización y han precisado una valoración por neuropediatría previo al alta y seguimiento en consulta posteriormente, lo que supone un 19,39 % del total.

-86 pacientes proceden del Centro de salud, remitidos generalmente por su pediatra. Esta es la vía más frecuente de derivación de pacientes a la consulta como es lógico, suponiendo el 52,12 % del total.

-2 pacientes (1,21%) fueron derivados desde urgencias tras hacer dicha unidad una interconsulta a neuropediatría durante su estancia en la misma.

-21 pacientes (12,72%) fueron derivados desde otros hospitales. Veinte de la comunidad autónoma y uno aislado derivado desde el servicio de neuropediatría de otra comunidad autónoma, del Hospital San Pedro de Logroño.

-7 pacientes (4,24%) fueron derivados directamente desde atención temprana, a donde les había remitido su pediatra habitualmente por retraso psicomotor.

-12 pacientes (7,27%) fueron derivados desde consultas externas, sobre todo desde neuroneonatología y desde neurocirugía.

-5 pacientes (3%) fueron derivados por lo que hemos considerado “otra vía”, refiriéndonos fundamentalmente a familiares o amigos de personal del hospital.

El **motivo de consulta** por el que han sido remitidos son los siguientes por orden de frecuencia:

-Sospecha de retraso psicomotor o del lenguaje hasta en 89 pacientes, lo que supone la primera causa y un 53,93%. En este caso mayoritariamente remitidos por su pediatra.

-Epilepsia/encefalopatía epiléptica en 22 pacientes, un 13,33%. Estas mayoritariamente recibidas a través de interconsulta durante su hospitalización.

-El tercer motivo de consulta más frecuente ha sido por sospecha de retraso psicomotor y trastorno de espectro autista en 10 pacientes (6%), remitidos sobre todo desde el Centro de salud y/o atención temprana.

-En cuarto lugar encefalopatía no epiléptica, motivo por el que se han remitido sobre todo durante su hospitalización hasta 7 pacientes, con un 4,24%.

-En quinto lugar las anomalías del tono muscular, con 7 pacientes (4,24%) y las alteraciones fenotípicas con 7 pacientes y el mismo porcentaje. A destacar una secuencia Pierre-Robin entre éstas.

-Seis pacientes (3,63%) han sido derivados desde hospitalización, centro de salud o desde la consulta de neurocirugía por macrocefalia con sospecha de hidrocefalia o con diagnóstico de ventriculomegalia prenatal.

-2 pacientes (1,21%) han sido enviados por sospecha de trastorno del espectro autista sin retraso psicomotor asociado.

-4 pacientes (2,42%) por otros motivos entre los que se incluyen: Quiste aracnoideo como hallazgo casual por una neuroimagen realizada tras traumatismo craneoencefálico, sospecha de cuadro regresivo, un estrabismo convergente aislado y un diagnóstico prenatal de disgenesia de cuerpo calloso con quiste del esplenio.

El cuanto al **sexo** la muestra se compone de 115 varones y 50 mujeres, con una proporción por tanto del 69,7 frente al 30,3%.

En cuanto a la **gestación**, 10 pacientes son producto de embarazo gemelar (6,06%) y los 155 restantes de embarazo único (93,93%). Son producto de técnicas de **reproducción** asistida 12 pacientes, uno de inseminación artificial (0,6%) y 11 de fecundación in vitro (6,66%).

Entre los **antecedentes** son hijos de padres consanguíneos 6 casos, lo que supone un 3,63% y hay antecedentes de discapacidad en familiares de primer grado en 10 pacientes (6,06%) y de segundo grado o mayor en 9 pacientes (5,45%).

El **tipo de parto** en el 76,96% (127 pacientes) ha sido vía vaginal y un 23,03 % (38 pacientes) son producto de cesárea.

Si los distribuimos por **edad gestacional** 7 pacientes son prematuros menores o iguales a 33 semanas (4,24%), 17 son prematuros tardíos (10,3%) y 141 son recién nacidos a término, lo que supone un 85,45%. La edad gestacional media en nuestra muestra fue de 38,19 +/-2,5 semanas de gestación.

<b>CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO</b>		
<b>SEXO</b>		
HOMBRES	115	69,7%
MUJERES	50	23%
<b>PARTO</b>		
VÍA VAGINAL	127	77%
CESÁREA	38	23%
<b>EDAD GESTACIONAL MEDIA</b>		
Prematuros ≤ 33 semanas	7	4,2%
Prematuros tardío	17	10,3%
Recién nacidos a término	141	85,5%
<b>EDAD</b>		
MEDIA PACIENTES	20,62 meses	
ACTUAL	10 meses - 5 años y 10 meses	
<b>BAJO PESO</b>		
Pacientes ( ≤ 2500 gramos)	30	18,2 %
Peso nacimiento < percentil 10 para edad gestacional	34	20,6 %
<b>MICROCEFALIA</b>		
Al nacimiento	14	8,5 %
Mantienen o desarrollan microcefalia en la evolución	15	9,1 %
<b>PROCEDENCIA</b>		
hospitalización	32	19,4
centro de salud	86	52,1%
urgencias	2	1,2%
otros hospitales	21	12,7%
atención temprana	7	4,3%
consultas externas	12	7,3%
otra vía	5	3%

Tabla V. Características de la población a estudio

En cuanto al peso 30 pacientes están por debajo de 2500 gramos, considerándose por tanto de **bajo peso**, lo que supone un porcentaje de hasta un 18,18%.

Consta **microcefalia** presente al nacimiento en 14 pacientes, 8,48% del total. Mantuvieron o desarrollaron **microcefalia** en la evolución 15 pacientes, un 9,09% del total.

El porcentaje de pacientes con un **peso al nacimiento inferior al percentil 10** para la edad gestacional según las gráficas de Fenton incluyendo por tanto retraso de crecimiento intrauterino y pequeños para la edad gestacional es de un 20,6%, con un total de 34 pacientes de los 165.

Un total de 57 pacientes **ingresaron en la unidad de neonatología** al nacimiento por distintos motivos, alcanzando un 34,54% del total. Los motivos por los que ingresaron y los síntomas durante el ingreso fueron diversos y en la mayoría agruparon varios síntomas. A destacar por más frecuentes los siguientes. Ocho ingresos por ictericia, asociada a CIR en uno, poliglobulia en dos e hipoglucemia transitoria en otro. Uno motivado por isoimmunización ABO precisó exanguinotransfusión. Siete por distrés respiratorio, asociado a hipoglucemia transitoria en 3 casos. Siete por hipoglucemia como síntoma principal, asociado a CIR en 3, tres hipoglucemias transitorias y una en relación con hiperinsulinismo. Cuatro con convulsiones neonatales, uno de ellos en un paciente ingresado por atresia esofágica tipo III. Tres encefalopatías, dos epilépticas, siendo una éxitus en periodo neonatal. Dos casos por hipotonía y otros dos por bajo peso. Cinco casos aislados por hematoma subgaleal importante, cataratas congénitas, secuencia Pierre Robín, artrogriposis y por diagnóstico prenatal de ventriculomegalia respectivamente. De los 17 prematuros tardíos en tres el motivo de ingreso fue también la hipoglucemia. En siete el motivo de ingreso fue la propia prematuridad, un 27s.E.G. y 580 gramos, un 27 s.E.G. y 900 gramos, un 28 s.E.G. y 680 gramos, un 29sEG y 1220 gramos, un 30 s.E.G y 1400 gramos y por último gemelos de 30 semanas y 1420 y 1170 gramos. De forma aislada el síntoma más frecuente fue la hipoglucemia transitoria, presente en 13 pacientes (7,87%) y en segundo lugar la ictericia, presente en 11 pacientes (6,66%).

En cuanto a neuroimagen, se realizó **ecografía transfontanelar** en 64 de los 165 pacientes, un 38,78% del total. Se realizó fundamentalmente en todos aquellos pacientes en los que el acceso a través de la fontanela estaba disponible. En 18 casos estuvo alterada, un 28,12% de las realizadas y un 10,9% del total. Resumo los hallazgos a continuación por orden de más a menos frecuentes:

- Ventriculomegalia, con o sin asimetría de ventrículos laterales: 6 pacientes.
- Ventriculomegalia y sospecha Dandy Walker: 2 pacientes.
- Ventriculomegalia y megacisterna magna: 1 paciente.
- Lesión focal sugestiva de ACV prenatal: 1 paciente.
- Displasia cortical difusa: 1 paciente.
- Encefalomalacia quística + ventriculomegalia: 1 paciente.
- Sangrado intraventricular: 1 paciente.
- Ventriculomegalia y quiste plexo coroideo: 1 paciente
- Megacisterna magna aislada: 1 paciente
- Quiste subependimario, ausencia septum pellucidum: un paciente.
- Forma de ventrículos laterales (VVLL) anormal: 1 paciente.
- Lesión quística posteromedial compatible con quiste aracnoideo: 1 paciente.

### ECOGRAFÍA TRANSFONTANELAR

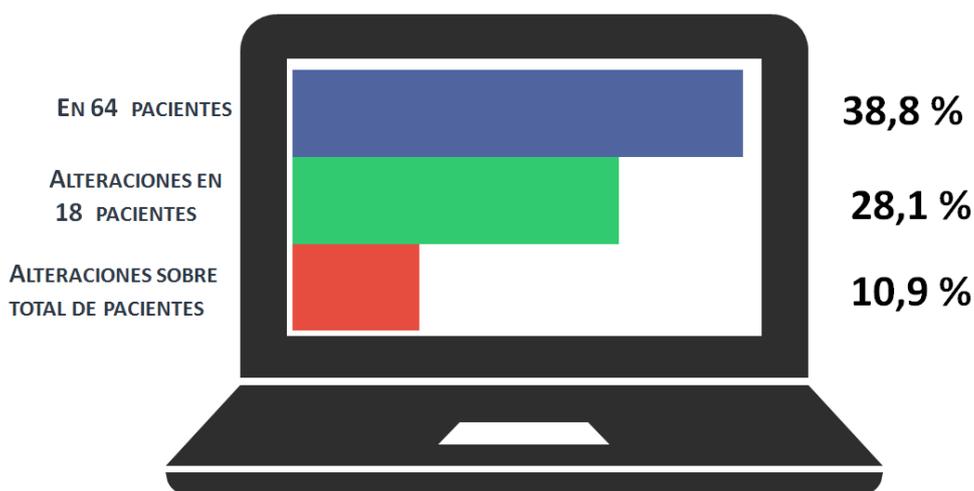


Figura 9. Características de la población a estudio en el grupo de encefalopatías prenatales.

El hallazgo más frecuente fue la ventriculomegalia, presente en 11 pacientes, 6,66% del total. En segundo lugar tres lesiones quísticas, dos sospechas de megacisterna magna y dos sospechas de Dandy-Walker.

Se realizó **Tomografía axial computerizada (TAC)** en 36 pacientes, un 21,81%. Mostró alteraciones en 13 pacientes, un 36,11% de las realizadas y 7,87 % del total de pacientes. Resumimos las más relevantes a continuación:

-Signos de atrofia en 4 pacientes, frontotemporal en tres y atrofia difusa en otro.

-Hidrocefalia en dos pacientes.

-Megacisterna magna y colpocefalia en dos casos, uno de ellos con agenesia parcial de cuerpo caloso, displasia de la hoz con quiste interhemisférico y ventriculomegalia y el otro caso con hipoplasia cerebelosa.

-Displasia cortical tipo agiria-paquigiria en un caso.

-Probable disgenesia de cuerpo caloso en otro.

-Cierre prematuro de suturas en dos pacientes.

-Quiste aracnoideo con higroma pericerebral crónico en un caso.

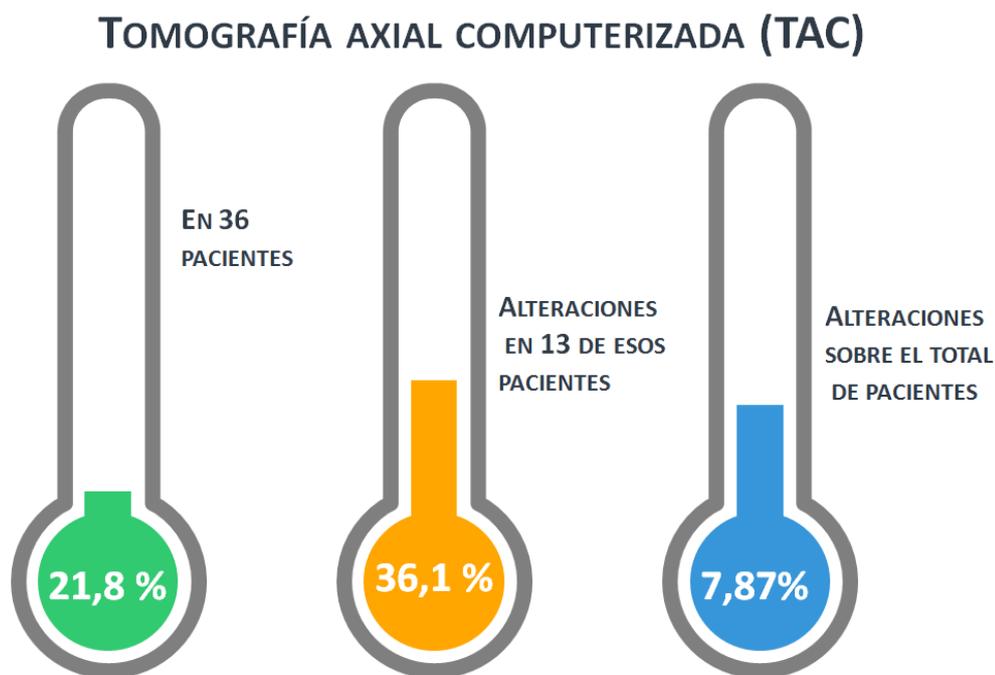


Figura 10. Tomografía axial computerizada (TAC)

En este grupo de 13 pacientes se completó el estudio con resonancia magnética posteriormente en nueve, objetivando nuevos hallazgos en siete, sobre todo en relación a disgenesia de cuerpo caloso y alteraciones de sustancia blanca.

Se realizó **resonancia magnética** craneal (RM) en 68 pacientes, un 41,21% del total de pacientes. Estuvo alterada en 32 casos, un 47,05% de las realizadas y un 19,39% del total de pacientes. Los hallazgos principales se resumen a continuación:

-Atrofia encefálica en 5 pacientes: difusa cortico-subcortical, difusa con marcado adelgazamiento de sustancia blanca, supratentorial junto a adelgazamiento de cuerpo caloso y dos atrofas frontotemporales, una de ellas junto a adelgazamiento del cuerpo caloso.

-Leucoencefalopatía en 4 pacientes, una parietooccipital bilateral junto con atrofia cerebelosa y displasia de cuerpo caloso, otra inespecífica, una hipomielinización difusa con aumento de espacios pericerebrales y un retraso global del desarrollo.

-ACV prenatal en 3 casos.

-Alteraciones de cuerpo caloso en 3 casos. Dos disgenesias (una con quiste supratentorial) y un lipoma de cuerpo caloso (con quiste aracnoideo prenatal y mega cisterna magna).

-Displasia cortical en tres casos. Esquisecefalia, agiria-paquigiria y gliosis en circunvolución frontal derecha.

-Lesiones sugestivas de isquemia connatal en tres casos. Alteración de señal en caudado y brazo anterior de cápsula interna bilateral, infarto crónico en territorio arteriolar profundo derecho, encefalomalacia quística secundaria a anoxia connatal.

-Megacisterna magna 2 casos, uno junto a discreta atrofia corticosubcortical y en otro junto a ventriculomegalia.

-Forma anormal de VVLL en 2 casos (uno con pseudoatrofia cortical frontotemporal).

-Hidrocefalia por estenosis de acueducto de Silvio en 2 casos.

-Vasculopatía estriatal en un caso.

-Quiste de la cisterna supraventricular en un caso.

- Hidrocefalia, adelgazamiento del cuerpo caloso, hipoplasia vermix cerebeloso y quiste aracnoideo en un paciente.
- Dandy-Walker en un paciente junto con disgenesia de cuerpo caloso.
- Arnold-Chiari en un paciente.

### RESONANCIA MAGNÉTICA CRANEAL (RM)

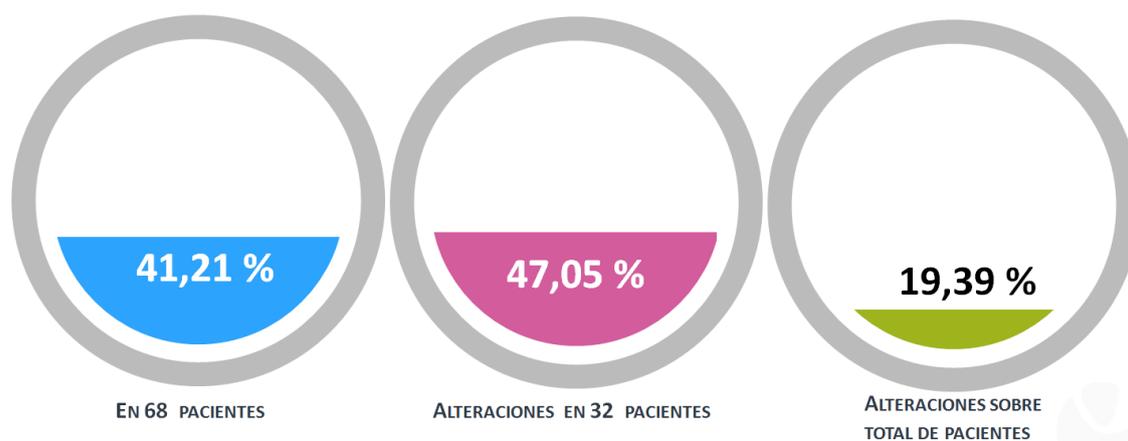


Figura 11. Resonancia magnética craneal (RM)

Las lesiones más frecuentes han sido las de disgenesia/hipoplasia de cuerpo caloso en 7 pacientes, atrófica encefálica en 7 pacientes, y leucoencefalopatías en 4 y megacisterna magna en 3 pacientes. Frecuentemente ha sido como se ha visto una combinación de las mismas.

Se realizó **exploración oftalmológica** en 77 (46,66%) pacientes, objetivándose distintas alteraciones en 23 pacientes, lo que supone un 29,87% de las realizadas y un 13,93% del total. Los principales hallazgos fueron los siguientes:

- Alteración papilar en 4 pacientes: papilas pequeñas y pálidas en 2, palidez temporal en 1 y excavación temporal en otro.
- Déficit visual en 4 pacientes, en dos de ellos con potenciales evocados visuales mal configurados y de baja amplitud.
- Disfunción cognitiva visual, asociada a retraso madurativo en 3 pacientes.
- Atrofia óptica bilateral en un caso.
- Mala fijación y/o seguimiento visual en 4 pacientes.
- Estrabismo en 7 pacientes, divergente en 2 y convergente en 5.

- Retinopatía del prematuro en dos pacientes.
- Opacidades corneales en un paciente.
- Catarata subcapsular bilateral en un paciente.

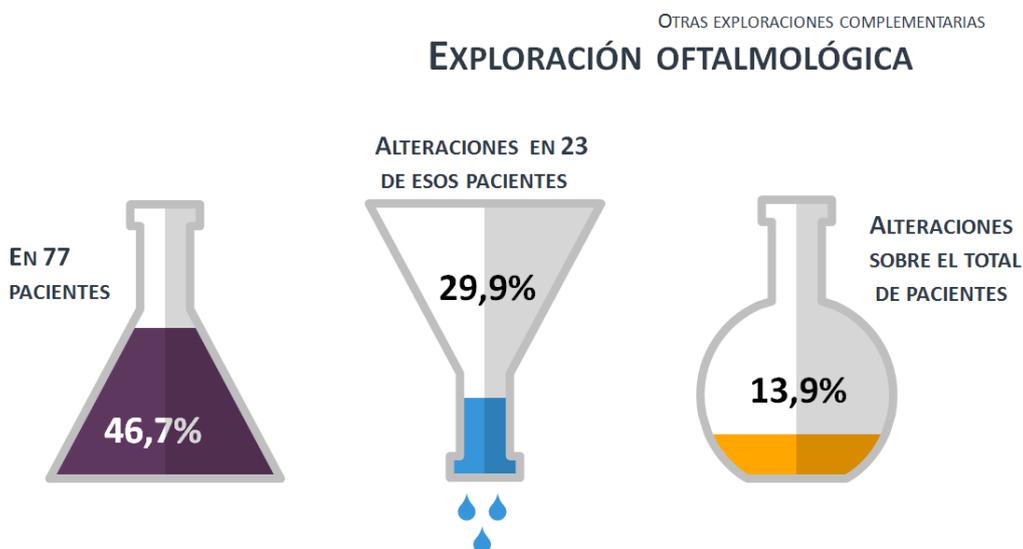


Figura 12. Exploración oftalmológica.

El **electroencefalograma** se realizó en 104 pacientes (63,03%), estando alterado en 36 casos en alguna de las exploraciones, un 34,61% de los realizados y un 21,81% del total. Fundamentalmente la alteración ha consistido en afectación de la actividad eléctrica cortical de carácter epileptógeno y en algunos casos lentificación de la actividad de fondo, demostrando hipsarritmia en dos pacientes con síndrome de West.

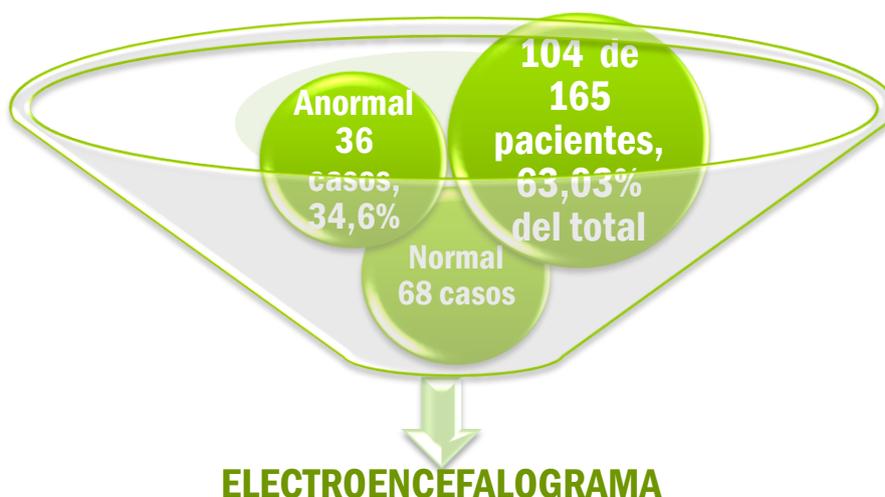


Figura 13. Electroencefalograma.

Constan **potenciales evocados auditivos** en 83 pacientes, lo que supone un 50,3% de los casos. De los 83 casos en los que se han realizado PEAT están alterados en 22, un 26,5% de los realizados y un 13,33% del total de pacientes. Resumo a continuación las alteraciones:

- Ondas de baja amplitud y escasa consistencia en un paciente.
- Hipoacusia unilateral leve, en el límite de la normalidad, en 4 pacientes con normalización posterior en uno de ellos.
- Hipoacusia unilateral moderada en 2 pacientes.
- Hipoacusia bilateral leve, en el límite de normalidad, en 8 pacientes con normalización posterior en dos casos.
- Hipoacusia bilateral moderada en 5 pacientes.
- Hipoacusia bilateral profunda en un paciente.
- Hipoacusia congénita en graves, fluctuante, en un paciente.

Es decir que ha habido 5 pacientes con hipoacusia unilateral y 13 pacientes con hipoacusia bilateral. Dos de estos pacientes, el caso de la hipoacusia bilateral profunda y la fluctuante en graves forman parte también del grupo de las hipoacusias al haberse realizados potenciales de estado estable.

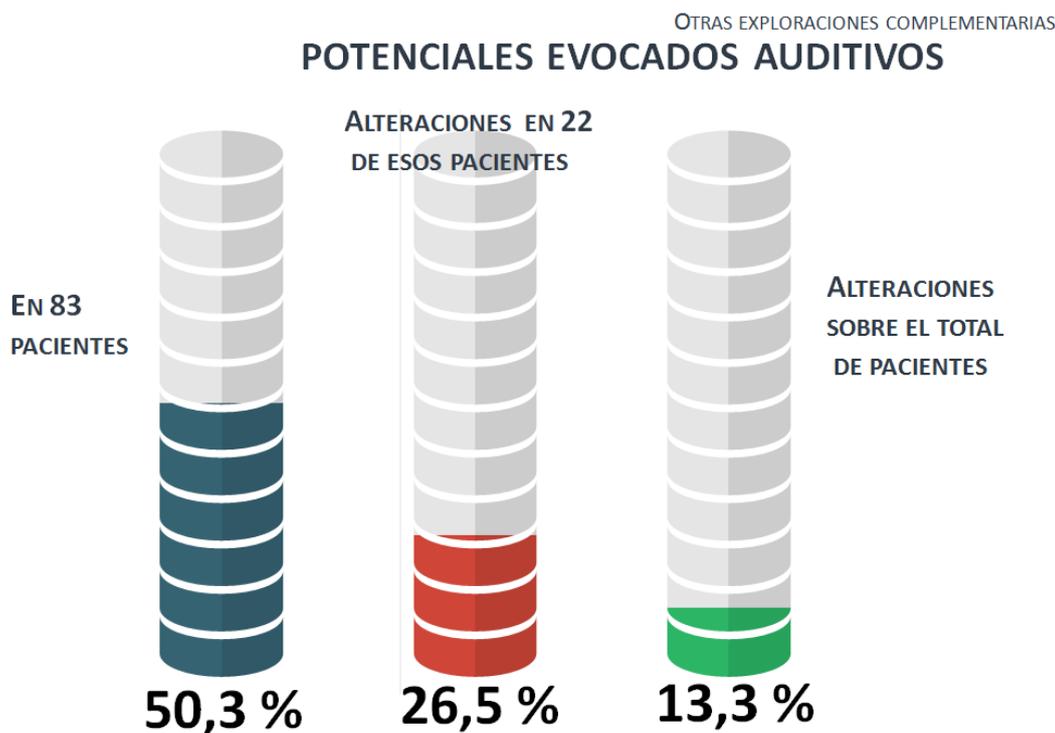


Figura 14. Potenciales evocados auditivos.

Se han llevado a cabo **estudios genéticos** de algún tipo en 109 pacientes, un 66,06 % del total. Por orden de frecuencia los estudios genéticos solicitados han sido:

- cariotipo, FRAXA y CGH array en 58 pacientes, un 35,15% del total.

-cariotipo y FRAXA en 19 pacientes, un 11,51% del total.

-Cariotipo, FRAXA, CHG-array y otros estudios genéticos concretos en 19 pacientes, un 11,51% del total.

-Otros estudios genéticos de forma aislada en 8 pacientes, un 4,84% del total.

-Cariotipo en 5 pacientes, un 3% del total.

Así la prueba más solicitada ha sido el cariotipo que se ha solicitado en 101 pacientes, seguida por el FRAXA en 96 pacientes y en tercer lugar el array-CGH solicitado en 77 pacientes. El CGH-array ha dado lugar a resultados de incierto significado patológico en 7 de los pacientes, que resumo a continuación: una duplicación 7q11 (de probable significado patológico), duplicación del brazo corto del cromosoma 5p15, duplicación en la citobanda 15q11, traslocación balanceada 6:13, delección de 111 Kilobases en la región cromosómica 18q21, delección 13q33 (presente también en el padre) y un polimorfismo en el gen JRK del panel de epilepsias. En varios de ellos está pendiente el estudio de los padres.

El **diagnóstico** con el que ha sido codificado el paciente finalmente en la base de datos a criterio del facultativo neuropediatra ha sido por orden de frecuencia y agrupados en varias categorías:

-Retraso psicomotor y trastorno del espectro autista en 60 pacientes, un 36,36%.

-Retraso psicomotor aislado en 47 pacientes, un 28,48%.

-Parálisis cerebral infantil en 14 pacientes, un 8,48%.

-Retraso psicomotor, trastorno del espectro autista y epilepsia en 9 pacientes, un 5,45%.

-Retraso psicomotor, parálisis cerebral infantil y epilepsia en 6 pacientes, un 3,63%.

-Epilepsia o encefalopatía epiléptica en 5 pacientes, un 3%.

-Epilepsia y Retraso psicomotor en 5 pacientes, un 3%.

-Retraso psicomotor y parálisis cerebral infantil en 3 pacientes, un 1,81%.

-Parálisis cerebral infantil y epilepsia en 3 pacientes, un 1,81%.

-Retraso psicomotor, trastorno del espectro autista y parálisis cerebral infantil en un paciente, un 0,6%.

-Trastorno del espectro autista, parálisis cerebral infantil y epilepsia un paciente, un 0,6%.

Tras varias valoraciones se han codificado como dentro de la normalidad por evolución muy favorable a 11 pacientes, un 6,66%. De forma aislada el diagnóstico que ha resultado más frecuente ha sido el retraso psicomotor, con 131 pacientes, 79,39% de los casos, seguido por el trastorno del espectro autista con 71 pacientes, 43% del total.

La **carga asistencial** que han supuesto estos pacientes se ha valorado en el número de consultas, de informes y de ingresos. La media de consultas por paciente ha sido de 4,8 con un máximo de hasta 30 consultas en un caso. El número medio de ingresos ha sido de 0,56 por paciente de forma que 104 pacientes no han ingresado en ninguna ocasión, 43 han ingresado en 1 ocasión, 7 en dos ocasiones, 6 pacientes en tres, tres pacientes en 4 y un paciente hasta en 5 ocasiones. Sólo se ha realizado informe médico desde la consulta de neuropediatría en 51 pacientes, un 30,9% de los casos. En 36 pacientes se ha realizado un informe, en 9 pacientes dos, en 5 pacientes tres y en 1 paciente 4 informes, lo que supone un total de 73 informes emitidos desde la consulta. Las visitas en la consulta de neuropediatría han sido con una frecuencia anual en 21 pacientes, bianual en 48 pacientes (lo más frecuente), semestral en 4, cuatrimestral en 22, trimestral en 25, bimensual en 19, y mensual en tres pacientes.

### **8.3.3. Resultados de la detección de DNA de CMV en el grupo de las encefalopatías de etiología no establecida.**

Dentro del grupo de las encefalopatías de causa no establecida en 6 pacientes ya constaba descartado el CMV mediante PCR en sangre u orina o cultivo de orina en periodo neonatal. Estos 6 pacientes se han utilizado como controles negativos para

nuestra propia técnica, siendo en los 6 la detección de CMV en la muestra de sangre seca de la prueba del talón negativa en la actualidad.

Previamente a este estudio ya se había solicitado la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del talón por asociación de síntomas y signos sugestivos de la infección congénita en algunos pacientes. Concretamente del grupo de las encefalopatías ya estaba realizado en 12 pacientes, pero dos de ellos no han sido incluidos al no estar disponible la prueba del talón. De estos 10 restantes en los que ya constaba un resultado negativo de la prueba, al repetirla uno ha resultado positivo en dos ocasiones. Se trata del paciente que se expondrá a continuación.

Globalmente de los 165 pacientes del grupo de las encefalopatías sólo se ha obtenido una detección positiva, siendo por tanto los 164 restantes negativos. Se trata de un paciente al que por sospecha clínica de posible infección congénita por CMV ya se le había solicitado la detección de CMV en la prueba del talón con anterioridad, resultando en aquella ocasión negativa.

La carga viral del talón en este paciente ha sido de 237 UI/ml. Se ha procedido a confirmar dicho resultado repitiendo la determinación y se ha obtenido de nuevo detección positiva.

A continuación se describen las características de este paciente, que denominamos **caso clínico número 31.**

Paciente remitido desde la consulta de Neuropediatría de un hospital provincial a los 15 meses por hipotonía y retraso psicomotor. No presenta antecedentes familiares de interés ni consanguinidad. Producto de un parto eutócico a las 40 semanas de gestación, con peso de recién nacido de 2860, entre el percentil 3 y el 10 según las gráficas de Fenton. Apgar 9/10. No hubo incidencias en periodo peri-neonatal. No presenta microcefalia al nacimiento ni durante la evolución. Se evidencia un retraso psicomotor y rasgos autistas durante la exploración. Se solicita RM donde se objetivan signos de leucoencefalopatía, por lo que se solicita detección de CMV en la prueba del talón que se localiza sin incidencias. La detección resulta negativa, por lo que en un principio se descarta la infección congénita. Se completa estudio con perfil neurometabólico básico y fondo de ojo que resultan normales. No se solicitan EEG ni PEAT. Se solicitaron los siguientes estudios genéticos: cariotipo, estudio del síndrome de X-Fragil, Array CG y Prader Willis que resultaron negativas. Ha entrado en programa de atención temprana y

hasta la fecha se le ha visto en consulta 7 veces, no motivando ningún ingreso. No se ha realizado informe médico de momento. Actualmente tiene 2 años y 10 meses y mantiene retraso psicomotor y rasgos autistas. La detección de DNA de CMV en la prueba del talón en la actualidad ha sido positiva en dos determinaciones.

#### **8.4. DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN EL GRUPO DE PACIENTES AFECTOS DE HIPOACUSIA.**

##### **8.4.1. Flujo de pacientes afectos de hipoacusia.**

El grupo de pacientes hipoacúsicos se constituye de 44 pacientes que fueron sometidos a realización de potenciales de estado estable en el Hospital Universitario Miguel Servet nacidos entre el 1 de Enero de 2010 y el 31 de Diciembre de 2014. Distribuidos por años son 12 pacientes del año 2010, 7 pacientes del año 2011, 9 pacientes en el año 2012, 9 pacientes del 2013 y 7 pacientes del año 2014.

Como único criterio de exclusión se ha utilizado también la no localización de la muestra de sangre seca del cribado neonatal por no poder llevar a cabo la técnica en estos casos. Como en el grupo de las encefalopatías, las pruebas del talón del año 2010 están distribuidas entre el Hospital Clínico y el Hospital Miguel Servet, mientras que desde Enero de 2011 se encuentran todas centralizadas en el Hospital Universitario Miguel Servet. A continuación expongo el número de las pruebas del talón que no se han podido localizar agrupadas por años:

-Año 2010. No ha sido localizado uno de los cuatro del Hospital Clínico puesto que ya se ha destruido la caja donde estaban almacenados los de Enero del 2010. Los 11 restantes (8 del Hospital Miguel Servet y 3 del Hospital Clínico) se han localizado sin incidencias.

-Año 2011. Se han localizado las 7 pruebas del talón.

-Año 2012. Dos de los pacientes no aparecen en el sistema informático Modulab, por lo que ha sido mal codificado en el momento de introducir los datos o ha nacido en otra comunidad autónoma o país. Los 7 restantes se localizan sin incidencias.

-Año 2013. Se han localizado las 9 pruebas del talón.

-Año 2014. Se han localizado las 7 pruebas del talón.

Finalmente por tanto son 41 pacientes de aquellos que se ha localizado la prueba del talón y los que constituyen la muestra definitiva.



Figura 15. Flujo de pacientes afectos de hipoacusia.

#### 8.4.2. Características de la población a estudio.

La muestra se compone finalmente de 40 pacientes porque uno de los potenciales auditivos de estado estable son normales. En cuanto al **sexo** son 22 hombres y 18 mujeres, lo que supone una proporción de un 55 % frente a un 45%.

La **edad** a la que han sido valorados por primera vez por el servicio de otorrinolaringología de los dos hospitales de referencia (Hospital Clínico Universitario y Hospital Miguel Servet) en 1 paciente es al mes, 11 pacientes a los 2 meses, 11 pacientes a los 3 meses, 6 pacientes a los 4 meses y 3 pacientes a los 5 meses. Fueron valorados por primera vez pasados el medio año los 8 restantes, 3 pacientes a los 7 meses, 1 paciente a los 11 meses, dos pacientes a los 17 y 18 meses y otros dos a los 26 y 31 meses. La mediana para una primera valoración es de 3 meses, con un rango entre 1 y 31 meses.

La **edad actual** de los pacientes oscila entre los 12 y los 69 meses con una media de 41,43 +/- 17,91 meses (mediana 44).

La **procedencia** de los pacientes es desde el propio hospital en 28 casos, lo que supone un 70%. Desde consultas externas 4 (10%) y desde otros hospitales de la comunidad autónoma han sido remitidos 4 pacientes (10 %). Desde el centro de salud se han enviado 4 pacientes, un 10 % del total.

El **motivo para remitirlos** al servicio de otorrinolaringología ha sido en 25 casos no pasar las otoemisiones acústicas, lo que supone un 62,5%. Otros 10 casos se remiten por alteraciones en los potenciales evocados auditivos del tronco cerebral (25%) y en 5 pacientes por sensación de que no oye referida por la propia familia (12,5%). Son 5 casos por tanto aquellos en los que la hipoacusia bien pasó desapercibida o fue de instauración tardía puesto que no fue detectada por el cribado auditivo, un 12,5% del total.

<b>CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO</b>		
<b>SEXO</b>		
HOMBRES	22	55%
MUJERES	18	45%
<b>PARTO</b>		
VÍA VAGINAL	29	72,5%
CESÁREA	11	27,5%
<b>EDAD GESTACIONAL MEDIA</b>		
Prematuros ≤ 33 semanas	5	12,5%
Prematuros tardío	4	10%
Recién nacidos a término	31	77,5%
Media	37,25 +/- 3,4 (24-41) semanas	
<b>EDAD</b>		
MEDIA PACIENTES	Media 1ª valoración 4,94 (1-31) meses	
ACTUAL	Media 41,43 meses +/- 17,91 , (12 – 69) meses;	
<b>BAJO PESO</b>		
Pacientes ( ≤ 2500 gramos)	8	20 %
Peso nacimiento < percentil 10 para edad gestacional	6	15 %
Peso medio	2796 +/-694 (700 – 3835) gramos	
<b>MICROCEFALIA</b>		
Al nacimiento	6	15 %
<b>PROCEDENCIA</b>		
hospitalización	28	70 %
centro de salud	4	10 %
consultas externas / otros hospitales	8	20 %

Tabla VI. Características de la población a estudio.

En cuanto a la **gestación** a destacar dos embarazos no controlados, una preclampsia con polihidramnios y 4 pacientes producto de tres embarazos múltiples (gemelar). De los embarazos múltiples uno de ellos es monocorial-biamniótico con retraso de crecimiento intrauterino de uno de los fetos, otro gemelar bicorial con resultado de feto muerto en el primer trimestre y otro gemelar monocorial monoamniótico que resulta en parto prematuro a las 31 semanas de gestación con resultado de un recién nacido muerto por transfusión feto-fetal aguda.

Son producto de **fecundación in vitro** tres paciente (7,31%), uno de ellos con donación de embrión, por lo que desconocemos los antecedentes familiares. Consta **diabetes** gestacional durante el embarazo en dos casos (4,87%). Hay **retraso de crecimiento intrauterino** constatado durante el embarazo en 4 pacientes (9,75%).

En cuanto a los **antecedentes familiares** cabe reseñar un familiar de primer grado (hermano) con retraso psicomotor (2,43%) y en dos antecedentes de hipoacusia congénita, en familiar de primer y segundo grado respectivamente (4,87%). Hay consanguinidad en un paciente (2,43%).

El tipo de **parto** en 29 pacientes ha sido vaginal, un 72,5 %, distribuidos en 25 eutócicos (62,5 %) y 4 instrumentados (10%). Los restantes 11 pacientes son producto de cesárea (27,5%).

En cuanto a la **edad gestacional**, la media ha sido de 37,25 +/- 3,39 semanas de gestación, con un mínimo de 24 y un máximo de 41 semanas de edad gestacional. Agrupándolos en rangos determinados, son nacidos a término 31, lo que supone un 77,5 %. Hay 4 pacientes prematuros tardíos, nacidos entre la semana 34 y 36, lo que supone un 10 % y otros 5 pacientes menores o igual a 33 semanas (12,5 %). Este último grupo se compone de 5 pacientes de 24, 30, 31, 31 y 33 semanas de edad gestacional respectivamente.

El **peso** medio de los pacientes ha sido de 2796 +/- 694,5 gramos, estando la mediana situada en 2975 gramos. El mínimo peso ha sido de 700 gramos y el máximo de 3835 gramos. Ha habido 8 pacientes de **bajo peso** (inferior a 2500 gramos), lo que supone un 20%. Menores a 1500 gramos, de muy bajo peso, ha habido 3 pacientes, pesando respectivamente 1450, 1280 y 700 gramos respectivamente. De extremo bajo peso, inferior a 1000 gramos, ha habido un paciente.

Se ha objetivado **microcefalia** al nacimiento en 6 pacientes (15%).

Teniendo en cuenta tanto el **crecimiento intrauterino restringido** como los pequeños para la edad gestacional ha habido 6 pacientes, lo que supone un 15% del total.

**Ingresaron** en neonatología al nacimiento 17 de los 40 pacientes (42,5 %). Ingresaron 7 pacientes por prematuridad. Un paciente de 24 semanas de gestación y 700 gramos, uno de 30 semanas y 1530 gramos, uno de 31 y 1640 gramos, uno de 31 y 1450 gramos, uno de 33 y 2250 gramos (que presentó ictericia asociada), uno de 34 semanas y 1280 gramos (CIR) y otro de 34 semanas y 2510 gramos. De los prematuros dos perdieron el bienestar fetal, precisando reanimación para estabilización. Un paciente ingresó por hipoglucemia (afecto de síndrome de Down) y tres pacientes por ictericia que respondió a fototerapia, pero objetivándose en uno de ellos hipotonía y una pequeña hemorragia de la matriz germinal y lentificación en el electroencefalograma. Seis pacientes ingresaron por distintas formas de distrés respiratorio, dos por taquipnea transitoria, uno por laringomalacia a estudio (que posteriormente es una sospecha de secuencia Charge) y otro por atresia de coanas y secuencia Charge. Otro paciente ingresó por cuadro de distrés, petequias, hepatoesplenomegalia, trombopenia y coagulopatía en contexto de infección congénita por CMV y otro paciente en contexto de síndrome de Down con distrés respiratorio, coagulopatía y trombopenia transitorias.

En función de los **síntomas** presentados el más frecuente fue el distrés respiratorio presente en 9 pacientes (22,5%), seguido por la ictericia en 7 pacientes (17,5%). A

continuación la trombopenia transitoria en 4 pacientes (10 %), la hipoglucemia también transitoria en 2 (5%) e hipocalcemia e hipotonía en un paciente (2,5%).

En cuanto a las exploraciones complementarias en primer lugar se presenta la **neuroimagen**. Tienen realizada **ecografía transfontanelar** 21 pacientes, un 52,5 %. En 17 el resultado ha sido de normalidad y en 4 hubo algún hallazgo (19 % de las realizadas y 10% del total). Las alteraciones objetivadas fueron las siguientes: una hemorragia parenquimatosa en un prematuro de 30 semanas de gestación, una hemorragia intraventricular y parenquimatosa con ventriculomegalia no progresiva en una prematura de 24 semanas de gestación, una ventriculomegalia con asimetría de ventrículos laterales en una recién nacida a término y 3 con una discreta ventriculomegalia sin otras alteraciones.

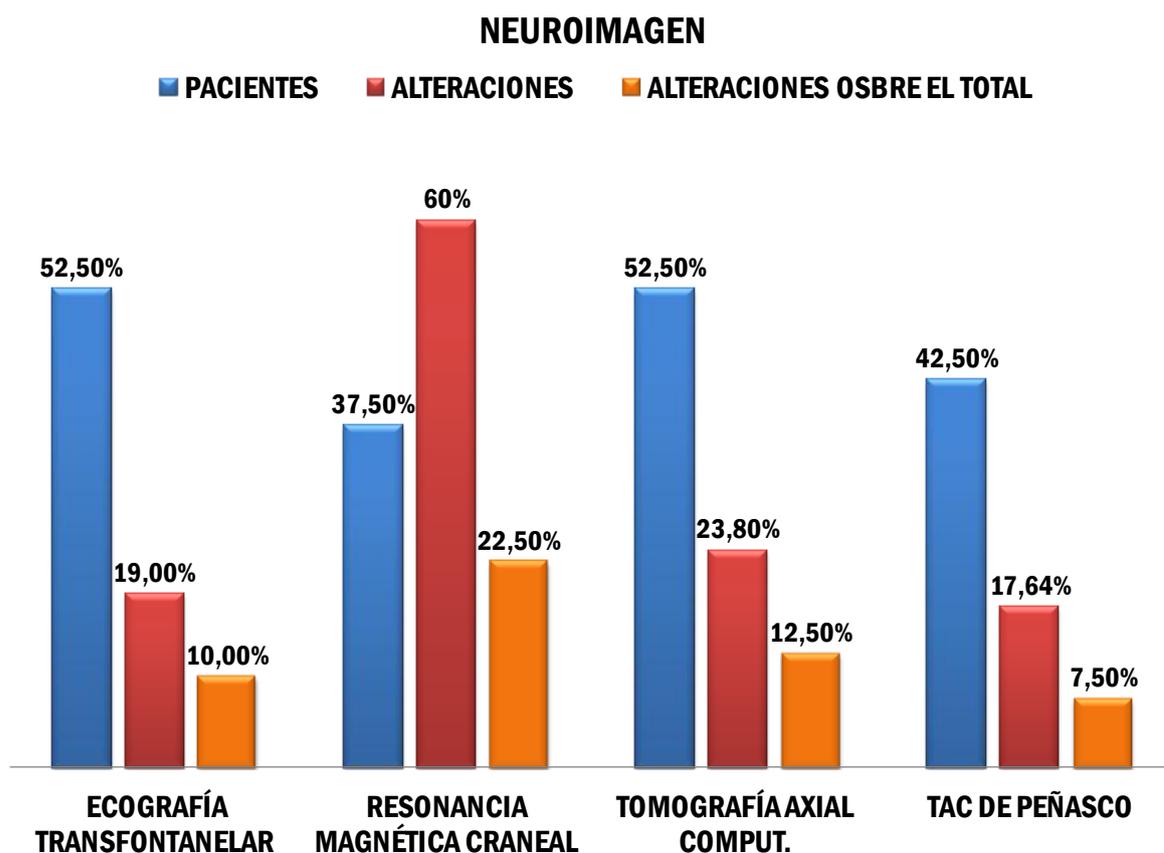


Figura 16. Exploraciones complementarias Neuroimagen.

Consta realizada **resonancia magnética craneal** en 15 pacientes (37,5 %), resultando alterada en 9 de ellos (60% de las realizadas y 22,5% del total). Como hallazgos relevantes presento los siguientes: un quiste aracnoideo de fosa posterior con malrotación de hipocampo izquierdo y dudosa atrofia fornix ipsilateral, una atrofia frontal, una aplasia coclear bilateral, una agenesia parcial de cuerpo calloso con colpocefalia en principio secundaria, una ventriculomegalia secundaria a atrofia parenquimatosa, hemorragia de matriz germinal derecha con restos de hemosiderina intraventricular y en hemisferio cerebeloso, una polimicrogiria parietal y occipital con dilatación de astas temporales, atrofia de lóbulos temporales y extensa afectación de sustancia blanca, otra con pequeñas áreas hiperintensas en astas posteriores sugestivas de isquemia connatal y por último una extensa alteración de sustancia blanca tanto subcortical como yuxtacortical con probable afectación de núcleos grises en ganglios de la base y núcleos dentados del cerebelo y patrón de espectroscopia acorde con la enfermedad de Canavan.

Tienen **tomografía axial computerizada** realizada 21 pacientes, un 52,5% del total. En 17 pacientes se ha realizado con objeto de visualizar la anatomía del peñasco previo a la colocación del implante coclear. En 5 casos ha habido hallazgos que resumo a continuación: una ventriculomegalia, una hidrocefalia de ventrículos laterales y tercer ventrículo (secundaria a meningitis), una aplasia de conductos semicirculares y atrofia frontal, una aplasia coclear bilateral y una malformación de Mondini bilateral. Otro paciente tiene pendiente la realización del TAC de peñascos. En cuanto a patología otológica el TAC de peñasco ha sido realizado en 17 pacientes y ha identificado 3 alteraciones, lo que supone un 17,64% de los realizados.

Refiriéndonos al resto de exploraciones complementarias consta realizada **revisión oftalmológica** en 24 pacientes, un 60%. Han mostrado alguna alteración en la misma 8 pacientes, lo que supone un 33,3% de las realizadas y 20% del total. Se resumen a continuación: un estrabismo convergente, un paciente con ausencia de fijación y seguimiento visual, una retinopatía del prematuro, un nistagmus vertical congénito, dos casos de coloboma (uno además con atrofia óptica y déficit visual) y una atrofia óptica bilateral.

Tienen realizado **electroencefalograma** 16 pacientes (40%) objetivándose alteración en 4 de ellos (un 25% de los realizados y un 10% del total). Un paciente afecto de encefalopatía prenatal que muestra alteración de la actividad de fondo con signos de dismadurez, una prematura extrema con ondas lentas hipervoltadas en región temporal izquierda, un paciente que presenta hipotonía y lentificación de la actividad de fondo, y un paciente con hidrocefalia secundaria a meningitis que presenta intensa desorganización con actividad epileptógena.

### OTRAS EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS

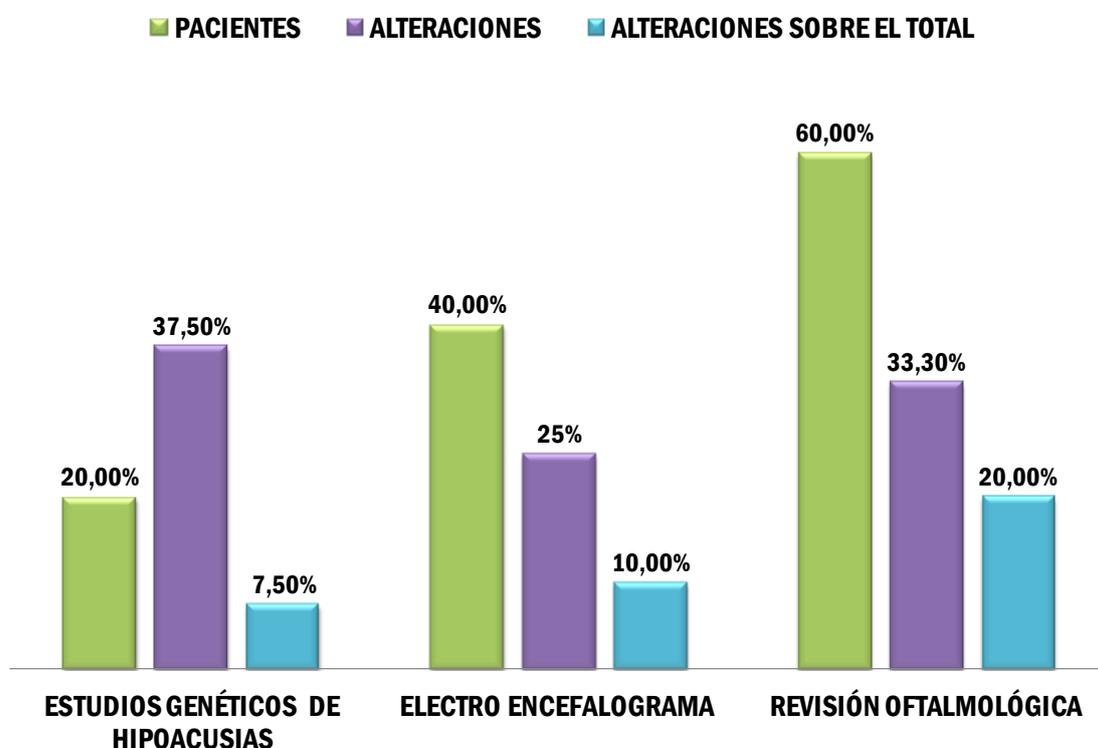


Figura 17. Otras exploraciones complementarias.

Se han realizado **estudios genéticos** de hipoacusias en 8 pacientes (20%), siendo los resultados positivos en 3 casos (37,5% de los realizados y 7,5% del total), negativos en 3 y pendientes de resultado 2 de los casos. En los negativos se han descartado en uno de ellos las mutaciones de las conexinas (gen GJB2, gen GJB6), gen de la otoferlina y mutaciones del RNA mitocondrial, estando pendiente completar la investigación y en otro se ha descartado mutaciones en el gen GJB2, GJB6, otoferlina y SLC26A4,

quedando pendiente de completar el estudio. En el caso de los positivos las mutaciones detectadas son las siguientes:

- mutaciones c.35 delG (p.Gly12ValfsX1) y p.Val37Ile (c.109G>A) en el exón 1 del gen GJB2, en doble heterocigosis (diagnóstica).

- dos cambios nucleotídicos c.8548C>T (p-Arg2850) y c.4642G>A (p.Ala1548Thr) gen MYO15a. Recomiendan estudios de co-segregación. Variante heredada del padre, portador y C8548c>T parg2850 gen MYO15A en madre y niña. Heterocigosis.

- dos mutaciones gen GJB2 (c.35 delG, pérdida de guanina y sustitución de glicina por valina y codón stop), GJB6 (D-13518306, pérdida de 246 Kb y una proteína truncada).

El paciente excluido inicialmente por no haberse localizado la prueba del talón presenta también 2 mutaciones, DFNB1 c.35 delG.pglyc 12 valfs GJB2 y otro alelo D135135183 del gen GJB6, siendo ambos padres heterocigotos.

Además se han realizado otros estudios genéticos en 10 pacientes, en aquellos pacientes afectos de dismorfia o con retraso psicomotor. Cariotipo y CGH array en 7 pacientes, síndrome de X-Fragil en un paciente y genética de síndrome de Charge en dos pacientes, resultando una genética de síndrome de Charge positiva, dos CGH-arrays pendientes y el resto negativos. Los pacientes con síndrome de Down han sido confirmados con cariotipo.

#### **8.4.3. Detección de DNA de CMV en el grupo de pacientes hipoacúsicos.**

Dentro del grupo de las hipoacusias en 3 pacientes ya constaba descartado el CMV mediante PCR en sangre u orina o cultivo de orina en periodo neonatal. Estos 3 pacientes se han utilizado como controles negativos para nuestra propia técnica, siendo en los 3 la detección de CMV en la muestra de sangre seca de la prueba del talón negativa en la actualidad.

Previamente a este estudio ya se había solicitado la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del talón por asociación de síntomas y signos sugestivos de la infección congénita en algunos pacientes. Concretamente en grupo de pacientes con hipoacusia ya estaba realizado en cuatro, resultando con anterioridad los 4 negativos.

Entre estos cuatro está incluida una de las 15 infecciones congénitas por CMV confirmada en periodo neonatal en la que detección de CMV en el talón realizada con anterioridad había salido negativa (caso clínico número 6) y una sospecha de CMV congénito pasado el periodo neonatal que no se pudo confirmar al ser la detección en el talón negativa en su momento (caso clínico número 30). En el caso de la infección congénita confirmada en periodo neonatal la detección en la actualidad vuelve a ser negativa, constituyendo por tanto un falso negativo de la técnica (caso número 6). El otro caso en el que se sospecha una infección congénita pero que no pudo ser confirmada en su momento el resultado en la actualidad vuelve a ser negativo, con lo que no podemos confirmar ni excluir la infección congénita (caso número 30). Los dos restantes en los que ya constaba un resultado negativo de la prueba, al repetirla uno ha resultado negativo y otro positivo. Se trata del paciente que se expondrá a continuación.

Globalmente de los pacientes del grupo de las hipoacusias se ha obtenido una detección positiva siendo por tanto los 40 restantes negativos. Se trata de un paciente al que por sospecha clínica de posible infección congénita por CMV ya se le había solicitado la detección de CMV en la prueba del talón con anterioridad, hace 5 meses, resultando en aquella ocasión negativa. A continuación expongo el caso de la paciente, que llamamos **caso clínico número 32**.

### **Caso clínico número 32.**

Paciente producto de embarazo gemelar bicorial con resultado de un feto sin latido en el primer trimestre de gestación, sin otras incidencias. Padres consanguíneos de segundo grado. Como antecedentes de interés presenta un abuelo y dos primos con sordera profunda. Parto eutócico a las 38 semanas de gestación. Peso de recién nacida 2800 gramos, talla 49 cm y perímetro cefálico de 33,7 cm. Periodo neonatal normal, sin precisar ingreso ni mostrar sintomatología. Remitida a otorrinolaringología a los 2

meses por otoemisiones negativas al nacimiento y potenciales evocados auditivos sin respuesta bilateral. Presenta además retraso psicomotor con nistagmus congénito bilateral que se acentúa a partir del cuarto mes, con exploración oftalmológica por otra parte normal. A la exploración además del nistagmus se objetiva hipotonía axial. Hasta el momento en la consulta de neuropediatría se ha llevado a cabo perfil neurometabólico completo incluidos CDT, ácidos grasos de cadena muy larga, sulfiteo y biotinidasa que han resultado normales. En cuanto a neuroimagen presenta ecografía transfontanelar, TAC y RM normales. Se ha completado el estudio con electroencefalograma, electromiograma y electroneurograma que son normales. El estudio genético de hipoacusias y CGH-array está pendiente. La paciente en la actualidad tiene 12 meses, mantiene discreta hipotonía y ligero retraso psicomotor y presenta una hipoacusia bilateral profunda pendiente de colocar el primer implante tras la realización del TAC de peñasco que ha resultado normal.

La detección en esta paciente ha sido positiva, pero antes de dar un diagnóstico a la familia se ha decidido confirmarla en una segunda determinación que ha resultado negativa. Se han solicitado además serologías de CMV resultando una IgG negativa, con lo que queda descartada la infección y se trata por tanto de un falso positivo.

Así, finalmente de 40 pacientes con hipoacusia hemos detectado un falso positivo y no hemos detectado con la técnica un caso confirmado (caso 6) ni un caso probable (caso 30). El resto de detecciones han sido todas negativas.

#### **8.4.4. Clasificación y aproximación etiológica del grupo de pacientes con hipoacusia.**

##### ***8.4.4.1. Clasificación en función de gravedad y lateralidad***

La muestra consta de 40 pacientes como ya hemos comentado previamente. Uno presenta una hipoacusia transitoria siendo los potenciales de estado estable finalmente normales.

Según el **tipo** de hipoacusia quedan clasificados de la siguiente manera:

-Hipoacusia mixta, con componente de transmisión añadido, en 3 pacientes. En este grupo dos muestran hipoacusia severa bilateral y uno moderada izquierda.

-Hipoacusia neurosensorial en 37 pacientes.

Según el **umbral auditivo** que presentan se clasifican por gravedad en:

-Hipoacusia profunda: 22 pacientes.

-Hipoacusia severa: 11 pacientes.

-Hipoacusia moderada: 6 pacientes.

-Hipoacusia leve: 1 paciente.

En función de la **uni o bilateralidad** la muestra se divide en:

-Hipoacusia unilateral: en 5 pacientes. En tres pacientes se ha localizado en oído izquierdo y en dos en el derecho. En este grupo han sido en cuanto a severidad de la hipoacusia 2 profundas, 2 moderadas y una leve.

-Hipoacusia bilateral: en 35 pacientes. En este grupo han sido en cuanto a gravedad 20 profundas, 11 severas y 4 moderadas, siendo una de estas últimas asimétrica.

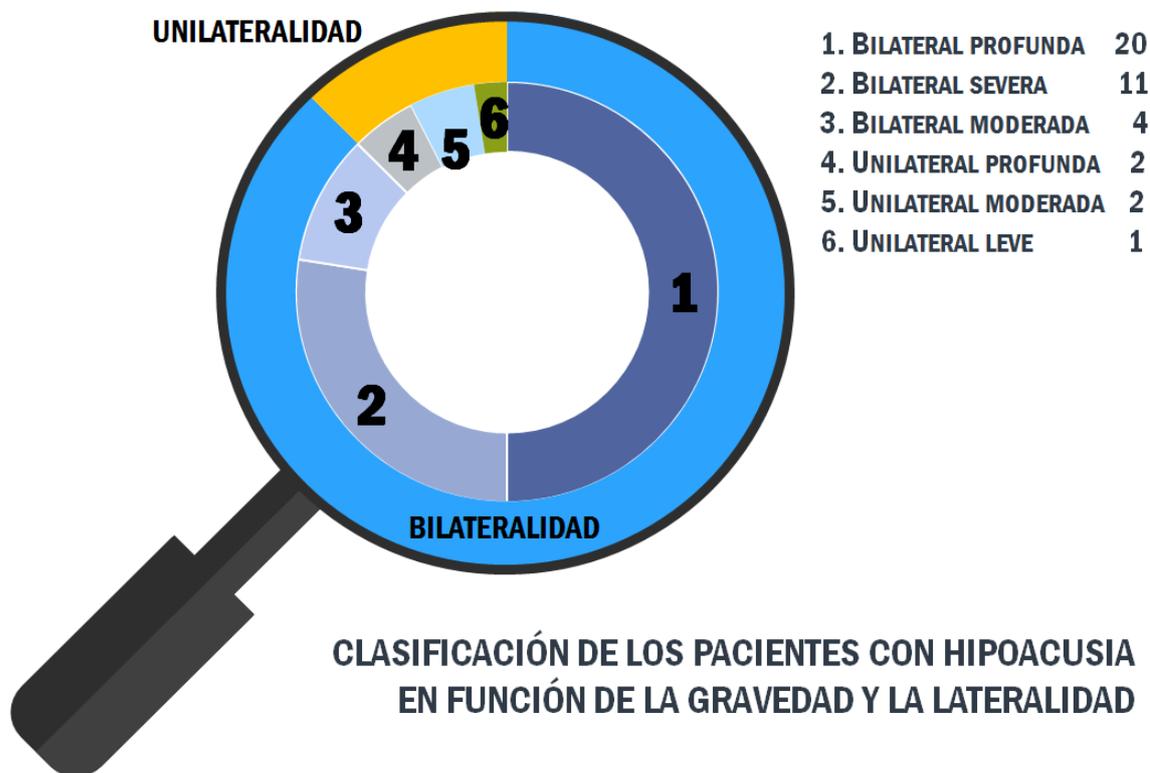


Figura 18. Clasificación de los pacientes con hipoacusia en función de la gravedad y la lateralidad.

La hipoacusia ha presentado progresión en 5 pacientes y ha presentado fluctuaciones en 7 pacientes.

Se ha presentado de forma aislada exclusivamente en 17 pacientes. Presentan un ligero retraso psicomotor con alteración fundamentalmente del lenguaje 9 pacientes, entre los que se incluyen 4 de los prematuros y otros 5 pacientes. Se ha presentado junto a retraso psicomotor importante en 14 pacientes. De estos 14 pacientes con retraso psicomotor se ha asociado a afectación generalizada muy importante en tres pacientes. Uno con meningitis en periodo neonatal, una enfermedad de Canavan y una encefalopatía prenatal severa. Formando parte de distintos síndromes en 6 casos, 3 síndromes de Down, dos síndromes de Charge y un síndrome polimalformativo no filiado. Dos con trastorno generalizado del desarrollo. Una infección congénita por CMV ya conocida, otra paciente con nistagmus y pendiente de definir la infección congénita por CMV. Y por último un prematuro de 31 semanas y 1640 gramos sin otros factores de riesgo.

Los pacientes han precisado diversos **tratamientos**. Han precisado prótesis auditivas 10 pacientes, dos unilaterales y 8 bilaterales. Uno de los pacientes de este grupo además porta drenajes transtimpánicos. Dos de las bilaterales están a la espera de trasplante coclear en la actualidad. Han precisado implante coclear 17 pacientes, la mayoría con hipoacusia profunda. En 14 casos el implante es bilateral y en tres unilateral. Un paciente lleva combinado un implante unilateral con una prótesis contralateral. Actualmente además otros tres pacientes están a la espera de implante coclear, además de los dos portadores de audífonos. Ocho pacientes no tienen tratamiento específico. De estos 8 pacientes, cuatro pacientes por su severa afectación basal no portan prótesis ni implante coclear, un paciente porque no tiene hipoacusia finalmente, un éxitus y dos pacientes por un seguimiento muy irregular. Tres pacientes únicamente han recibido drenajes transtimpánicos y/o amigdalectomía.

#### 8.4.4.2. Aproximación etiológica de los pacientes con hipoacusia.

A continuación se expone una **aproximación etiológica** de la hipoacusia. En primer lugar se analizan las exploraciones dirigidas a buscar un posible origen a la hipoacusia. Se tienen en cuenta finalmente 40 pacientes porque en uno finalmente los potenciales auditivos de estado estable han sido normales.

-En cuanto a una prueba de imagen del **oído interno** son 17 pacientes los que tienen hecho un TAC de peñasco para descartar anomalías previo a la colocación de implante coclear. Esta exploración complementaria ha dado lugar a **tres** diagnósticos: aplasia de conductos semicirculares, una aplasia coclear bilateral y una malformación de Mondini bilateral. Así las anomalías del oído interno han supuesto en esta serie un 7,5%.

-Constan estudios **genéticos** de hipoacusia sólo en 8 pacientes. Las causas genéticas parecen ser responsables en **3** de nuestros pacientes (37,5 % de los casos en que se ha solicitado el estudio genético), con las mutaciones previamente descritas, lo que supone de momento un 7,5 % del total. El paciente que no se ha incluido en el estudio por no haberse podido localizar el talón también es una hipoacusia genética, con lo que este porcentaje ascendería a 10 %. Están pendientes los resultados de 2 estudios genéticos de hipoacusia. Además hay dos pacientes con antecedentes de hipoacusia en un primo y en la madre y hermana respectivamente en los que por motivos que no constan no se ha realizado estudio genético.

-Infección congénita por **CMV**. Son 1 caso confirmado (caso 6), una alta sospecha que no se ha podido confirmar con nuestro trabajo (caso 30) y una detección positiva que finalmente se ha considerado un falso positivo (caso 32). El caso clínico 6 confirmado en periodo neonatal se ha considerado un falso negativo de la técnica. El caso clínico 32 confirmado durante el estudio actual finalmente se ha considerado un falso positivo al existir dos resultados contradictorios y una IgG negativa. El caso clínico 30, una sospecha de infección congénita por CMV, no pudo confirmarse en su

momento puesto que había pasado el periodo neonatal y la detección de DNA de CMV en la prueba del talón tal y como se ha referido fue negativo y lo ha sido de nuevo.

El número de infecciones congénitas confirmadas por CMV en la serie ha sido de 1, lo que supone un 2,5%. Hay otra infección congénita probable, alcanzando un 5%.

-Se ha presentado asociada a fenotipo peculiar, dismorfia facial y diversas asociaciones en 6 pacientes. Tres pacientes con síndrome de Down, uno de ellos con agenesia de cuerpo calloso. Dos pacientes con síndrome de Charge pero sólo uno de ellos con confirmación genética. Otro paciente presenta un síndrome polimalformativo, con dismorfia facial marcada, estenosis aórtica, comunicación interauricular y retraso pondoestatural, sin haberse filiado por el momento. Esto supone un 15% del total.

-Hay dos casos que pueden ser considerados secundarios a otras patologías. Un caso secundario a una meningitis estreptocócica en periodo neonatal, con unas otoemisiones previas al suceso normales y potenciales evocados sin respuesta tras el mismo. Un caso con diagnóstico de enfermedad de Canavan, una forma de leucodistrofia.

-Un caso asociado a una grave encefalopatía prenatal y parálisis cerebral infantil de etiología no filiada, incluida en el grupo de las encefalopatías.

-Hay varios casos que pueden estar asociados a la propia prematuridad con factores de riesgo añadidos. Un prematuro extremo de 24 semanas de gestación y 700 gramos, un prematuro de 30 semanas de gestación y 1530 gramos y un prematuro de 31 semanas de gestación y 1450 gramos que presentaron pérdida de bienestar fetal con necesidad de reanimación avanzada al nacimiento. Hay otro prematuro menor de 32 semanas de gestación, 31 semanas y 1640 gramos pero sin incidencias durante periodo neonatal.

Así tendríamos una etiología confirmada en tres pacientes con anomalías de oído interno demostradas por neuroimagen, tres de origen genético, un caso confirmado de infección congénita por CMV, uno secundario a una meningitis, uno secundario a enfermedad de Canavan, 2 secuencias Charge y tres prematuros menores de 32 semanas con factores de riesgo añadidos. En total son 14 pacientes que parecen tener una clara etiología. Como etiología probable serían además la genética en los dos pacientes con

antecedentes familiares de hipoacusia, una probable infección congénita por CMV, un paciente con severa encefalopatía prenatal, 3 pacientes afectados de síndrome de Down, un síndrome polimalformativo y el otro paciente prematuro de 31 semanas de gestación, en total 9 pacientes. Por tanto tenemos una posible etiología en 23 pacientes, un 57,5% y una etiología desconocida en los 17 restantes, un 42,5% del total.

## DISCUSIÓN

## 9. DISCUSIÓN

---

### 9.1. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS A PARTIR DE LA MUESTRA DE SANGRE SECA DEL CRIBADO NEONATAL.

#### 9.1.1. Infección congénita por citomegalovirus. Generalidades. Prevalencia de la infección congénita en nuestro medio.

El CMV es un virus ADN perteneciente a la familia de los herpes virus, junto al virus de Epstein-Barr, Herpes simple 1 y 2, varicela zoster y los virus herpes humanos tipo 6, 7 y 8, que está ubicuo en el medio ambiente. Como otros herpes virus tiene las propiedades biológicas de latencia y reactivación (173).

La infección por CMV es de distribución Mundial, con una prevalencia establecida de de alrededor de 0,6% en países desarrollados, como ya hemos comentado (8,21). En Estados Unidos se estiman unos 40000 recién nacidos con infección congénita por CMV anualmente (173).

Los ratios de infección congénita están en relación con la seroprevalencia de la infección en mujeres en edad fértil, de forma que en áreas de elevada seroprevalencia (80-100%) el ratio oscila entre 1 y 5%, mientras que en áreas de baja seroprevalencia (40-70%) el ratio disminuye a un 0,5-2% (21,173-175).

En España, con una seroprevalencia estimada en torno al 62,8%, con más de 490.000 nacimientos anuales y una prevalencia global estimada de infección congénita del 0,5%, el CMV afectaría a 2.450 recién nacidos cada año (12).

En el Hospital Universitario Miguel Servet, la cifra de nacimientos en los últimos 5 años es de 4630, 4491, 4205, 4143 y 4268 recién nacidos en los años 2010, 2011,

2012, 2013 y 2014 respectivamente.

El número de nacimientos en la comunidad autónoma de Aragón según cifras del Instituto aragonés de estadística, ha sido de 12940, 12610, 11980, 11662 y 11599 en los años 2010, 2011, 2012, 2013 y 2014 respectivamente. Así en nuestro centro con una media de 4347,4 nacimientos anuales en los últimos 5 años, deberíamos tener una prevalencia de 21,73 recién nacidos anuales con la infección congénita y en toda la Comunidad Autónoma de Aragón con una media de 12158,2 nacimientos anuales en los últimos 5 años la prevalencia esperada sería de 60,79 recién nacidos infectados por CMV.

En nuestro centro, en los últimos 25 años, constan 30 pacientes con diagnóstico de infección congénita por CMV, de los que como hemos referido 5 no se han confirmado. A priori, el hecho de que en 25 años se hayan identificado únicamente 25 casos confirmados hace pensar que la infección congénita por CMV permanece infradiagnosticada. Si tenemos en cuenta que además somos hospital de referencia pediátrico de la Comunidad Autónoma de Aragón y que por tanto un porcentaje elevado de pacientes es derivado, es de suponer, que una parte importante de los recién nacidos sintomáticos en periodo neonatal y los sintomáticos posteriormente, sean remitidos a nuestro centro, para valoración o tratamiento en algún momento y por tanto el número de pacientes codificados como citomegalovirus congénito debería de ser mayor.

Por otro lado, se observa que la frecuencia del diagnóstico ha ido aumentando progresivamente, de forma que entre 1990 y el 2005 se diagnosticaron solo 8 casos (de los que además 4 son solo probables) y en la última década se han identificado los restantes 22 (2 en 2007, 3 en 2008, 3 en 2009, 2 en 2010, 2 en 2011, 4 en 2012, 2 en 2013 y 4 en el 2015), acercándonos a lo esperable. Así vemos que en los últimos 5 años se han diagnosticado 13 casos, una media de 2,6 casos anuales.

Se ha comunicado que la infección es presuntamente sintomática entre un 11 y un 12,7% de los casos (4,21), con un 13,5 % de secuelas en casos asintomáticos, lo que supondría una prevalencia de enfermedad entre los infectados de un 24,5 a un 26,2%.

Aplicando estos datos a las cifras de España en su conjunto, de 2450 recién nacidos infectados anualmente, entre 269 y 311 presentarían síntomas al nacimiento y entre 2138 y 2181 estarían asintomáticos. Pero de estos asintomáticos tendrán secuelas tardías entre 288 y 294 y consiguientemente manifestarían la enfermedad por citomegalovirus entre 557 y 605 niños al año.

Trasladando los mismos datos a nuestra comunidad autónoma, de los 60 recién nacidos infectados al año, presentarían síntomas entre 6 y 7 recién nacidos al año y entre 53 y 54 estarían asintomáticos. Pero de estos asintomáticos tendrían secuelas tardías unos 7 pacientes, de tal forma que manifestarán enfermedad por citomegalovirus entre 13 y 14 niños al año. De momento, si suponemos que un número importante de pacientes de la comunidad es trasladado a nuestro hospital con las cifras presentadas anteriormente, aún en los últimos 5 años, estamos lejos de esta prevalencia.

Por último, refiriéndonos a nuestro centro, de los 21 recién nacidos infectados al año, entre 2 y 3 serían sintomáticos y entre 18 y 19 estarían asintomáticos. Pero de estos asintomáticos, entre 2 y 3 presentarían secuelas tardías, obteniendo una prevalencia de “enfermedad” por CMV de entre 4 y 6 niños anualmente.

Los 4 pacientes que se han diagnosticado en los primeros 10 meses del año 2015 se explican porque se ha iniciado la aplicación de un protocolo recomendado por la Sociedad española de Neonatología (176) de cribado sistemático de la infección adquirida por CMV en menores de 1500 gramos, entre las 4 y las 6 semanas de vida.

En nuestro hospital se ha implantado en Enero de 2015 y se acompaña de cribado de la infección también al nacimiento, por lo que se han diagnosticado, a través de cribado, dos prematuros por otra parte asintomáticos. Esta variación del protocolo está en consonancia con las recomendaciones que han sido publicadas posteriormente a este respecto por el comité científico del Registro Estatal de Infección Congénita por CMV (REDICCMV) (177).

Así, con los datos referidos anteriormente y teniendo en cuenta sólo nuestro centro el porcentaje de diagnósticos entre los años 2010 y 2014 va aumentando progresivamente, con un total de 9 pacientes en estos 5 años lo que hace una media de 1,8 al año, aunque todavía lejos del esperado.

### **9.1.2. El diagnóstico de infección congénita por citomegalovirus y la técnica de detección de DNA de Citomegalovirus hasta la actualidad.**

El diagnóstico de infección congénita por citomegalovirus en periodo neonatal depende del aislamiento o la detección molecular del virus en orina o saliva fundamentalmente, pero sólo durante las tres primeras semanas de vida. Ambas muestras tienen una excelente sensibilidad al ser la carga viral en orina y saliva muy superior a la del plasma (41,42).

Así la PCR en orina se considera hoy en día en muchos centros la técnica de referencia (31,37). El inconveniente de la saliva es que aunque es más fácil de recoger, las muestras de saliva son más susceptibles de error por tener cantidad de saliva insuficiente y son susceptibles de contaminación por CMV excretado en la leche materna, por lo que se aconseja esperar al menos una hora desde la última toma para la recogida de la muestra (117).

En nuestra muestra en cinco pacientes con diagnóstico confirmado en periodo neonatal (mediante PCR de CMV en sangre) se ha podido con anterioridad recuperar la orina congelada del periodo neonatal. Se ha llevado a cabo la PCR en orina que está recién implantada en nuestro centro y los cinco fueron positivos. Es un dato indirecto que para nosotros es muy significativo, que nos indica la elevadísima sensibilidad de la técnica en orina.

El cultivo, considerado tradicionalmente como el "gol estándar", con una sensibilidad y especificidad reportada del 100%, puede llegar a demorarse hasta 28 días y además requiere personal y recursos. El cultivo rápido, conocido como "Shell vial"

permite la identificación en menos de 24 horas, es simple y más barato pero la sensibilidad desciende al 92-100%, habiéndose comunicado falsos positivos, por lo que requiere una confirmación. En nuestra muestra de pacientes con infección congénita por CMV en periodo neonatal hubo 4 casos de cultivo de orina negativo. Posteriormente se han analizado estas mismas 4 muestras de orina con PCR con resultado positivo.

La detección molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestra una sensibilidad entre el 97 y 100% y una especificidad del 99%. Las ventajas sobre el cultivo incluyen que es más rápida, no se afecta por las condiciones de transporte y almacenamiento y bajo coste, siendo más sensible que el cultivo rápido (40).

Las muestras en sangre no se recomiendan como primera línea puesto que todos los neonatos no están virémicos al nacimiento y los test serológicos son menos sensibles y específicos que los otros métodos. En nuestro caso de los 18 pacientes con infección congénita por CMV en periodo neonatal la IgM fue positiva en 7, negativa en otros 7 y no consta en 4, mostrando solamente una sensibilidad del 50%.

Como hemos comentado previamente en nuestro centro, hasta el momento actual, se han diagnosticado 18 casos de infección congénita por citomegalovirus confirmados en el periodo neonatal. Los casos previos al año 2007 se han diagnosticado mediante cultivo viral clásico en sangre u orina. Desde el 2007 tenemos disponible la PCR y se han diagnosticado mediante PCR en sangre hasta Enero de 2015, momento en el que se instaura por protocolo la PCR el orina como método de cribado inicial.

Pasadas las primeras tres semanas de vida, ninguno de los métodos anteriores, permite diferenciar infección congénita de adquirida. El único método de diagnóstico retrospectivo es la detección de DNA en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal, cuyo papel se ha ido estableciendo en las últimas dos décadas.

En nuestro centro se han registrado 7 infecciones congénitas por CMV diagnosticadas de forma retrospectiva mediante esta técnica. La primera vez que se realizó la técnica con detección positiva fue en el año 2001 y desde entonces se han

diagnosticado otros 6 pacientes en los años 2004, 2004, 2007, 2008, 2008 y 2009. De los 7 casos de diagnóstico retrospectivo confirmado sólo hay dos que fueron completamente asintomáticos en periodo neonatal, ya que dos presentaron hepatoesplenomegalia e ictericia colestática no filiada y 3 presentaron un retraso de crecimiento intrauterino aislado sin otra sintomatología asociada. Es reseñable que estos 5 pacientes que pasaron desapercibidos, no lo habrían hecho en la actualidad porque desde el 2010 se dispone de un protocolo en la Unidad y ambas condiciones (CIR y hepatoesplenomegalia) son motivo de despistaje de la infección congénita en el periodo neonatal.

Esta técnica de detección de DNA de CMV en el papel de filtro del cribado neonatal con intención de diagnóstico retrospectivo, ha sido solicitada por nuestra parte, en un total de 51 ocasiones hasta la actualidad, obteniendo un resultado positivo en 7 casos, un 13,72% del total. Desde nuestro punto de vista esto supone una considerable rentabilidad diagnóstica que se explica porque hasta ahora ha sido solicitada de forma muy dirigida, en pacientes con sospecha de infección congénita, de forma que en los 8 casos en los que considerábamos la infección muy probable ha quedado confirmada en 7.

Hasta ahora en el grupo de pacientes con infección congénita por CMV confirmada en periodo neonatal se había realizado la técnica de detección en el papel de filtro del cribado neonatal a 12 pacientes. Tres pacientes, con la intención de completar el estudio y testar la propia técnica durante el periodo neonatal y a otros 9 posteriormente. De estos 12 teníamos resultado positivo en los 3 a los que se les hizo en el periodo neonatal y en 5 de los que se analizó posteriormente, con lo que obteníamos un total de 8 detecciones positivas sobre 12 pacientes con infección congénita, deduciendo que la sensibilidad estimada era de un 66,66%, insuficiente desde nuestro punto de vista, lo que nos llevó a revisar la literatura y profundizar sobre la técnica en sí. Los distintos motivos que pueden justificar esta sensibilidad serán analizados en los próximos puntos.

### **9.1.3. Evaluación de la técnica de detección de DNA de Citomegalovirus en la muestra de sangre seca del talón.**

#### *9.1.3.1. Valoración de la sensibilidad de la técnica.*

La detección de DNA de CMV mediante PCR en la muestra de sangre seca del papel de filtro procedente del cribado neonatal, realizado para despistaje endocrino-metabólico, es la única herramienta para diagnóstico retrospectivo de infección congénita por CMV pasadas las tres primeras semanas de vida.

Su aporte más significativo, en relación al diagnóstico virológico convencional, es la posibilidad de diferenciar si la infección es congénita o perinatal a una edad en que los análisis de la virología clásica no lo logran. Su papel se ha ido estableciendo a lo largo de los últimos 20 años, siendo utilizado por primera vez en 1994 (77). Aunque inicialmente fue propuesta como un método de diagnóstico retrospectivo posteriormente ha sido usada como cribado en numerosas ocasiones (7).

Hay acuerdo entre los distintos autores en que un resultado negativo no permite excluir infección congénita puesto que la sensibilidad comunicada está sujeta a variabilidad importante según los diversos estudios.

La sensibilidad de la técnica ha sido motivo de importante controversia, oscilando en la literatura entre cifras de un 28% hasta prácticamente un 100% en algunos estudios. Globalmente ha probado una sensibilidad superior al 95% comparado con orina y saliva cuando se aplicó a niños sintomáticos o hijos de madre con seroconversión (80,92). Sin embargo para cribado de niños no seleccionados comparados con orina o saliva, ha mostrado una sensibilidad que varía entre el 20 y el 80% (69,79,84).

En el único estudio en España, Vives-Oñós et al documentan una sensibilidad del 50% en niños con infección congénita confirmada (178). Esta técnica es laboriosa y no está estandarizada en muchos laboratorios del país. La escasa sensibilidad de la PCR en sangre seca podría ocasionar un alto porcentaje de falsos negativos en niños con infección congénita, con implicaciones en el tratamiento y seguimiento a largo plazo.

En nuestro caso los análisis se han hecho sobre un total de 15 pruebas del talón de 15 niños con infección congénita confirmada en el periodo neonatal por diversos métodos (ya referidos anteriormente). Hemos obtenido 12 detecciones positivas y 3 negativas, con lo que estimamos una sensibilidad de nuestra propia técnica de un de un 80%.

Las diferencias entre las circunstancias actuales y las previas, donde teníamos una sensibilidad de un 66,6% han sido dos.

1) Hemos añadido un buffer de lisis de un mililitro antes de la extracción (Buffer de lisis ATL (Qiagen®). Scanga en el año 2006 aplica la técnica sobre siete casos confirmados y siete controles, usando toda la muestra (10mm en lugar de 3 mm) y añaden un step con lisado adicional para aumentar el volumen recogido al igual que hemos hecho nosotros en esta ocasión. En su caso la sensibilidad y especificidad fue del 100% (73). El proceso de lisis puede incrementar la cantidad de células lisadas y así garantizar una adecuada recuperación del ADN. Para liberar los ácidos nucleicos es preciso desorganizar la estructura de paredes y membranas. Esta solución de lisis dispersa las lipoproteínas de las membranas y desnaturaliza complejos proteínicos y las sales de la solución de lisis neutralizan las cargas negativas que inician la precipitación de los ácidos nucleicos.

2) Hemos añadido nuevos pacientes, concretamente tres nacidos durante el mismo año 2015 y a los que por tanto se les ha analizado la prueba del talón a los pocos meses del nacimiento, obteniendo en los tres un resultado positivo y lo que ha contribuido a aumentar la sensibilidad de la técnica.

Se ha referido que los falsos negativos pueden ocurrir fundamentalmente en niños sin sintomatología o si ésta es escasa en periodo neonatal (84,92,150). Es importante reseñar que en nuestro trabajo hemos logrado tres detecciones positivas sobre 3 tarjetas que previamente habían resultado negativas.

Dos son infecciones congénitas por CMV confirmadas en el periodo neonatal a las que el talón previamente les había salido negativo y que por tanto fueron falsos negativos en su momento.

La otra es de un paciente del grupo de encefalopatías de etiología no establecida, el único de ambos grupos (encefalopatías e hipoacusias) en el que la detección en este trabajo ha salido positiva (caso clínico 31). Este paciente tenía la detección realizada con anterioridad por sospecha de infección congénita sin que ésta hubiera podido ser confirmada por tanto. Se ha repetido la determinación y se han solicitado serologías y PCR de CMV en orina. Ha resultado positivo en una segunda determinación y con una IgG positiva, por lo que se confirma la infección congénita siendo la vez anterior un falso negativo.

En todo caso, los resultados han de interpretarse con precaución como parte de un proceso diagnóstico y un resultado negativo no permite excluir totalmente el CMV como causa (75).

#### ***9.1.3.2. Valoración de la especificidad de la técnica.***

La especificidad según la mayoría de autores es concordante, de modo que un resultado positivo prácticamente confirma la infección. Ha sido referida una especificidad de 99-100% por numerosos grupos (7,69,79,82). Boppana et al, en el mayor cribado realizado hasta la fecha, también obtiene una excelente especificidad, cercana al 100% (84).

En nuestro trabajo como controles negativos hemos utilizado 9 pacientes en los que ya en el periodo neonatal se había descartado la infección congénita por CMV

mediante PCR y/o cultivo en orina o PCR en plasma. En todos ellos, se ha localizado la prueba del talón y se ha realizado la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca. Los 9 casos han resultado negativos, no se ha detectado DNA de CMV en ninguno de ellos, por lo que en esta pequeña muestra no hemos obtenido ningún falso positivo.

Sin embargo, en el año 2008 Barbi et al realizaron un examen externo de calidad en la detección de ADN mediante PCR en la prueba del talón en 27 laboratorios, identificando una tasa de falsos positivos de 9% y 11% de los datos, atribuyéndola a la pérdida de adherencia a las estrictas medidas de seguridad cuyo objetivo es evitar la posibilidad de contaminación y transferencia (88).

Un trabajo del año 2006 para estimar la prevalencia de la infección congénita en casos de parálisis cerebral objetivó una prevalencia de la misma de un 27,8% en los casos y un 26,6% en los controles, lo que atribuyeron posteriormente a una probable contaminación cruzada (179).

No obstante, la posibilidad de contaminación no ha sido refrendada por distintos grupos. En un estudio en el año 2009 se introdujeron 3 controles negativos en contacto con 3 positivos y fueron testados repetidamente mensualmente durante dos años sin existir contaminación (75).

También se ha atribuido como ventaja adicional de la PCR a tiempo real, que es la utilizada por nuestro laboratorio, el menor riesgo de contaminación (73). La tecnología usada en nuestro trabajo, según especificaciones propias del fabricante, refiere además que la utilización de un patrón de cuantificación y el formato de tubo cerrado garantizan la integridad de los resultados y la reducción del riesgo de contaminación (Roche Molecular Diagnostics. COBAS Ampli/Prep/COBAS TaqMan CMVTest.<http://molecular.roche.com/assays/Pages/COBASAmplifyPrepCOBASTaqManCMVTest>).

En el conjunto de los 206 pacientes, en los que se ha llevado a cabo la determinación, solamente hemos obtenido dos resultados positivos, pertenecientes uno al grupo de las encefalopatías de causa no establecida y otro al grupo de las hipoacusias. Los restantes 164 pacientes del grupo de las encefalopatías y 40 pacientes del grupo de las hipoacusias la detección ha resultado negativa, con lo cual salvo estos dos pacientes que quedan a consideración en principio no ha habido otros falsos positivos.

En los dos pacientes en los que la detección ha sido positiva se han confirmado una segunda vez con la misma técnica, resultando al repetirlos uno positivo (caso clínico 31) y el otro negativo (caso clínico 32). Finalmente, el único paciente que queda a discusión es el caso clínico número dos, en el que la detección constaba como negativa con anterioridad y que en nuestro estudio ha resultado positiva. El problema es que al tratar de confirmarla, antes de dar un resultado definitivo positivo, en la segunda ocasión el resultado ha sido negativo. Hay que tener en cuenta que la segunda vez contábamos con un volumen de muestra de sangre seca restante muy pequeño que ha podido influir en el resultado.

Se ha procedido en esta paciente a extracción analítica de serologías con la intención de confirmar una IgG positiva, ya que una IgG negativa descartaría la posibilidad de una infección congénita (51). La IgG de CMV ha resultado negativa, por lo que queda descartada una infección congénita, con lo que finalmente se ha concluido un falso positivo de la técnica. Hay que reseñar que este paciente contaba con una primera determinación negativa con anterioridad y que el resultado positivo en la actualidad es un positivo débil, que no se ha confirmado en la repetición, con lo cual en todo momento nos había hecho dudar de su positividad.

Con esto presuponemos que en el global de los 206 pacientes sólo hemos obtenido un falso positivo que además en todo momento nos había hecho dudar de su positividad, de lo que se deduce una elevada especificidad. La posibilidad de contaminación en nuestra muestra ha sido mínima, al poderse haber contaminado a lo sumo la paciente del caso clínico número 32, ya que esta es la única en la que se ha obtenido un falso

positivo. Además ni la tarjeta adyacente ni la posterior han resultado positivas y en el grupo de tarjetas analizadas a la par ha sido la única detección positiva.

### *9.1.3.3. Factores que influyen en la sensibilidad de la técnica.*

Goderis en el año 2014 concluye que efectivamente la sensibilidad de la prueba varía porque sobre todo porque las técnicas de la PCR no están bien estandarizadas entre laboratorios, influyendo en una menor sensibilidad de la prueba del talón el que la carga viral sea menor en sangre que orina (39,47,98), que puede no haber viremia al nacimiento (3) y que el tiempo de almacenamiento podría disminuir la carga viral (102).

#### a) Influencia de la carga viral en la capacidad de detección de la técnica.

Goderis et al en el año 2014 afirma que la sensibilidad de la prueba se ve influida porque la carga viral sea menor en sangre que orina (8), de forma concordante a lo objetivado por numerosos autores (39,47,98). Vauloup-Fellous et al previamente en el 2007 sugieren que la cuantificación de la carga viral de la prueba del talón está infraestimada respecto a las muestras de sangre fresca como parece razonable (85).

En nuestro trabajo, la carga viral media en el grupo en el que la detección ha resultado positiva ha sido claramente superior a la de aquellos en los que la detección ha resultado negativa, con lo que se intuye que la sensibilidad de la técnica está en relación con la carga viral que el paciente presenta al nacimiento en sangre, que en principio será proporcional aunque claramente superior a la que presenta el paciente en la muestra de sangre seca del papel de filtro.

Los valores límites de detección de DNA de CMV referidos en la literatura, en su mayoría, están en el rango de 2000-4000 copias/ml (73,81) y son mucho más altos que los obtenidos usando sangre fresca (rango de 50-500 copias/ml). Esto se debe a la cantidad de sangre extraída (50 microlitros comparada a 200-500 microlitros de sangre

fresca) y a que el protocolo de extracción usado es menos eficiente que con sangre fresca.

El estudio de calidad externa de Barbi indica que si tenemos en cuenta una media de carga viral de 2300 copias/ml al nacimiento, en las infecciones congénitas por CMV, menos del 50% de todos los laboratorios serían capaces de identificar recién nacidos congénitamente infectados, ya que sólo unos pocos laboratorios fueron capaces de detectar cargas de 730 copias/ml (88).

Nuestro trabajo ha demostrado detección positiva en la prueba del talón en un paciente que presentaba una carga viral en sangre fresca al nacimiento de 137 UI/mL (caso 18), lo que equivale según el estándar internacional a 150 copias/mL, muy por debajo por tanto de lo referido en muchos estudios.

Así hemos comprobado que con nuestra técnica somos capaces de detección positiva de CMV en la muestra de sangre seca del talón en tres pacientes en los que la carga viral en la muestra de sangre fresca era baja, inferior a 1000 copias/ml, de lo que se deduce indirectamente una buena capacidad de detección de la técnica empleada.

El punto de corte referido en algunos estudios para una detección positiva en la muestra de sangre seca ha sido una carga viral de 1500 copias/ml de sangre completa (75), comparación que resulta favorable con el estudio de calidad externo de Barbi en el 2008 donde el 50% de los laboratorios obtuvieron como valor límite 9300 copias/ml (88).

Así, el inconveniente teórico en muchos trabajos es que la sensibilidad de esta muestra no es tan baja como la descrita en la PCR convencional (1600 copias/ml frente a 400 copias/ml) (1,73,80,81). Para ello hemos subdividido nuestra muestra en aquellos en los que la carga viral al nacimiento era superior o inferior a 1500 UI/ml, equivalente a 1650 copias/ml en sangre fresca. Efectivamente, en todos aquellos que tenían carga viral superior a esta cifra (8 pacientes) el resultado ha sido positivo, lo que nos indica

buena sensibilidad de la técnica utilizada y de muy buenos resultados (el 100% de detección) con cargas virales superiores a 1500 UI/mL.

Sin embargo, en los 5 pacientes en los que la carga viral ha sido inferior a 1500 UI/ml la detección ha sido positiva sólo en el 60% (3 pacientes), cifra que va en consonancia con lo referido en otros trabajos.

Williams et al refieren que el problema entonces es que la prueba pierde sensibilidad en niños con cargas virales bajas al nacimiento ( $< 10^4$  copias/ml) (100). Sin embargo, aunque la sensibilidad in vitro puede ser relativamente baja los ratios de detección clínica son en general altos en pacientes seleccionados como hemos demostrado en nuestro estudio.

Destacamos que uno de los dos pacientes en los que la detección ha resultado positiva, pasados 36 meses desde la extracción de la muestra, tiene una elevada carga viral de 123000 UI/mL, la más alta de todas las cargas virales al nacimiento y presenta actualmente tetraparesia distónica y discapacidad cognitiva. En el otro paciente en el que la detección ha resultado positiva pasado este tiempo desconocemos la carga viral por ser la PCR cualitativa en su momento pero probablemente también tenía una carga viral alta porque presentó clínica muy importante durante el periodo neonatal.

b) Influencia del tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra de sangre seca y su análisis en la capacidad de detección de la técnica.

Parece que el tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra de sangre seca del cribado neonatal y su análisis en busca de DNA de CMV puedan estar relacionados. Scanga et al en el año 2006 confirma que es posible el diagnóstico en muestras recogidas 20 meses antes (73).

Partiendo de una supuesta estabilidad del DNA, se han obtenido resultados positivos en la detección de CMV en la muestra de sangre seca del papel de filtro del cribado neonatal incluso hasta 11 (74), 17 (75) y 18 años después (69). En el año 2009

además el porcentaje de detección por grupos de edad no parecía declinar en edades mayores (75).

En nuestro trabajo hemos obtenido detecciones positivas en muestras que fueron extraídas hace 6 años y medio (caso 5), es decir, que es posible con nuestra técnica una detección positiva a pesar de haber transcurrido varios años desde la extracción de la muestra, aunque presuponemos una alta carga viral en este paciente por la clínica presentada en periodo neonatal. Sin embargo, dos casos que se han repetido siendo previamente positivos (caso 3 de diagnóstico neonatal y caso 24 de diagnóstico retrospectivo) transcurridos 8 años aproximadamente se han negativizado con el paso del tiempo.

Hay varios autores que han demostrado un decremento progresivo de la carga viral con el tiempo. Atkinson et al en dos preparados con sangre CMV positiva obtuvo un decremento progresivo de la carga viral conforme pasaba el tiempo hasta los 2 años, sobre todo a partir de los 18 meses, aunque siempre fue detectable. Recientemente otro autor también refiere una disminución progresiva de la carga viral con el paso del tiempo (76).

Esto no parece ocurrir exactamente in vivo porque no se habría dado el caso de detecciones positivas en niños de 17 años, excepto que la carga viral al nacimiento fuera superior a  $10^8$ , siendo que la carga viral excepcionalmente es superior a  $10^6$ . Es decir, es posible que después de una fase inicial de declinar, permanezca estable a cargas bajas durante largos periodos de tiempo (75).

En nuestro trabajo el tiempo transcurrido entre la extracción y el análisis de la muestra en los casos en los que la detección ha sido negativa es superior al que ha transcurrido en los casos en los que la detección ha sido positiva.

Como dato a reseñar es que de los cinco pacientes con una carga viral “baja” (inferior a 1500 UI/ml) en los tres en los que la detección ha sido positiva, el tiempo que había transcurrido desde la extracción al análisis es de 2,5, 36 y 38 meses, mientras que

los otros dos en los que la detección fue negativa había transcurrido un tiempo significativamente superior, de 54 y 58 meses respectivamente. Las medias respectivas de tiempo transcurrido hasta el análisis son significativamente mayores para la detección negativa.

Goderis et al en el año 2014 afirma también que efectivamente la sensibilidad de la prueba puede verse influida por el tiempo de almacenamiento, que podría disminuir la carga viral (8). Nuestro estudio ha mostrado una detección del 100% de los casos cuando en el momento del análisis han transcurrido menos de 6 meses desde la extracción, un 72,7% cuando han pasado más de 6 meses y un 40% de detección si era más de 36 meses, lo que hace pensar que efectivamente el tiempo transcurrido es una variable importante.

Es relevante, desde nuestro punto de vista, que en algunos de los casos la detección ha sido positiva a pesar de tener una carga viral al nacimiento muy baja, incluso de menos de 137 UI/mL en sangre fresca, por lo que probablemente el corto tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra de este paciente y su análisis haya sido un factor a su favor, para obtener una detección positiva.

### c) Influencia de otros factores en la sensibilidad de la técnica.

**c.1) El papel de filtro** Las muestras de sangre seca del cribado neonatal han estado conservadas en dos tipos de papel absorbente, Whatman®903, de la empresa Whatman (GE Healthcare, Kent, Reino Unido) y Perkin Elmer 226 de la empresa Perkin Elmer, de EEUU.

Actualmente solo dos tipos de papel de filtro están aprobados como dispositivos médicos de clase II, el Whatman 903 y Ahlstrom 226 (ahora Perkin Elmer 226), que están fabricados al 100 % con fibras de algodón y no contienen aditivos. Precisamente estos dos tipos de papel son los que se han utilizado en nuestro centro, por lo que no tendría por qué influir sobre los resultados. Además han demostrado que son prácticamente idénticos en cuanto a sus prestaciones (67,68).

### **c.2) Condiciones de almacenamiento**

Aunque tradicionalmente la conservación de la muestra de papel de filtro ha tenido lugar a temperatura ambiente, dada la supuesta estabilidad del DNA, estudios posteriores han afirmado la importante influencia de las condiciones de almacenamiento a la hora de interpretar los resultados. Dichas condiciones según Mei et al podrían afectar a la capacidad de extraer, recuperar y medir de forma segura distintos biomarcadores (70).

Así, con un almacenamiento bajo condiciones controladas el DNA podría ser extraído y amplificado durante 25 años. Se proponen como condiciones ideales para el almacenamiento una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , con desecante y con una humedad inferior al 30% (70).

A pesar de dichas recomendaciones, la realidad es que las condiciones de almacenamiento son muy variables entre distintos centros y países, habiéndose obtenido resultados positivos hasta 18 años después con las muestras conservadas a temperatura ambiente (69).

En nuestro centro, el almacenamiento ha tenido lugar, como ya hemos comentado, hasta Enero del 2015 a temperatura ambiente y en cajas de cartón, de forma que una amplia mayoría de las pruebas del talón del grupo de las encefalopatías y de las hipoacusias se ha conservado bajo estas condiciones no óptimas. Además aquellos dos en los que se ha obtenido un resultado positivo las pruebas del talón se encontraban localizadas en el hospital Miguel Servet. Entre las muestras procedentes del Hospital Clínico donde se almacenan en frío, a  $4^{\circ}\text{C}$ , no ha habido ninguna detección positiva. Si dichas condiciones han influido o no en la capacidad de detección con una detección inferior a la esperada no lo sabemos, puesto que no tenemos forma de comparar.

La conservación en un biobanco permitiría el que las condiciones de almacenamiento fueran las óptimas con un estricto control sobre las muestras.

Del total de muestras analizadas, sólo hay 4 pertenecientes al año 2015 y que por tanto se han conservado congeladas. Son los 4 últimos casos de detección de infección congénita por citomegalovirus y casualmente en los 4, la detección ha sido positiva, pero en estos el tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y su análisis ha sido muy corto, así que no podemos extraer conclusiones.

### **c.3) Conservación de las muestras de sangre seca del cribado neonatal.**

Ya hemos referido que en nuestro centro, actualmente la conservación de las muestras de sangre seca del cribado neonatal se acerca a seis años, cifra superior a la de muchos centros y que consideramos muy positiva, aunque el objetivo ideal de conservación desde nuestro punto de vista sería un tiempo superior.

Durante el estudio hemos identificado algunas debilidades en la conservación que pudieran haber influido sobre los resultados. Las más importantes las condiciones de almacenamiento que se detallan en otro apartado.

La codificación de los pacientes a la hora de introducirlos en el sistema informático no siempre ha sido la misma, de forma que era relativamente frecuente que el mismo paciente estuviera codificado de dos formas distintas, lo que complica la localización de las muestras.

No se trata de una colección registrada y por tanto el control sobre cada una de las tarjetas es relativo. Hay 19 pruebas del talón que no se han podido localizar en el grupo de las encefalopatías, constandingo algunas como cedidas a otros servicios y no devueltas y algunas destruidas por error. En el grupo de las hipoacusias han sido tres las no localizadas. Esto de alguna manera ha podido influir sobre el resultado final. Al igual que nosotros, Avettand-Fenoel et al en el 2013 refiere no haber localizado 7 pruebas del talón entre 114 pacientes se habían perdido y no estuvieron disponibles para análisis (128).

En este estudio, por ello se ha firmado un documento de cesión de muestras con el

consiguiente compromiso por tanto de devolución a la finalización del mismo (Anexo D).

#### **c.4) Sintomatología en periodo neonatal**

La mayoría de los pacientes infectados son asintomáticos con cargas virales bajas al nacimiento, lo que tiene implicaciones muy importantes respecto a la posibilidad de un diagnóstico retrospectivo porque muchos de ellos sólo serán detectados por tanto por test muy sensibles.

Por ello se ha intentado asociar la carga viral al nacimiento con la posibilidad tanto de sintomatología neonatal como de secuelas posteriores. En general la mayoría de los autores han referidos cargas virales mayores en neonatos sintomáticos (31,32,36,85) y en aquellos con hipoacusia, especificando incluso que el 90% de pacientes hipoacúsicos tienen cargas virales al nacimiento superiores a 1000 copias/mL (31,32).

Pero además entre los pacientes asintomáticos se ha encontrado que aquellos que presentarán secuelas tardías como la hipoacusia presentan también cargas virales superiores al nacimiento, dando lugar a que pueda hacerse un diagnóstico retrospectivo (31,36).

En principio, los pacientes en los que hemos aplicado la técnica en este estudio son pacientes que bien no mostraron sintomatología sugestiva de enfermedad diseminada al nacimiento o mostraron una sintomatología sutil que no hizo sospechar de la infección congénita en periodo neonatal. Pero aún con todo son pacientes seleccionados, con secuelas (afectación neurológica o hipoacusia) que intentamos atribuir a la infección congénita en caso de haber existido. Tal y como hemos dicho estas secuelas irían asociadas con cargas virales más altas al nacimiento lo que hace que en principio sean pacientes en los que la infección es susceptible de ser detectada.

#### ***9.1.3.4. Metodología utilizada.***

Son múltiples los autores que argumentan que el factor más importante en la capacidad de detección del DNA de CMV y por tanto que explica las variaciones más importantes en las diferentes sensibilidades comunicadas son los propios protocolos aplicados. Goderis et al en el 2014 afirma que estas variaciones quedan justificadas porque se ha demostrado que la amplificación del ácido nucleico por métodos como la PCR varía considerablemente entre laboratorios al no haber estándares internacionales (8). La influencia del método de elución, extracción, del área utilizada de la muestra de sangre seca, las características individuales de los test de PCR, el método de amplificación y el criterio para considerar la positividad podrían explicar los resultados discordantes (88).

Debido a las significativas diferencias entre los distintos estudios y protocolos ha sido muy difícil establecer comparativas. Han sido publicados un número variable de protocolos en la literatura que refieren variables sensibilidades in vitro dependiendo fundamentalmente del método de extracción (73,79–81,85,86).

##### **a) La extracción.**

El mayor factor responsable de las discrepancias entre estudios son las diferencias en los métodos de extracción desde la prueba del talón (97), que son muy heterogéneos (90).

En general, se asume que los métodos de extracción manuales son más efectivos a la hora de recuperar DNA que los métodos automatizados. La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con extracción manual, pero esto requiere un tiempo y personal del que no disponemos en nuestro laboratorio. Nosotros hemos utilizado extracción automatizada, como en el caso de Boppana (84), aunque no el mismo sistema.

En nuestro estudio, se ha empleado un equipo cuyo nombre comercial es COBAS AmpliPrep/TaqMan de Roche, un equipo totalmente automatizado e integrado que realiza extracción y amplificación mediante tecnología PCR en tiempo real cuantitativa. En nuestro caso por tanto se ha automatizado todo el proceso de la extracción de ácido nucleico. Hemos utilizado un disco de sangre seca de 10 mm, en principio suficiente. Aunque en los pacientes en los que se ha repetido la muestra no siempre ha estado disponible dicha cantidad.

Nuestro equipo ha sido el COBAS AmpliPrep/TaqMan de Roche, un sistema totalmente automatizado e integrado que realiza extracción y amplificación mediante tecnología PCR en tiempo real cuantitativa. En principio es un equipo que ha sido ampliamente utilizado en distintos estudios para detección y cuantificación de DNA de CMV en muestras de sangre fresca y plasma sobre todo para monitorización de carga viral en pacientes trasplantados, aprobado por la FDA y calibrado según el primer estándar internacional de la OMS (180).

El límite de detección según el estándar para esta prueba es de 91 UI/mililitro, es decir 100 copias/mililitro. Entendemos que este rango está validado usando sangre fresca porque los valores límites de detección en el talón referidos en la bibliografía oscilan entre 2000 y 4000 copias/mL, lo que se debe a la cantidad de sangre extraída (50 frente a 200-500 microlitros de sangre fresca) y a que el protocolo de extracción es menos eficaz que con sangre fresca (86).

Entre los referidos como mejores métodos de extracción en la literatura están la extracción con fenolcloroformo y QIAamp Blood Mini Kit (74,90) usando al menos una tarjeta de sangre seca. Leurez-Ville en el 2011 obtiene con este protocolo modificado una buena sensibilidad y especificidad, del 95 al 100% y una especificidad del 98 al 99% usando toda la muestra de sangre seca (92).

De Vries et al en el 2013 en una muestra de pacientes hipoacúsicos encuentra una prevalencia de la infección congénita similar a la esperada habiendo utilizado el kit QIAamp DNA MiniKit (72).

También Vauloup-Fellous y Walter y colaboradores en el 2008 demuestran que la cuantificación de DNA a partir de la prueba del talón basada en este kit de extracción estuvo altamente relacionada con la cuantificación hecha en sangre fresca (78,85).

Recientemente Kontz et al en el año 2015 tras comparar 6 métodos de extracción, 4 manuales y 2 automatizados concluyen que la elección del método de extracción es un factor mayor en la capacidad de detectar bajos niveles de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal. Obtiene que los de mayor rendimiento son el QIAamp Investigator y el thermal shock, al igual que De Vries en el 2009 (86) y los de menor rendimiento el M48 MagAttract Mini y el QIAamp DNA mini, a diferencia de los autores anteriores.

El QIAamp DNA Mini (Qiagen Mini) ha sido utilizado en los protocolos de Leruez Ville (92), Valoup-Fellous en el 2007 (85), Walter en el 2008 (78) y Atkinson en el 2009 (75). El shock termal ha sido empleado en los protocolos de Shibata en el 94 (77), Barbi en el 96 (93), Binda en el 2004 (94), Yamamoto en el 2001 (79) y Kharrazi en el 2010 (95).

Nosotros no hemos utilizado ninguno de los métodos de extracción referidos mayoritariamente en la literatura. La tecnología utilizada en nuestro laboratorio está pensada inicialmente no como prueba diagnóstica sino como método de cuantificación de DNA de CMV en plasma, sobre todo para pacientes trasplantados, no habiendo encontrado referencias del uso de la misma para la extracción de DNA desde la muestra de sangre seca del papel de filtro, por lo que no podemos compararla con otros resultados. Pero de la sensibilidad obtenida en nuestra pequeña muestra de 15 pacientes con infección congénita por CMV en la que en 12 ha detectado el DNA de CMV se deduce que es una técnica también viable y con una sensibilidad aceptable para este propósito de diagnóstico retrospectivo.

El método automatizado mayoritario en estudios de cribado (M48 MagAttract Mini), utilizado por Boppana et al en 2010 (84) obtuvo el peor rendimiento en la comparativa entre distintos métodos de extracción lo que podría justificar la baja

sensibilidad del mismo, entre 28 y 34% (91). Nuestro método, a pesar de ser automatizado y teóricamente inferior a los de extracción manual, ha mostrado una sensibilidad muy superior a este que utilizó Boppana.

## **b) La amplificación**

En cuanto a los pasos siguientes de la técnica, la amplificación y detección, la utilización de la PCR a tiempo real sobre la n-PCR convencional ha mostrado algunas ventajas como son el menor riesgo de contaminación, mayor facilidad de implementación y un menor coste.

El primer estudio que muestra una amplificación con PCR a tiempo real fue el de Scanga en el año 2006, que utilizó siete casos confirmados y siete controles, usando toda la muestra (10mm en lugar de 3 mm) y añadiendo un step con lisado adicional para aumentar el volumen recogido. En este caso la sensibilidad y especificidad fue del 100% (73).

Posteriormente también han utilizado PCRs cuantitativas el protocolo de De Vries en el 2013 (72) obteniendo buena sensibilidad y el estudio comparativo de Koontz del año 2015 (91).

Nuestro aparato, el COBAS AmpliPrep/TaqMan de Roche es un sistema totalmente automatizado de amplificación y detección de ácidos nucleicos en tiempo real, que utiliza la tecnología 5' nucleotidasa. Concretamente este test de detección de CMV basado en tecnología PCR en tiempo real que hemos utilizado ha sido el primero aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para cuantificación de DNA de CMV en plasma humano. De hecho se espera que la disponibilidad de una Prueba de PCR cuantitativa en tiempo real calibrada de acuerdo al estándar internacional de la organización Mundial de la Salud facilite la estandarización de carga viral entre laboratorios (180).

Además de los evidentes beneficios en la rapidez de obtención de resultados, la tecnología PCR en tiempo real permite también buenos resultados en términos de sensibilidad, especificidad y linealidad. En nuestro caso la sensibilidad obtenida con esta tecnología ha sido de un 80%. En combinación con los cobas® AmpliPrep, los sistemas cobas® TaqMan permiten automatizar todos los pasos, desde la preparación de la muestra hasta la obtención de los resultados. De esa forma, el flujo de trabajo de laboratorio es optimizado de forma flexible y eficiente, minimizando el tiempo de ocupación de los técnicos de laboratorio. A nuestro conocimiento somos los primeros en haber utilizado esta tecnología en la detección en la muestra de sangre seca con unos aceptables resultados.

## **9.2. DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN ENCEFALOPATÍAS PRENATALES DE CAUSA NO ESTABLECIDA.**

Se conoce que la infección congénita por CMV puede ser causa de múltiples manifestaciones en el sistema nervioso central como discapacidad intelectual, trastorno del espectro autista, trastornos del aprendizaje, hiperactividad, problemas comportamentales, parálisis cerebral, epilepsia y déficit visual y auditivo. Se ha demostrado con anterioridad que la exposición intrauterina a varios patógenos ha sido asociada a alteraciones en el neurodesarrollo(107).

Hasta dos terceras partes del total de las secuelas se producen en niños sin síntomas al nacimiento (o con síntomas sutiles que pudieron pasar desapercibidos), debido a que la infección es mayoritariamente asintomática en el periodo neonatal como se ha referido anteriormente (12). Con relativa frecuencia la infección congénita es sutil clínicamente al nacimiento o puede permanecer silente durante las primeras etapas del desarrollo y de hecho, hay numerosos casos comunicados con discapacidad intelectual que pasaron desapercibidos al nacimiento y se diagnosticaron de forma retrospectiva mediante la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca de la prueba del talón (15,60,63).

Aunque se conoce la posibilidad de todas estas secuelas, son muy escasas las publicaciones donde, a la inversa, en determinadas patologías se trate de estimar la prevalencia de la infección congénita como causa de las mismas a través de la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal.

Se ha comunicado una prevalencia de la infección congénita de hasta un 25% en casos de discapacidad intelectual de causa desconocida (104) y de un 40% en los pacientes con malformaciones corticales (1). Sin embargo, porcentajes muy inferiores se han comunicado en diversas patologías específicas. Concretamente, una prevalencia de entre un 0,8% y un 1,5% en casos de parálisis cerebral infantil (110,181) y un 1,5% en casos de hidrocefalia congenital (182).

En nuestro estudio de los 165 pacientes de la consulta de neuropediatría codificados en la base de datos como “no etiología de encefalopatía prenatal” sólo en un caso hemos obtenido una detección positiva, lo que hace que la prevalencia estimada de la infección congénita, como causa de las encefalopatías prenatales no filiadas, controladas en nuestro centro sea de un 0,6%, una prevalencia que sería similar a la de la infección congénita por citomegalovirus en la población general (12), con lo que de entrada parece que la detección de DNA de Citomegalovirus de forma indiscriminada en esta muestra no parece rentable.

Hay que tener en cuenta que la sensibilidad de la técnica de detección de la infección congénita por CMV, a partir de la muestra de sangre seca del talón, referida en la literatura ha sido muy variable, de forma que hay autores que usándola como cribado universal, como se ha referido antes han obtenido una sensibilidad tan baja como del 28% (84). Este autor refiere que con esta técnica se podrían por tanto pasar desapercibidos hasta el 70% de los pacientes, pero este caso fue un cribado universal y no realizado sobre una población seleccionada. Si extrapoláramos esta sensibilidad a nuestra muestra y con una sensibilidad de un 30% hemos detectado un paciente, se nos podrían haber pasado desapercibidos otros 3 o 4 pacientes en este grupo, cifra que tampoco es muy alta.

Si tenemos en cuenta que con la aplicación de nuestro protocolo sobre la muestra de pacientes afectos de infección congénita por citomegalovirus hemos sido capaces de detectar 12 de los 15 pacientes infectados, como ya se ha comentado previamente, hemos conseguido una sensibilidad del 80% sobre pacientes afectos de infección congénita por CMV. Si aplicamos este dato a la muestra de pacientes afectos de encefalopatía de etiología no establecida, para el que no sabemos si es aplicable, de un total de 165 pacientes se nos podría haber pasado por alto a lo sumo 1 o 2 pacientes mas, lo que en tal caso tampoco daría una prevalencia alta, entre un 0,7 y un 1,8% del total de las encefalopatías.

También hay que considerar que aunque algunos casos se pudieran haber perdido por la sensibilidad de la propia técnica, estos serían sobre todo los que tuvieron una carga viral más baja y por tanto con menor riesgo de secuelas, lo que hace que esto sea improbable en nuestra muestra porque en general son pacientes muy afectados. Probablemente en una población de mayor seroprevalencia la contribución del CMV a este tipo de patologías sea superior.

Además este paciente en el que la detección ha sido positiva (caso clínico 31) ya tenía previamente solicitada una detección de DNA de CMV en la prueba del talón por diferentes datos que nos hacían sospechar la infección congénita. Este paciente fue remitido a la consulta de neuropediatría a los 15 meses por retraso del desarrollo psicomotor. No tenía antecedentes de interés y el periodo neonatal transcurrió sin incidencias. Pero hay datos que en este caso pueden orientar hacia la infección congénita como causa de su patología. Tenía un peso al nacimiento inferior al percentil 10 para la edad gestacional y signos de leucoencefalopatía en la resonancia magnética que le fue solicitada. Si la detección de CMV hubiera salido positiva en la primera determinación quizá en este paciente se podría haber ahorrado varios perfiles bioquímicos neurometabólicos y numerosos estudios genéticos que se le han realizado.

Nos hemos puesto en contacto telefónico con el paciente, se ha emitido un informe médico, se le ha citado en la consulta y se ha programado un seguimiento

adecuado incluyendo potenciales evocados auditivos puesto que hasta el momento no se habían realizado en ninguna ocasión.

Es posible que una alta sospecha y diagnóstico en periodo neonatal justifique que la posibilidad de diagnóstico retrospectivo haya disminuido. De hecho el último diagnóstico retrospectivo de infección congénita por CMV ha sido realizado en nuestra unidad en el año 2009, siendo posteriormente todos los casos diagnosticados en periodo neonatal, lo que desde nuestro punto de vista es muy significativo.

Globalmente el CMV no parece una causa especialmente prevalente en casos de encefalopatía sino hay otros signos añadidos que sean sugestivos de la infección congénita. Probablemente la aproximación diagnóstica que habíamos propuesto nosotros en un trabajo previo (63), así como la que propone Avettand- Fenoel et al (71) sean más razonables que la búsqueda indiscriminada en toda encefalopatía de etiología no establecida.

Desde nuestro punto de vista, el estudio retrospectivo debería plantearse ante la presencia de gravedad y asociaciones variables de retraso de crecimiento intrauterino, microcefalia, hipoacusia neurosensorial, coriorretinitis, discapacidad intelectual, problemas de conducta especialmente dentro del espectro autista, calcificaciones intracraneales, alteraciones encefaloclasticas, leucoencefalopatía, displasia cortical y malformaciones de lóbulo temporal e hipocampo. Avettand Fenoel propone que en todo niño con retraso psicomotor asociado a anomalías sugestivas en la neuroimagen se busque el CMV. Con ambas aproximaciones habríamos llegado al diagnóstico.

Si acotamos los resultados obtenidos (1 paciente afectado) a los niños afectos de encefalopatía con retraso de crecimiento intrauterino, que son 34 entre los 165 pacientes de la muestra, la prevalencia de la infección congénita en este grupo asciende a un 2,9%.

Si lo ajustamos a aquellos con alteración en la resonancia magnética (32 pacientes) el porcentaje asciende a un 3,1% y si puntualizamos en el grupo de pacientes

con alteración de resonancia magnética sugestiva de CMV (2 atrofas frontotemporales, 4 leucoencefalopatías, 3 displasias corticales, 2 formas anormales de ventrículos laterales y 1 vasculopatía estriatal) que son 12 pacientes el porcentaje asciende a un 8,3%.

Así, tras hacer 165 detecciones y obtener sólo un resultado positivo y teniendo en cuenta las características propias de la técnica, que ha mostrado sensibilidades muy variables entre distintos estudios, la prevalencia del CMV es probablemente baja y es preciso una aproximación diagnóstica dirigida.

### **9.3. DETECCIÓN DE DNA DE CITOMEGALOVIRUS EN EL GRUPO DE PACIENTES CON HIPOACUSIA.**

Los resultados en este grupo han sido realmente diferentes a lo esperado. De los 41 pacientes del grupo de hipoacusia en los que hemos llevado a cabo la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del cribado neonatal sólo hemos obtenido un resultado positivo, que finalmente ha resultado ser además un falso positivo. Es difícil pensar que esta sea una realidad cuando numerosos estudios en la literatura nos aportan datos realmente diferentes.

#### **9.3.1. Falso positivo.**

A continuación explicamos el transcurso del caso clínico número 32 durante el estudio, antes de concluir que finalmente ha sido un falso positivo. Se trata una paciente con nistagmus congénito, hipotonía, retraso psicomotor e hipoacusia en la que constaban antecedentes familiares significativos de hipoacusia neurosensorial y en la que además con anterioridad la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del talón había sido negativa. En esta ocasión la detección ha sido positiva débil, con un resultado inferior a 137 UI/mL en la prueba del talón, lo que nos había hecho dudar del diagnóstico. Antes de dar el resultado como positivo definitivamente se ha procedido a

su confirmación, obteniendo en la segunda ocasión un resultado negativo. Ante la contradicción entre ambos resultados se ha citado a la paciente y se ha extraído una serología de CMV, resultando la IgG negativa, lo que descarta la infección congénita. El único caso con detección positiva en este grupo por tanto finalmente ha sido un falso positivo, resultado decepcionante desde nuestro punto de vista.

Sí que ha habido otros estudios que han referido falsos positivos, como en nuestro caso, tal y como hemos comentado previamente. Barbi et al en el año 2008 en un estudio comparativo entre laboratorios deduce una tasa de falsos positivos entre el 9 y el 11% relacionándolo con una pérdida de adherencia a las estrictas medidas de seguridad cuyo objetivo es evitar la posibilidad de contaminación cruzada (88). Gibson et al en el 2006 obtuvo una prevalencia de infección congénita por CMV de hasta un 27,8% en pacientes afectos de parálisis cerebral (179). Al analizarlo posteriormente en el año 2012 obtiene una prevalencia del 1,5% sobre pacientes de las mismas características, lo que atribuyeron a posteriori a una elevada tasa de falsos positivos por probable contaminación en el primer estudio (181).

En principio no podemos atribuir nuestro resultado a una contaminación cruzada entre pacientes de la misma muestra puesto que no ha habido ninguna otra detección positiva. Lo que no quedaría descartada es la posibilidad de contaminación con tarjetas adyacentes durante el almacenamiento en el servicio de bioquímica puesto que de momento estas tarjetas no han sido analizadas.

En la literatura hay acuerdo generalizado en una elevada especificidad entre muchos autores, refiriendo que un resultado positivo prácticamente confirma la infección, habiéndose comunicado especificidades entre el 99 y 100% (7,69,79,82,84).

Tras haber realizado nuestro estudio y haber obtenido este falso positivo, nos ha quedado claro que antes de dar un resultado como definitivo hay que hacerlo en duplicado y que es casi obligado demostrar una serología compatible, puesto que una IgG negativa descartaría la infección según hemos referido. En nuestro caso ante la contradicción entre las tres determinaciones (2 veces negativo y una positivo) la

serología ha sido definitiva para considerarlo como nuestro primer falso positivo. Hay varios protocolos que proponen la realización de dicha serología incluso previamente a la detección de CMV en la muestra de sangre seca con la finalidad de descartar la infección con mayor seguridad si la IgG resulta negativa (71). Un caso similar presenta Boudewyns et al en el 2009, que obtuvo en una muestra de 41 pacientes 4 positivos mediante la muestra de sangre seca del talón pero uno de ellos fue considerado un falso positivo al ser la IgG negativa (150).

Para concluir, a pesar de la alta especificidad comunicada por la mayoría e autores en todo caso los resultados hemos de interpretarlos con precaución como parte de un proceso diagnóstico y sabemos que un resultado negativo no permite excluir totalmente el CMV como causa.

### **9.3.2. Prevalencia de CMV en la hipoacusia.**

Las cifras comunicadas en la literatura acerca de la prevalencia de la infección congénita como causa de la sordera han sido variables, pero se afirma mayoritariamente que el citomegalovirus es la causa más frecuente de hipoacusia neurosensorial adquirida intraútero y que es la segunda causa más frecuente de hipoacusia después de las causas genéticas. Se han estimado cifras que han oscilado entre el 7% (150), el 15-20% en general (8,132,149) e incluso un 36% según algunos autores (29).

En nuestra muestra de 40 pacientes afectos de hipoacusia, a los que se les ha realizado potenciales de estado estable tenemos, después de haber excluido el falso positivo, un caso de infección por CMV confirmada en periodo neonatal y una sospecha de infección congénita por CMV, pero en la que había transcurrido más de un mes desde el nacimiento y por tanto no se pudo confirmar, al ser la detección en el talón negativa en 2 ocasiones.

Si consideramos que el único caso de infección por CMV en nuestra muestra de pacientes hipoacúsicos es el primero estaríamos estimando una prevalencia de la

infección congénita en nuestra muestra de un 2,5%, muy inferior a la publicada mayoritariamente. Si tenemos en cuenta también el caso en el que la sospecha es elevada pero que no se ha podido confirmar la prevalencia ascendería a un 5%, aún con todo inferior a la referida por la mayoría de los autores, acercándonos únicamente al 7% que objetiva Boudewyns en el año 2009 (Boudewyns 2009) y al 8% de Korver en el mismo año (152). Otros grupos Europeos, Japoneses y de EEUU también han estimado una prevalencia algo inferior, entre el 6 y el 15% (2,153–156).

Esta baja prevalencia de la infección congénita por CMV como causa de hipoacusia en nuestra muestra, podría deberse a que efectivamente en nuestra muestra fuera esa la verdadera prevalencia, lo que haría pensar que nuestros pacientes afectos de infección congénita desarrollan menos hipoacusia o es menos grave que la referida en la literatura. Esto se explicaría por un adecuado diagnóstico y tratamiento de la infección en periodo neonatal. Un dato que apoya esto anterior es que desde hace 6 años no se ha hecho ningún diagnóstico retrospectivo mientras que los diagnósticos en periodo neonatal y por tanto los niños que se han tratado precozmente y durante un periodo de tiempo más largo han aumentado progresivamente. Pero según los datos ofrecidos al inicio, aunque hemos mejorado muchísimo aún estamos lejos de lo esperado por lo que sólo este factor no parece ser el responsable.

Hay que valorar la posibilidad de que los estudios que han referido prevalencias muy elevadas de la infección congénita como causa, puedan haber incluido falsos positivos y que en esas poblaciones la prevalencia de CMV fuera mayor que en la nuestra.

Es posible que en esta muestra de pacientes no hayamos sido capaces de detectar la infección congénita y que hayamos obtenido una menor sensibilidad por motivos que desconocemos. En relación a este respecto sabemos además que de los dos 2 casos de infección congénita por CMV que nuestra técnica no ha sido capaz detectar uno es el paciente que pertenece a este grupo y que presenta además de la hipoacusia profunda una grave afectación neurocognitiva. Hay otro paciente que también pertenece a este grupo y en el que la sospecha de infección congénita es altísima. Al mes y medio

presentaba una PCR de CMV en orina positiva sin haber recibido lactancia materna con una serología también compatible pero sin embargo en éste también la detección de DNA de CMV en la prueba del talón ha resultado negativa en dos ocasiones.

Nuestra paciente afecta de infección congénita confirmada por CMV en periodo neonatal a pesar de presentar una hipoacusia profunda e intensa afectación generalizada al nacimiento tuvo una carga viral en plasma relativamente baja, de 1230 UI/mL, lo que podría justificar junto a un análisis tardío de la prueba del talón desde su extracción (58 meses) un resultado en la muestra de sangre seca del talón negativo tal y como se ha comentado en apartados anteriores. El límite de detección de 1500 copias/ml ha sido referido por muchos autores, de forma que en nuestra muestra todos los que han tenido una carga viral por encima de este límite la detección ha sido positiva.

Esto en principio va en contra de lo reportado previamente por varios autores que han tratado de relacionar el desarrollo de una hipoacusia posterior con una carga viral elevada en sangre fresca al nacimiento y por tanto con una mayor posibilidad de detección a través de la prueba del talón (32,78,85).

Sin embargo recientemente Williams et al objetivaron que la carga viral en sangre al nacimiento no se correlacionó con hipoacusia posterior, algo similar a lo que ha ocurrido con nuestra paciente y no fue capaz de detección mediante la prueba del talón en 4 de 6 talones con infección congénita diagnosticada al no pasar el cribado auditivo a pesar de que uno de ellos tenía una pérdida auditiva profunda (100).

En general, se afirma que el valor predictivo de elevada carga viral en relación con el desarrollo de sordera es bajo pero si hay acuerdo en que una baja carga viral predice bajo riesgo de sordera (47), cosa que no ha sido así en nuestra paciente, que con una carga viral baja al nacimiento ha presentado una hipoacusia profunda bilateral.

El problema entonces es que no siempre los pacientes que desarrollan secuelas posteriores tienen cargas virales altas en sangre al nacimiento y está claro que la prueba pierde sensibilidad en niños con cargas virales bajas al nacimiento ( $< 10^4$  copias/ ml).

Efectivamente sí que los dos talones que resultaron positivos en el caso de Williams fueron los que tuvieron una carga viral superior a  $10^4$  copias/ ml pero la carga viral en sangre al nacimiento no se relacionó con la hipoacusia posterior (100).

Algunos autores lo han hecho a la inversa, relacionando la positividad de la detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del talón con el desarrollo de secuelas posteriores. Mc Mullan et al refieren en el 2011 que en una muestra de 23 pacientes la positividad en la prueba del talón se asoció con enfermedad por CMV hasta en el 83% de los casos (183).

Hay diversos estudios que han estimado la prevalencia de la infección congénita a través de la detección en la prueba del talón, obteniendo cifras entre 2,7 y 10% en pacientes que no habían pasado el cribado auditivo (150,156,157) frente a cifras entre un 8 y 20% en aquellos con hipoacusia establecida (72,78,128,132,151). Nuestra cifra está en mayor consonancia con la de los estudios aplicados sobre pacientes que no hubieron pasado el cribado que sobre pacientes con hipoacusia establecida.

Como ya se ha referido anteriormente, la mayoría de los autores reflexionan que los factores que explican las distintas prevalencias obtenidas son fundamentalmente dos. La propia sensibilidad intrínseca de la PCR sobre todo de la extracción sabiendo que la extracción automatizada tiende a ser menos eficiente. En segundo lugar el tipo de población estudiado porque generalmente ha mostrado una buena sensibilidad sobre poblaciones de alto riesgo (75,89,92) y baja cuando ha sido utilizado como cribado a gran escala (84).

Nuestra extracción, como ya hemos comentado, es automatizada, pero a pesar de ello en una muestra de pacientes con infección congénita por CMV ha obtenido una aceptable sensibilidad, de un 80%. Es cierto que los pacientes sobre los que la hemos aplicado han sido diagnosticados todos en periodo neonatal y por tanto o se han estudiado por una seroconversión materna (primoinfección) o han sido mayoritariamente sintomáticos, lo puede justificar que la sensibilidad sobre esa muestra no sea aplicable a este grupo de pacientes hipoacúsicos. Es posible que para este tipo de paciente necesitemos un test todavía más sensible.

El hecho de que en los dos casos en los que sabemos que la hipoacusia parece debida a CMV, uno confirmado y el otro muy probable, la detección haya salido negativa nos hace pensar que hay cierta probabilidad de que esto nos haya pasado con el resto de pacientes, habiendo tenido en este grupo una baja capacidad de detección con la técnica aplicada.

Si nos referimos sólo a la hipoacusia neurosensorial grave y profunda Kenneson et al refieren una prevalencia de CMV entre un 15 y 20% (21). También De Vries et al sobre 70 pacientes con implante coclear mediante la detección de CMV en la prueba del talón encontró una prevalencia similar a la esperada, en torno a un 14%, de lo que dedujo una buena sensibilidad de esta técnica en este grupo de pacientes (72).

En nuestra muestra los pacientes que han recibido ya implante coclear son 17, la mayoría con hipoacusia profunda. Si tenemos en cuenta el caso confirmado de infección congénita la prevalencia de la infección congénita en este subgrupo asciende a un 5,8% pero si tenemos en cuenta aquel en el que hay una alta sospecha aunque no se ha podido confirmar la cifra ascendería a 11,7%, cifra que se acerca algo más a la referida por la mayoría de los autores.

La hipoacusia de la infección congénita por CMV en el caso de pacientes sintomáticos en periodo neonatal es bilateral y grave y profunda hasta en el 65% de los casos (8).

En cuanto a las características de la hipoacusia en nuestra paciente afecta de infección congénita por CMV ha sido profunda y bilateral desde el nacimiento, sin objetivarse respuestas en los potenciales evocados auditivos desde su ingreso en periodo neonatal. Posteriormente no ha habido fluctuaciones ni mejoría en ningún momento. El otro paciente en el que también hay una alta sospecha de hipoacusia secundaria a la infección congénita ésta fue grave y bilateral al nacimiento progresando a los 6 meses a profunda bilateral. No obstante hay referencias recientes de que el CMV también

constituye un porcentaje importante de la hipoacusia unilateral, en alguna publicaciones similar al de la bilateral, de hasta un 9,1% (127).

### **9.3.3. Clasificación y aproximación etiológica de los pacientes con hipoacusia.**

Puesto que los potenciales evocados auditivos de estado estable se realizan habitualmente tras varios potenciales evocados auditivos alterados y previamente a la valoración de tratamiento protésico auditivo o de implante coclear era de esperar que el mayor porcentaje de hipoacusias en nuestra muestra lo constituyeran las hipoacusias graves y profundas, con 33 pacientes de 40 del total de la muestra (excluyendo al que finalmente la prueba fue absolutamente normal), lo que supone un 82,5%. Lo mismo ocurre con la lateralidad, con un 87,5% de hipoacusias bilaterales (35 pacientes de 40).

El **sexo** en principio no ha sido reconocido como un factor de riesgo de hipoacusia. Pero recientemente estudios de diferentes países europeos han reportado una mayor frecuencia de hipoacusia en varones, sin que se conozca la causa (184). En nuestra muestra han sido 22 hombres y 18 mujeres, con una proporción de 1,22/1.

La etiología de la hipoacusia bilateral, a diferencia de la unilateral, está más definida. Etiológicamente la **sordera sindrómica** supone aproximadamente el 30% y la no sindrómica el restante 70%. En nuestra muestra, de un total de 40 pacientes 6 casos se pueden contextualizar dentro de la sindrómica. Hay un paciente con secuencia Charge confirmado y otro etiquetado como tal aunque sin confirmación genética. Hay una paciente con aspecto sindrómico pero tampoco filiado y 3 pacientes con síndrome de Down de los que dos tienen una hipoacusia mixta. Así en nuestro estudio las causas aparentemente sindrómicas han supuesto un 15% del total, igual que el mostrado por algunos autores (128).

Las **causas genéticas** suponen en el caso de la hipoacusia bilateral grave y profunda hasta el 50-60% pero teniendo en cuenta hipoacusia uni y bilateral conjuntamente se ha objetivado causa genética en un porcentaje significativamente

inferior, el 20% (127) y en el extremo opuesto Avettand-Fenoel et al la encuentran hasta en el 70% de los casos incluyendo las causas genéticas de todos los pacientes sindrómicos (128).

Nos parece sorprendente que en un total de 40 pacientes, concretamente 33 con hipoacusia grave y profunda y siendo la causa más frecuente con diferencia sólo se hayan llevado a cabo estudios genéticos de hipoacusia en 8 pacientes. Pero si tenemos en cuenta que en un porcentaje importante (6 pacientes sindrómicos, una meningitis, una enfermedad de Canavan y 3 prematuros extremos con múltiples factores de riesgo añadidos a la propia prematuridad) se ha considerado muy probablemente secundaria a otra patología el dato tiene más sentido. A pesar de todo, hay 17 pacientes en los que no consta ninguna etiología y que por tanto serían candidatos a estudio genético de la hipoacusia.

De estos 8 pacientes en los que se ha solicitado el estudio genético se ha obtenido un resultado positivo en 3, quedando pendiente actualmente el resultado de otros dos pacientes. Si consideramos la totalidad de pacientes esto supone que un 7,5% de la hipoacusia de nuestra muestra hasta el momento actual obedece a causas genéticas de hipoacusia. Teniendo en cuenta además que de los tres pacientes hipoacúsicos en los que no hemos podido localizar el talón uno es una hipoacusia genética este porcentaje es algo superior (9,75%).

Si incluimos dentro de causas genéticas globalmente, como han hecho algunos autores (128) las asociaciones sindrómicas (6) y la enfermedad metabólica (1) que también tienen un origen genético (confirmado en nuestra población en los 3 síndromes de Down, uno de las secuencias Charge y en la enfermedad de Canavan) son 10 niños sobre 40, lo que supone un 25%. Además hay otros dos pacientes en los que no consta el estudio genético a pesar de antecedentes familiares por lo que si presumimos en estos un probable origen genético estaríamos hablando de 12 niños sobre 40, un 30%. Probablemente este porcentaje sería superior en nuestra muestra si el estudio genético fuera la norma en todos los pacientes con hipoacusia de causa no establecida, teniendo en cuenta además que en dos pacientes el resultado está pendiente.

Las mutaciones se han localizado en el gen de las “conexinas” (GJB2 y GJB6) en 2 de los 3 pacientes, (3 de los 4 si incluimos al paciente en el que no se ha localizado la prueba del talón), lo que supone que son las más frecuentes en nuestra muestra con un porcentaje de un 66,6 a un 75% de las mutaciones encontradas, de forma concordante con la literatura. Según Delterene, y Cryns estas mutaciones abarcan respectivamente un 37-50% del total (124,130) y son responsables de la sordera no sindrómica autosómica recesiva.

Hay autores que proponen la realización de pruebas de imagen a todas las sorderas en busca de anomalías anatómicas, ya que entre otras cosas, un acueducto vestibular amplio se ha relacionado con las mutaciones del gen SLC 26A4, que son las segundas mutaciones más frecuentes (124).

En nuestra muestra la prueba de imagen realizada habitualmente es un TAC de peñasco, que se efectúa únicamente previo a la colocación de implante coclear y no con fines puramente diagnósticos. Se ha llevado a cabo en los 17 pacientes en los que se ha colocado implante coclear y se han obtenido tres diagnósticos: una aplasia de conductos semicirculares, una aplasia coclear bilateral y una malformación de Mondini bilateral. Así las **anomalías anatómicas** han supuesto un 7,5% en nuestra muestra. Avettand-Fenoel en el 2013 publica una incidencia de malformaciones del hueso temporal de un 9,4%, similar a la referida en nuestra serie por tanto (128) y Boudewyns de un 4% (150).

**Los factores ambientales** suponen el 40-50% restante (126), siendo el CMV el más frecuente, con hasta un 21% según algunos autores (124,127). En nuestra muestra sólo está claramente objetivada una infección congénita por CMV, que supone un 2,5%, porcentaje como ya hemos referido muy inferior al referido por la mayoría de los autores. Si incluimos el otro paciente en el que tenemos una sospecha altísima que no hemos podido confirmar serían 2 de un total de 40, lo que supone un 5%, aún con todo lejos de lo esperado.

Si consideramos que tanto en el caso confirmado como en el de fuerte sospecha de infección congénita, la detección ha resultado negativa, es muy probable que algún otro caso de este grupo de pacientes haya pasado desapercibido y que el porcentaje real sea superior. Si acotáramos como hemos hecho anteriormente a los 17 pacientes que han recibido implante coclear y consideramos un paciente con infección congénita el porcentaje es de un 5,8%, pero si incluimos el paciente en el que la sospecha es muy alta el porcentaje asciende a un 11,7%, porcentaje que ya sí que es concordante con el referido por otros autores como hemos comentado. Hay que tener en cuenta además que es posible que no hayamos sido capaces de detectar alguno de los casos de infección, con lo que este porcentaje pueda ser incluso algo superior.

También nos parece sorprendente, sabiendo que la infección congénita por CMV es la segunda causa de hipoacusia neurosensorial no genética en la infancia, que en este grupo de 40 pacientes hipoacúsicos, hasta el momento actual, no se hubiera solicitado test de detección de CMV en ningún paciente por parte de otorrinolaringología. Es verdad que en tres pacientes ya se había descartado el CMV en periodo neonatal y en otros 4 se había solicitado por asociación de signos y síntomas sugestivos en pacientes que asociaban afectación neurológica, pero en todo caso los test han sido solicitados por neonatólogos y neuropediatras en pacientes que habían tenido oportunidad de ver por patología asociada.

Aunque ya el Comité de la infancia se posicionó en este sentido y muchos autores han afirmado que efectivamente se debería descartar el CMV en todas las hipoacusias de causa desconocida (134,150), actualmente son muy pocos los test de diagnóstico retrospectivo solicitados por otorrinolaringólogos (158). Es sorprendente también que en un guía clínica de actuación de hipoacusia en el año 2013 no se hace ninguna referencia al CMV (159).

En nuestro grupo, hay 4 casos de prematuridad inferior a 32 semanas de gestación, teniendo tres casos con factores de riesgo asociados claramente con hipoacusia. Un caso fue prematuro de 24 semanas de gestación y 700 gramos con una evolución muy tórpida durante su ingreso, ventilación mecánica prolongada y varios ciclos de

antibioterapia incluidos aminoglucósidos y los otros dos de 30 y 31 semanas de gestación respectivamente con pérdida de bienestar fetal periparto precisando reanimación cardiopulmonar avanzada para su estabilización inicial. Hay otro caso de 31semanas y 1640 gramos de evolución favorable en el que la prematuridad aisladamente quizá no explicaría su hipoacusia.

Así la prematuridad podría ser la causa de entre un 7,5 y un 10% del total de las hipoacusias en nuestra muestra, resultado concordante con otros autores, que han referido cifras de un 7,1% para la prematuridad (128) y de un 15% para factores perinatales en su conjunto (150).

Hay un paciente en el que hay un claro factor también relacionado con la hipoacusia en nuestra muestra, una meningitis grave a los 40 días de vida con hidrocefalia posterior que presentaba otoemisiones normales al nacimiento y potenciales sin respuesta posteriormente. Y otra paciente con una grave encefalopatía desde el nacimiento sin filiar en la que intuye una probable causa neurometabólica o genética que no se ha llegado a confirmar.

Para concluir, tenemos etiología en 14 pacientes (3 genéticas, 3 anomalías de oído interno, 2 secuencias Charge, una infección congénita por CMV, una enfermedad de Canavan, una meningitis y tres prematuros con múltiples factores de riesgo) y una posible etiología en otros 9 (2 con antecedentes familiares de hipoacusia, 1 probable infección congénita por CMV, una grave encefalopatía prenatal, 3 síndromes de Down, una paciente con aspecto sindrómico y el otro prematuro de 31 semanas de gestación), con lo que nos queda una etiología desconocida en los restantes 17 pacientes, un 42,5%, en consonancia con otros autores (150).

## **9.4. PROPUESTA DE UN ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS.**

La realización de este trabajo nos ha hecho reflexionar sobre nuestro proceso diagnóstico en la infección congénita por citomegalovirus llevándonos a hacer determinadas modificaciones en varios aspectos. Exponemos a continuación nuestra propuesta de algoritmo diagnóstico tanto en periodo neonatal como de forma retrospectiva.

### **9.4.1. Propuesta de un algoritmo diagnóstico en la infección congénita por citomegalovirus en periodo neonatal.**

En consonancia con el documento de consenso de la sociedad española de infectología pediátrica del año 2009 sobre el diagnóstico y tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus (12) en nuestro centro desde la misma fecha disponemos de un protocolo propio de diagnóstico y tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus en periodo neonatal. A raíz de haber realizado este trabajo proponemos un algoritmo definitivo con algunas modificaciones.

Desde nuestro punto de vista el despistaje de la infección congénita por CMV debe darse ante la presencia de diferentes signos y síntomas que resumimos a continuación:

- Infección materna por citomegalovirus demostrada durante el embarazo: seroconversión o presencia de IgM positiva con IgG de baja avidéz.
- Sospecha de infección materna por citomegalovirus durante el embarazo por serología materna indicativa: IgM positiva sin control de avidéz.
- Infección fetal demostrada durante el embarazo: PCR o cultivo positivo en líquido amniótico.

- Sospecha de infección fetal durante el embarazo por hallazgos ecográficos prenatales indicativos: oligohidramnios o polihidramnios, hidrops fetal, derrame pleural o pericárdico, retraso del crecimiento intrauterino, hepatoesplenomegalia, calcificaciones intrahepáticas, aumento de la ecogenicidad intestinal, microcefalia, ventriculomegalia, atrofia cortical y calcificaciones intracraneales.
- Sospecha de infección congénita sintomática por cualquiera de los siguientes síntomas o signos:
  - Retraso de crecimiento intrauterino y/o pequeños para la edad gestacional (peso inferior al percentil 10 en las gráficas de Fenton).
  - Trombocitopenia, exantema petequial o eritropoyesis extramedular.
  - Afectación hepática: hepatoesplenomegalia, hipertransaminasemia, hiperbilirrubinemia con aumento de bilirrubina directa.
  - Afectación del sistema nervioso central (cualquiera de las siguientes): microcefalia, cualquier clínica neurológica, hiperproteíorraquia de etiología no filiada, coriorretinitis, hipoacusia neurosensorial.
  - Alteraciones en la neuroimagen (ecografía transfontanelar, TAC o RM) sugestivas de infección congénita por citomegalovirus: ventriculomegalia, calcificaciones cerebrales, quistes subependimarios en la región de la matriz germinal (germinolisis), trastornos de la migración (incluida esquisencefalia, heterotopias y otras displasias corticales con o sin anomalías en la giración), atrofia cerebral, anomalías en la parte anterior del lóbulo temporal e hipocampo, quistes subcorticales, quistes periventriculares (leucomalacia periventricular), septos ventriculares, leucoencefalopatías incluidos retrasos en la mielinización (sobre todo si es asimétrica de predominio temporoparietal), hiperintensidad del lóbulo temporal, hipoplasia cerebelosa, hipoplasia/agenesia de cuerpo calloso y vasculopatía de las arterias tálamoestriadas.
  - Hijos de madres con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.
  - Menores de 32 semanas de edad gestacional y/o 1500 gramos. Este grupo tiene un algoritmo diagnóstico propio que se expondrá a continuación.

El despistaje inicial en todo paciente ingresado en la unidad neonatología o en planta de maternidad se llevará a cabo con una PCR de citomegalovirus en orina, puesto que ha

demostrado una sensibilidad muy superior a la PCR en plasma, que no se aconseja como arma inicial puesto que la carga viral en plasma puede ser baja al nacimiento. En caso de que el paciente no esté ingresado se valorará recoger una muestra de orina o de saliva fresca habiendo transcurrido al menos una hora desde la última toma.

Cualquier resultado positivo se confirmará de nuevo con otra PCR en orina y en plasma y se procederá a llevar a cabo todo el estudio completo que exponemos a continuación:

- Exploración física completa.
- Exploración neurológica estructurada.
- Exploración oftalmológica.
- Potenciales evocados auditivos.
- Electroencefalograma.
- Analítica sanguínea con hemograma, bioquímica, perfil hepático con bilirrubina total y directa y coagulación.
- Ecografía transfontanelar.
- En todos los sintomáticos, con clínica neurológica o con hallazgos en las exploraciones complementarias previas:
  - Punción lumbar para citoquímica-bioquímica y PCR de citomegalovirus en líquido cefalorraquídeo previo al inicio de tratamiento.
  - Resonancia magnética craneal (a valorar en todos los casos).

La realización de este trabajo ha supuesto varias modificaciones (con respecto al protocolo que veníamos aplicando en la unidad) que se incluyen en esta propuesta de algoritmo diagnóstico. Las principales modificaciones son: a) que se han ampliado las patologías en las que se solicita, b) que el despistaje inicial en ningún caso se hará con PCR de CMV en plasma, sino que se hará en todo caso en orina o saliva, c) que se ha sustituido la tomografía axial computerizada por la ecografía transfontanelar y d) se ha introducido la resonancia magnética en todo paciente sintomático, con clínica neurológica o con hallazgos en el resto de exploraciones complementarias y se valorará en todo paciente.

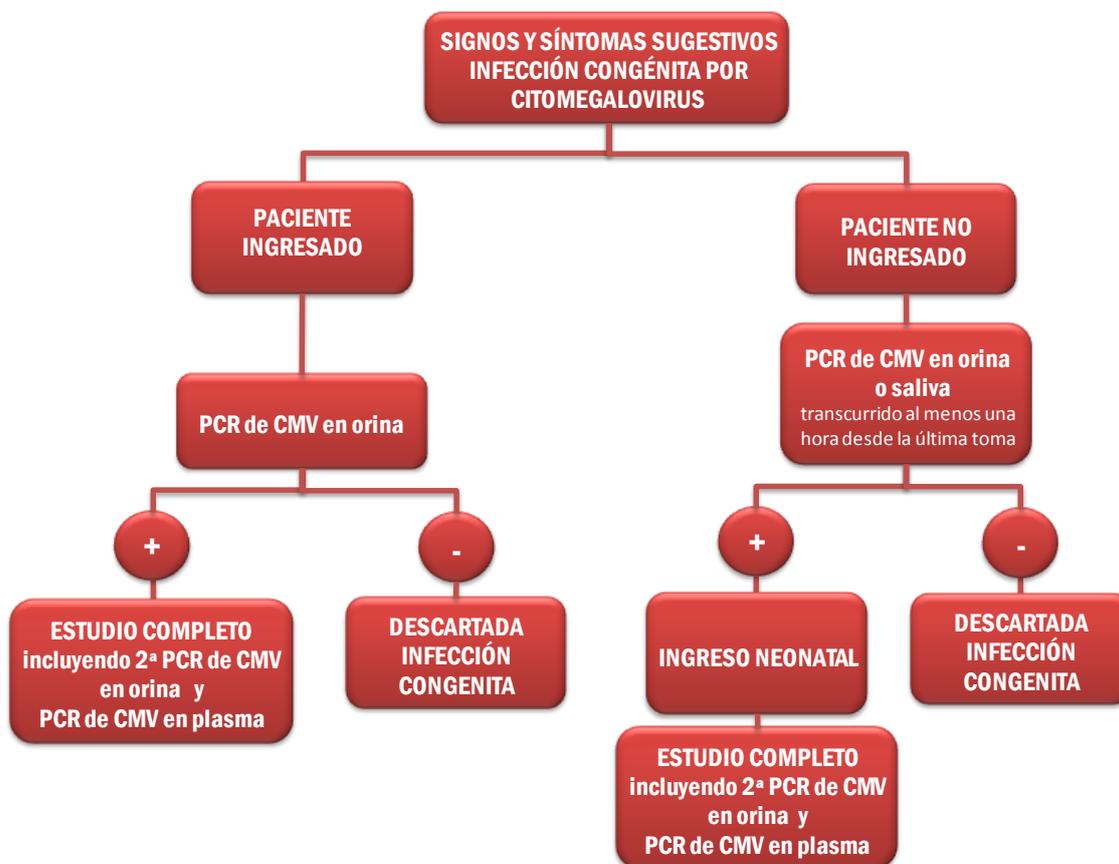


Figura 19. Algoritmo diagnóstico en la infección congénita por citomegalovirus en periodo neonatal.

#### 9.4.2. Propuesta de algoritmo diagnóstico en recién nacidos prematuros menores de 32 semanas de gestación y/o 1500 gramos de peso al nacimiento.

Este grupo de neonatos tiene unas características especiales por lo que se elabora un algoritmo diagnóstico propio.

Se realizará un despistaje de la infección congénita a todo prematuro menor de 32 semanas de gestación y/o 1500 gramos. El cribado inicial será llevado a cabo mediante una PCR de citomegalovirus en orina. En caso de resultar positiva se confirmará con una segunda PCR de CMV en orina y en plasma. Si se confirma una segunda PCR

positiva en cualquiera de las dos queda confirmada la infección congénita. En tal caso el estudio completo se llevará a cabo igual que en el resto de recién nacidos tal y como se ha expuesto en el apartado 3.4.1.

Si la primera PCR en orina es negativa se ha descartado una infección congénita, pero dada la posibilidad considerable de infección adquirida a través de la leche materna se llevará a cabo una segunda PCR entre las 4 y 6 semanas de vida, siempre que el neonato lleve al menos una semana de alimentación enteral con leche materna. Si el paciente está a dieta absoluta se retrasará entre una y 2 semanas dicha determinación. En el caso de obtener un resultado positivo y dado que previamente se había descartado la infección congénita será considerada una infección adquirida y se solicitará una PCR de CMV en leche materna con la finalidad de aclarar el origen de la infección adquirida. La infección adquirida por citomegalovirus tiene su propio protocolo que no es motivo de esta discusión.

La realización de este estudio nos ha llevado a reafirmarnos en la actitud que habíamos adoptado en la unidad hace un año aproximadamente de cribado sistemático de la infección congénita a todo prematuro menor de 32 semanas de gestación y/o 1500 gramos a diferencia de la propuesta de la sociedad española de neonatología en el año 2014, donde sugieren cribar únicamente la infección adquirida entre las 4 y 6 semanas de vida, de forma que si resulta positiva utilizar la muestra de sangre seca de talón para descartar la infección congénita (176). La sensibilidad de la muestra de sangre seca es limitada, con lo que una determinación negativa no permite excluir la infección congénita, lo que nos llevó ya hace un año a incluir el cribado sistemático en las dos primeras semanas de vida previo al cribado de la infección adquirida.

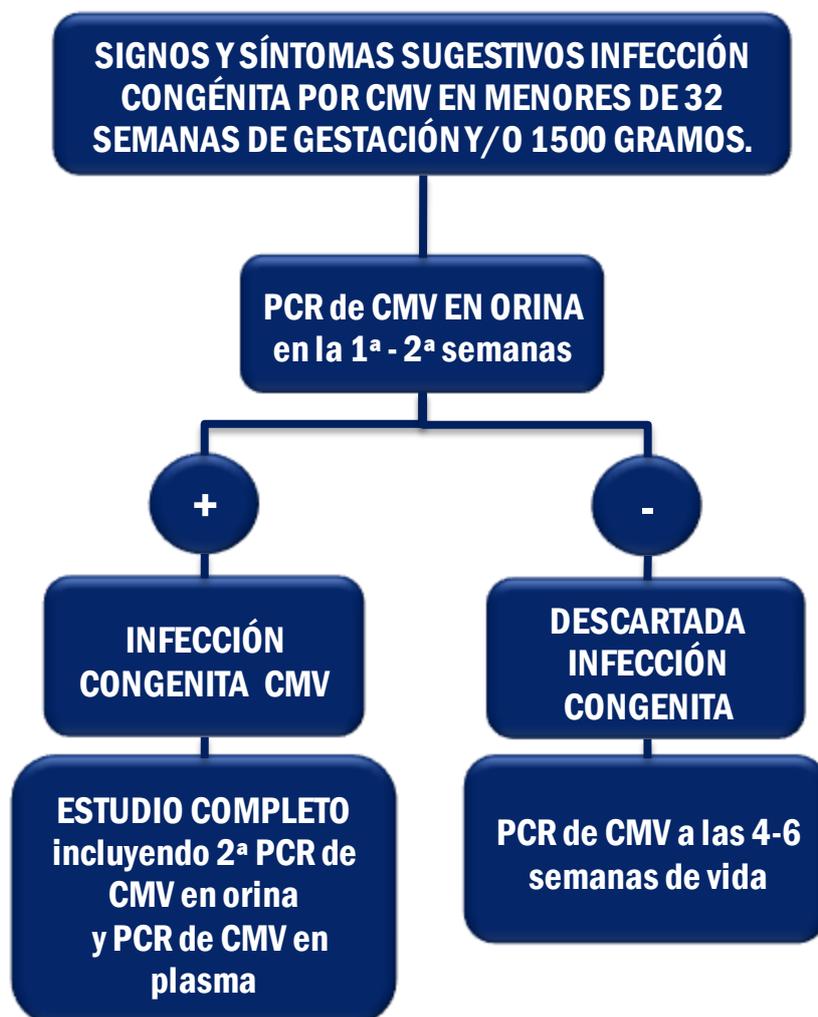


Figura 20. Propuesta de algoritmo diagnóstico en recién nacidos prematuros menores de 32 semanas de gestación y/o 1500 gramos de peso al nacimiento.

#### 9.4.3. Algoritmo de diagnóstico retrospectivo de infección congénita por citomegalovirus.

Desde nuestro punto de vista, el estudio retrospectivo debería plantearse a partir de las 3 semanas de vida ante la presencia de:

-Clínica neurológica y asociaciones variables de retraso de crecimiento intraútero, microcefalia, hepatoesplenomegalia, hipertransaminasemia e ictericia colostática en pacientes menores e un año.

-Hipoacusia neurosensorial

-Coriorretinitis.

-Alteraciones en la neuroimagen (ecografía transfontanelar, TAC o RM) sugestivas de infección congénita por citomegalovirus: ventriculomegalia, calcificaciones cerebrales, quistes subependimarios en la región de la matriz germinal (germinolisis), trastornos de la migración (incluida esquisencefalia, heterotopias y otras displasias corticales con o sin anomalías en la giración), atrofia cerebral, anomalías en la parte anterior del lóbulo temporal e hipocampo, quistes subcorticales, quistes periventriculares (leucomalacia periventricular), septos ventriculares, leucoencefalopatías (incluidos retrasos en la mielinización), sobre todo si es asimétrica de predominio temporoparietal, hiperintensidad del lóbulo temporal, hipoplasia cerebelosa, hipoplasia/agenesia de cuerpo calloso y vasculopatía de las arterias tálamoestriadas.

-Distintos grados de afectación neurológica entre los que incluimos discapacidad intelectual, retraso psicomotor, problemas de conducta especialmente dentro del espectro autista, parálisis cerebral, trastornos del aprendizaje, hiperactividad, epilepsia y déficit visual y auditivo siempre que vayan asociados a anomalías sugestivas en la neuroimagen (descritas anteriormente) o a signos sugestivos de infección congénita por CMV en periodo neonatal.

Inicialmente se solicitará una serología de CMV, de tal forma que es preciso demostrar una IgG positiva para continuar con el algoritmo diagnóstico. En caso de IgG negativa quedaría descartada la infección.

*Si la IgG es positiva:*

- Se recuperará la muestra de sangre seca del cribado neonatal tras consentimiento informado de los padres y se procederá a la detección de DNA de CMV mediante PCR.
- Además se solicitará una muestra de orina para llevar a cabo la detección de PCR de CMV en orina, puesto que durante los primeros años de vida es muy habitual que los pacientes con infección congénita sigan eliminando CMV en la orina. No obstante la detección positiva junto con la afectación neurológica y una IgG positiva va a favor de una infección congénita pero no la confirma.

Si la PCR de CMV en la prueba del talón es positiva siempre se confirmará en una segunda ocasión sobre la misma muestra antes de considerar el resultado como definitivo.

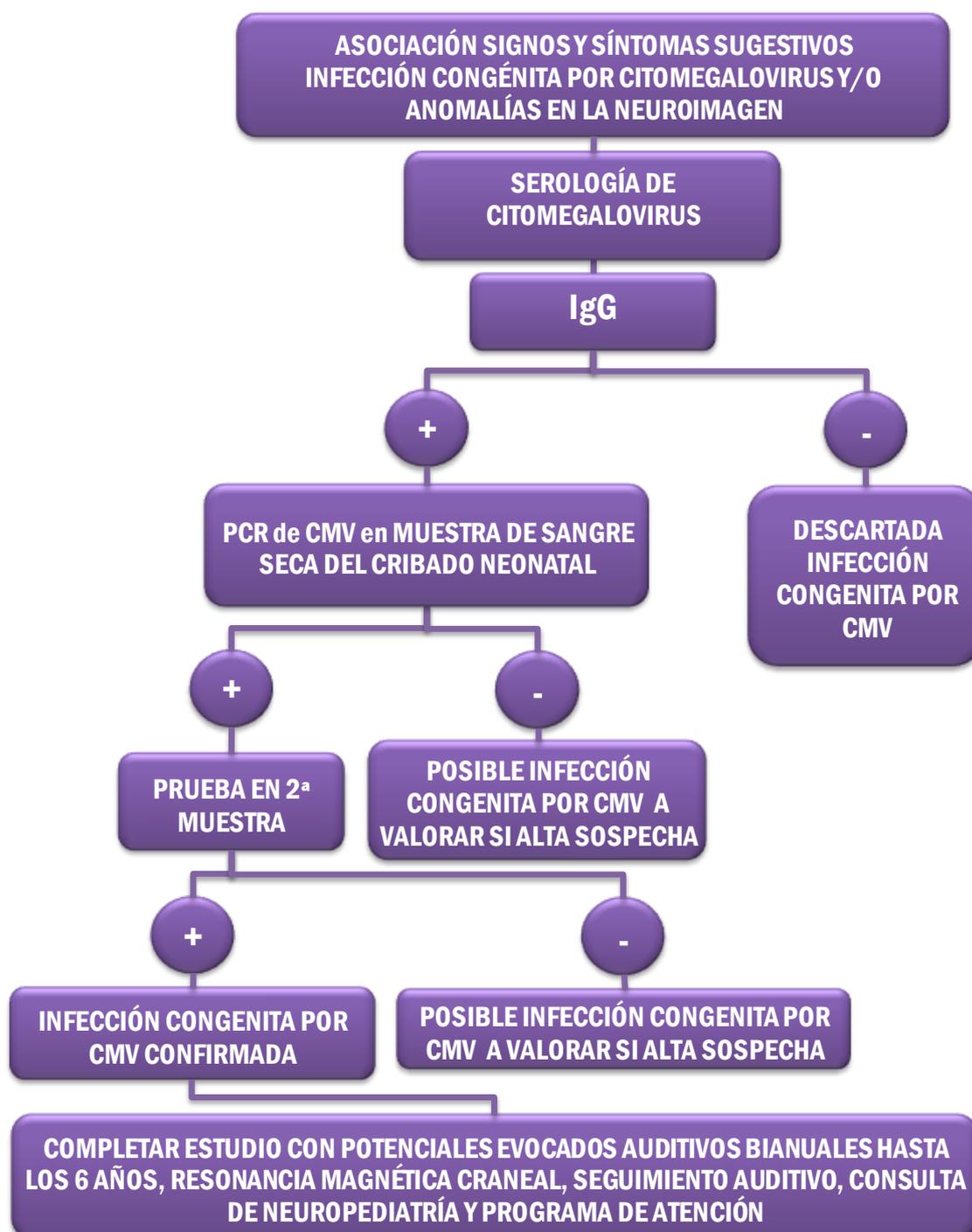


Figura 21. Algoritmo diagnóstico retrospectivo de infección congénita por citomegalovirus.

*Tras la confirmación diagnóstica:*

- Se solicitarán potenciales evocados auditivos bianuales hasta los 6 años y posteriormente según evolución.
- Se solicitará resonancia magnética craneal si no la tenía realizada previamente.
- Se derivará a otorrinolaringología para seguimiento auditivo independientemente del resultado de los potenciales.
- Se citará en la consulta de neuropediatría con una periodicidad variable según el grado de afectación.
- Se incluirá en programa de atención temprana si no lo estaba previamente.

#### **9.4.4. Propuesta de algoritmo diagnóstico en hipoacusia.**

El cribado auditivo se realiza en nuestro centro con otoemisiones acústicas entre las 24 y 72 horas de vida a todo recién nacido previo al alta de maternidad. Hasta la actualidad, los pacientes en los que no se obtiene una clara respuesta positiva (“Refer”), se citan para repetirlos en aproximadamente 2 semanas. A aquellos que no pasan la prueba en una segunda ocasión le les solicitan potenciales evocados auditivos y se citan en otorrinolaringología posteriormente para el resultado. Desde hace un mes aproximadamente, en relación con el trabajo que hemos desarrollado, hemos introducido el despistaje de infección congénita por citomegalovirus dentro del cribado auditivo.

El protocolo establecido es el siguiente.

- Se realizan las primeras otoemisiones acústicas entre el segundo y tercer día de vida como hasta ahora.

En caso de ser las *otoemisiones negativas* (“refer”) se repiten en el plazo de la primera semana de vida. Si salen negativas en una segunda ocasión ese mismo día son remitidos al servicio de neurofisiología para realización de potenciales evocados auditivos.

- Si se confirma la hipoacusia con los potenciales evocados auditivos a continuación en la unidad de “pruebas funcionales” se les recogerá una muestra de orina o saliva (al menos una hora después de la última toma) para despistaje de la infección congénita mediante PCR, cuyo resultado estará disponible en aproximadamente 48 horas.

En el caso de positividad de esta prueba el paciente ingresará en la unidad de neonatología para completar el estudio de la misma forma que en el apartado 9.4.1.

El trabajo nos ha servido para introducir cambios muy importantes. En primer lugar se ha incorporado el cribado del citomegalovirus dentro del cribado auditivo. Además el despistaje inicial no se hará con muestra de sangre como se venía haciendo en algún caso sino que siempre será con orina o saliva fresca. Se han adelantado los plazos de repetición de las otoemisiones y de los potenciales para poder llegar a un diagnóstico en las primeras dos semanas de vida, momento en el que podemos hacer un diagnóstico con mayor seguridad y en el que estamos además en plazo de no perder oportunidades de tratamiento.

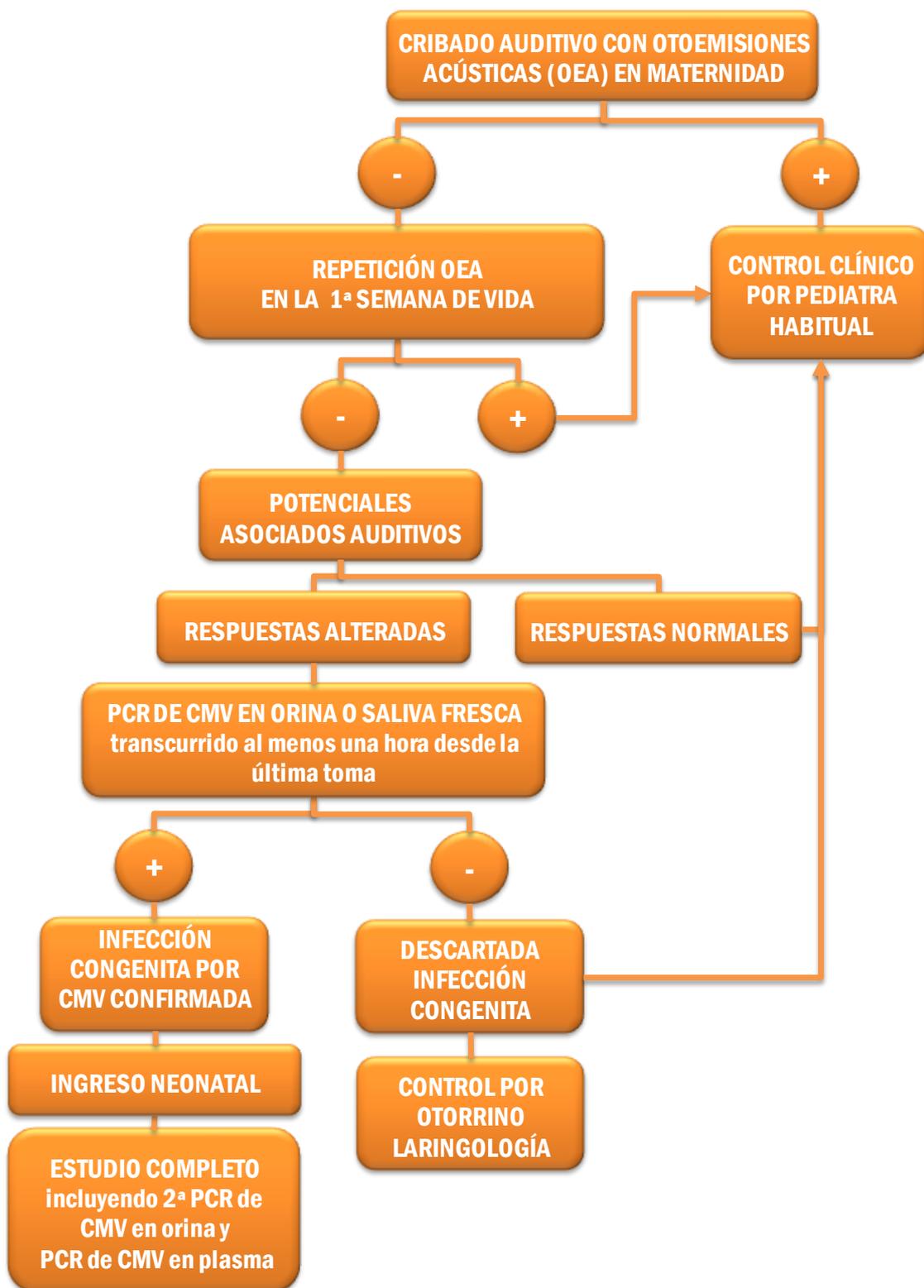


Figura 22. Propuesta de algoritmo diagnóstico en hipoacusia.

## CONCLUSIONES

## 10. CONCLUSIONES

---

1. La técnica de detección de DNA de citomegalovirus del equipo “COBAS AmpliPrep/TaqMan” de Roche sobre la muestra de de pacientes seleccionados afectos de infección congénita por citomegalovirus diagnosticada en periodo neonatal ha mostrado una sensibilidad de 80%.
2. Esta sensibilidad no se puede concluir que sea extrapolable a otros grupos de pacientes, puesto que en las encefalopatías de causa no establecida y en las hipoacusias se ha obtenido una prevalencia inferior a la esperada.
3. Nuestra técnica no ha permitido detectar al único caso confirmado de infección congénita por citomegalovirus en el grupo de pacientes con hipoacusia ni otro caso en el que existe una elevada sospecha clínica.
4. En el conjunto de 206 pacientes de ambas muestras sólo se ha obtenido un falso positivo, lo que indica una buena especificidad. Como refleja nuestro caso clínico número 32, antes de hacer un diagnóstico es obligado obtener una segunda determinación positiva en la misma muestra y confirmar una IgG de citomegalovirus positiva, ya que una IgG negativa prácticamente descarta la infección congénita.
5. La técnica de detección de DNA de CMV en la muestra de sangre seca del talón, es la única posibilidad diagnóstica de infección congénita pasado el periodo neonatal y permite obviar otros estudios extensos y costosos. Es importante la conservación de las muestras el mayor tiempo posible y en condiciones óptimas, idealmente en un biobanco.
6. Se ha encontrado una baja prevalencia (0,6%) de infección congénita por citomegalovirus en nuestra muestra de encefalopatías de causa no establecida, similar a la prevalencia de dicha infección en la población general en países desarrollados.

7. Esta baja prevalencia justifica restringir la búsqueda retrospectiva de DNA de citomegalovirus solamente ante sospecha de infección con asociación variable de retraso de crecimiento intrauterino, microcefalia, hipoacusia neurosensorial, coriorretinitis, discapacidad intelectual, trastornos del espectro autista, calcificaciones intracraneales, ventriculomegalia, alteraciones encefaloclasticas, leucoencefalopatía, displasia cortical y malformaciones del lóbulo temporal e hipocampo.
8. En la serie de niños con hipoacusia hay un caso de infección congénita por citomegalovirus confirmada en periodo neonatal, lo que constituye una prevalencia del 2,5 % y de un 5,8 % de los pacientes con implante coclear; en ambos casos inferior a lo referido en la literatura. Hay otro caso con diagnóstico clínico de infección congénita por citomegalovirus sin confirmación.
9. Dado que la infección congénita por citomegalovirus constituye la segunda causa de hipoacusia neurosensorial no sindrómica, que puede agravar hipoacusias genéticas y que es la única potencialmente tratable, nos parece obligado descartarlo ante toda hipoacusia. Hemos incorporado el despistaje de citomegalovirus integrado en el cribado auditivo de forma que a todo niño con otomisiones negativas en una segunda exploración se le realizan potenciales evocados auditivos en los primeros 15 días de vida y en caso de respuestas alteradas se descarta la infección congénita.
10. Hemos establecido en nuestros protocolos determinar la IgG de citomegalovirus y en caso de positividad, el estudio de DNA de citomegalovirus en la prueba del talón, a encefalopatías prenatales de etiología no identificada junto con otros datos sugestivos de la infección y a todo niño con hipoacusia.

## BIBLIOGRAFÍA

## 11. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Zucca C, Binda S, Borgatti R, Triulzi F, Radice L, Buttè C, et al. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection and cortical maldevelopment. *Neurology*. 9 de septiembre de 2003;61(5):710-2.
2. Misono S, Sie KCY, Weiss NS, Huang M-L, Boeckh M, Norton SJ, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pediatric hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;137(1):47-53.
3. Bradford RD, Cloud G, Lakeman AD, Boppana S, Kimberlin DW, Jacobs R, et al. Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *J Infect Dis*. 2005;191(2):227-33.
4. 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*. enero de 2007;17(5):355-63.
5. Peckham C, Tookey P, Logan S, Giaquinto C. Cribado options for prevention of congenital cytomegalovirus infection. *J Med Screen*. enero de 2001;8(3):119-24.
6. Naessens A, Casteels A, Decatte L, Foulon W. A serologic strategy for detecting neonates at risk for congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2005;146(2):194-7.
7. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Calvario A, Germinario C, Bozzi A, et al. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis*

- J. 2006;25(2):156-9.
8. Goderis J, De Leenheer E, Smets K, Van Hoecke H, Keymeulen A, Dhooge I. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*. 2014;134(5):972-82.
  9. 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;22:44-8.
  10. Gaytant M a, Steegers E a P, Semmekrot B a, Merkus HMMW, Galama JMD. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv*. 2002;57(4):245-56.
  11. Estripeaut D, Moreno Y, Ahumada Ruiz S, Martínez a., Racine JD, Sáez-Llorens X. Seroprevalencia de la infección por citomegalovirus en puérperas y su impacto neonatal. *An Pediatría*. 2007;66(2):135-9.
  12. Baquero-Artigao F. [Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection]. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71(6):535-47.
  13. 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):85-9.
  14. Francoual C, Rozenberg F, Gelot A. Congenital cytomegalovirus infection. *Med Mal Infect*. 1996;26 Suppl 3:441-6.

15. Pinillos R, Olloqui A, Torres S. Citomegalovirus congénito neonatal. Comunicación de un caso y revisión. *Acta Pediatr Esp.* 2009;67:234-8.
16. Malm G, Engman M-L. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12(3):154-9.
17. 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):192-7.
18. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics.* 1999;104(1 Pt 1):55-60.
19. Gaytant M a, Rours GIJG, Steegers E a P, Galama JMD, Semmekrot B a. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2003;162(4):248-53.
20. Buonsenso D, Serranti D, Gargiullo L, Ceccarelli M, Ranno O, Valentini P. Congenital cytomegalovirus infection: current strategies and future perspectives. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(7):919-35.
21. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(4):253-76.
22. Dreher a M, Arora N, Fowler KB, Novak Z, Britt WJ, Boppana SB, et al. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2014;164(4):855-9.

23. Fowler KB, Dahle a J, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing cribado: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr.* 1999;135:60-4.
24. Anderson KS, Amos CS, Boppana S, Pass R. Ocular abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *J Am Optom Assoc.* 1996;67(5):273-8.
25. Coats DK, Demmler GJ, Paysse EA, Du LT, Libby C. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *J AAPOS.* 2000;4(2):110-6.
26. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Isaac MDL, Amaral FR, Carvalheiro CG, Aragon DC, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection as a Cause of Sensorineural Hearing Loss in a Highly Immune Population. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(12):1043-6.
27. Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 1997;130(4):624-30.
28. 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):216-20.
29. Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F. A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2008;153(1):84-8.

30. Dahle a J, Fowler KB, Wright JD, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF. Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J Am Acad Audiol.* 2000;11(5):283-90.
31. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B, et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics.* 2006;117(1):e76-83.
32. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RD, Lakeman FD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr.* 2005;146(6):817-23.
33. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis.* 1988;158(6):1177-84.
34. Warren WP, Balcarek K, Smith R, Pass RF. Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol.* 1992;30(4):786-9.
35. Reina J, Weber I, Riera E, Busquets M, Morales C. Utilidad de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en el diagnóstico de infección congénita y posnatal por citomegalovirus. *An Pediatr.* 2014;80(5):299-303.
36. Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini a, Paolucci S, Gerna G. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol.* 1999;14(1):57-

- 66.
37. 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. abril de 2008;106(2):132-7.
  38. Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. Semin Pediatr Infect Dis. enero de 2005;16(1):44-9.
  39. Inoue N, Koyano S. Evaluation of cribado tests for congenital cytomegalovirus infection. Pediatr Infect Dis J. 2008;27(2):182-4.
  40. Pinninti SG, Ross SA, Shimamura M, Novak Z, Palmer AL, Ahmed A, et al. Comparison of saliva PCR assay versus rapid culture for detection of congenital cytomegalovirus infection. Pediatr Infect Dis J. 2015;34(5):536-7.
  41. Ross S a, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, et al. Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. J Infect Dis. 2014;210(9):1415-8.
  42. Boppana SB, Ross S a, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus cribado in newborns. N Engl J Med. 2011;364(22):2111-8.
  43. Williamson WD, Demmler GJ, Percy a K, Catlin FI. Progressive hearing loss in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. Pediatrics. 1992;90(6):862-6.

44. Bosnjak V, Dakovic I, Duranovic V, Lujic L, Kraker G, Marn B. Malformations of Cortical Development in Children with Congenital Cytomegalovirus Infection - A Study of Nine Children with Proven Congenital Cytomegalovirus Infection. *Coll Antropol.* 2011;35(1):229-34.
45. Sureka J, Jakkani RK. Clinico-radiological spectrum of bilateral temporal lobe hyperintensity: A retrospective review. *Br J Radiol.* 2012;85(September):e782-92.
46. 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):762-7.
47. Rosenthal LS, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF, Schmid SD, 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(6):515-20.
48. Paradowska E, Jabłońska A, Studzińska M, Kasztelewicz B, Zawilińska B, Wiśniewska-Ligier M, et al. Cytomegalovirus glycoprotein H genotype distribution and the relationship with hearing loss in children. *J Med Virol.* 2014;86(8):1421-7.
49. Noyola DE, Demmler GJ, Williamson WD, Griesser C, Sellers S, Llorente A, et al. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. *Congenital CMV Longitudinal Study Group. Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:505-10.
50. Ancora G, Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Tridapalli E, Sandri F, et al. Cranial Ultrasound Scanning and Prediction of Outcome in Newborns with

Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Pediatr.* 2007;150(2):157-61.

51. Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus infection: Clinical features and diagnosis. *Uptodate.* 2015;
52. de Vries JJC, Wessels E, Korver AMH, van der Eijk AA, Rusman LG, Kroes ACM, et al. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):232-7.
53. Pignatelli S, Lazzarotto T, Gatto MR, Dal Monte P, Landini MP, Faldella G, et al. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. *Clin Infect Dis.* 2010;51(1):33-41.
54. Paradowska E, Jabłońska A, Studzińska M, Suski P, Kasztelewicz B, Zawilińska B, et al. Distribution of cytomegalovirus gN variants and associated clinical sequelae in infants. *J Clin Virol.* 2013;58(1):271-5.
55. Kimberlin DW, Lin C-Y, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr.* 2003;143(1):16-25.
56. Amir J, Wolf DG, Levy I. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long-term oral valganciclovir. *Eur J Pediatr.* 2010;169(9):1061-7.
57. Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, Ahmed A, Arav-Boger R, Michaels MG,

- et al. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med*. 2015;372(10):933-43.
58. Lackner a, Acham a, Alborn T, Moser M, Engele H, Raggam RB, et al. Effect on hearing of ganciclovir therapy for asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: four to 10 year follow up. *J Laryngol Otol*. 2009;123(4):391-6.
59. Amir J, Attias J, Pardo J. Treatment of late-onset hearing loss in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Clin Pediatr (Phila)*. 2014;53(5):444-8.
60. Nunez-Ramos R, Becerril J, Blazquez D, Rojo P, de Vergas J, Folgueira D, et al. Early diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: lost opportunities. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(2):93-6.
61. Haginoya K, Ohura T, Kon K, Yagi T, Sawaishi Y, Ishii KK, et al. Abnormal white matter lesions with sensorineural hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection: Retrospective diagnosis by PCR using Guthrie cards. *Brain Dev*. 2002;24(7):710-4.
62. van der Knaap MS, Vermeulen G, Barkhof F, Hart A a M, Loeber JG, Weel JFL. Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology*. 2004;230(2):529-36.
63. Pinillos-Pisón R, Llorente-Cereza MT, López-Pisón J, Pérez-Delgado R, Lafuente-Hidalgo M, Martínez-Sapiñá A, et al. [Congenital infection by cytomegalovirus. A review of our 18 years' experience of diagnoses]. *Rev Neurol*. 2009;48(7):349-53.

64. Therrell BL, Hannon WH, Bailey DB, Goldman EB, Monaco J, Norgaard-Pedersen B, et al. Committee report: Considerations and recommendations for national guidance regarding the retention and use of residual dried blood spot specimens after newborn cribado. *Genet Med.* 2011;13(7):621-4.
65. Therrell BL, Hannon WH. Newborn dried blood spot cribado: residual specimen storage issues. *Pediatrics.* febrero de 2012;129(2):365-6.
66. Olney RS, Moore C a, Ojodu J a, Lindegren M Lou, Hannon WH. Storage and use of residual dried blood spots from state newborn cribado programs. *J Pediatr.* 2006;148(5):618-22.
67. Mei J V, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr.* 2001;131(5):1631S - 1636S.
68. Mei J V, Zobel SD, Hall EM, De Jesus VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis.* 2010;2(8):1397-403.
69. 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):465-8.
70. Mei J V, Li L, Rasmussen S a, Collier S, Frias JL, Honein M a, et al. Effect of specimen storage conditions on newborn dried blood spots used to assess *Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM). *Clin Chim Acta.* 2011;412(5-6):455-9.

71. Avettand-Fenoel V, Magny JF, Ville Y, Leruez-Ville M. [Virological tools for the diagnosis, the prognosis and the surveillance of congenital cytomegalovirus infections]. *Arch Pediatr*. 2013;20(2):204-8.
72. de Vries JJC, Vesseur A, Rotteveel LJC, Korver AMH, Rusman LG, Wessels E, et al. Cytomegalovirus DNA detection in dried blood spots and perilymphatic fluids from pediatric and adult cochlear implant recipients with prelingual deafness. *J Clin Virol*. 2013;56(2):113-7.
73. Scanga L, Chaing S, Powell C, Aylsworth AS, Harrell LJ, Henshaw NG, et al. Diagnosis of human congenital cytomegalovirus infection by amplification of viral DNA from dried blood spots on perinatal cards. *J Mol Diagn*. 2006;8(2):240-5.
74. 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(3):943-6.
75. 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(April):1394-8.
76. Hassan J, Herbert M, Smith T, Connell J. Towards improving the retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in dried blood spots. *Viral Immunol*. 2013;26(4):296-9.
77. Shibata M, Takano H, Hironaka T, Hirai K. Detection of human cytomegalovirus

- DNA in dried newborn blood filter paper. *J Virol Methods*. 1994;46(2):279-85.
78. Walter S, Atkinson C, Sharland M, Rice P, Raglan E, Emery VC, et al. Congenital cytomegalovirus: association between dried blood spot viral load and hearing loss. *Arch Dis Child-Fetal*. 2008;93:F280-5.
79. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Pinto PCG, Figueiredo LTM, 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):159-64.
80. Barbi M, Binda S, Primache V, Caroppo S, Didò P, Guidotti P, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol*. 2000;17(3):159-65.
81. Distéfano AL, Alonso A, Martin F, Pardon F. Human cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina. *BMC Pediatr*. 2004;4:11.
82. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V. Neonatal cribado for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *J Clin Virol*. 2006;35(2):206-9.
83. Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Vilarinho L, Vaz Osório R. Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Euro Surveill*. 2009;14(9):13-5.
84. Boppana SB, Ross S a, Novak Z, Shimamura M, Tolan RW, Palmer AL, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA*. 2010;303(14):1375-82.

85. 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(11):3804-6.
86. 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, Supple(0):S37-42.
87. Dollard SC, Schleiss MR, Grosse SD. Public health and laboratory considerations regarding newborn cribado for congenital cytomegalovirus. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:1-6.
88. 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.
89. Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. *Rev Med Virol.* 2006;16(6):385-92.
90. 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(4):278-81.
91. Koontz D, Baecher K, Amin M, Nikolova S, Gallagher M, Dollard S. Evaluation of DNA extraction methods for the detection of Cytomegalovirus in dried blood spots. *J Clin Virol.* 2015;66:95-9.
92. 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(5):575-81.
93. Barbi M, Binda S, Primache V, Luraschi C, Corbetta C. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in dried blood spots. *Clin Diagn Virol.* 1996;6(1):27-32.
94. Binda S, Caroppo S, Didò P, Primache V, Veronesi L, Calvario A, et al. Modification of CMV DNA detection from dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection. *J Clin Virol.* 2004;30(3):276-9.
95. Kharrazi M, Hyde T, Young S, Amin MM, Cannon MJ, Dollard SC. Use of cribado dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2010;157(2):191-7.
96. 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;196:40-4.
97. Dollard SC, Schleiss M. Cribado newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 2010;304(4):407-8.
98. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, Engele H, Rosegger H, Schalk A, et al. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *J Clin Virol.* 2002;25 Suppl 3(December):S81-7.
99. Gurtler V, Mayall BC, Wang J, Ghaly-Derias S. The increased sensitivity of human cytomegalovirus (HCMV) PCR quantitation in whole blood affects reproductive rate (Ro) measurement. *J Virol Methods.* febrero de 2014;196:179-

- 84.
100. Williams EJ, Kadambari S, Berrington JE, Luck S, Atkinson C, Walter S, et al. Feasibility and acceptability of targeted cribado for congenital CMV-related hearing loss. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014;99(3):F230-6.
101. Pass RF. Congenital cytomegalovirus infection: cribado and treatment. *J Pediatr.* agosto de 2010;157(2):179-80.
102. DePasquale JM, Freeman K, Amin MM, Park S, Rivers S, Hopkins R, et al. Efficient linking of birth certificate and newborn cribado databases for laboratory investigation of congenital cytomegalovirus infection and preterm birth: Florida, 2008. *Matern Child Health J.* 2012;16(2):486-94.
103. Nozawa N, Koyano S, Yamamoto Y, Inami Y, Kurane I, Inoue N. Real-time PCR assay using specimens on filter disks as a template for detection of cytomegalovirus in urine. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1305-7.
104. Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, et al. Cribado for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open.* 1 de enero de 2011;1(1):e000118.
105. Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukushima E, Omori K. Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. *Laryngoscope.* 2006;116(11):1991-4.
106. Tagawa M, Tanaka H, Moriuchi M, Moriuchi H. Retrospective Diagnosis of

- Congenital Cytomegalovirus Infection at a School for the Deaf by Using Preserved Dried Umbilical Cord. *J Pediatr.* 2009;155(5):749-51.
107. Bransfield RC. Preventable cases of autism: relationship between chronic infectious diseases and neurological outcome. *Ped Health.* 2009;3:125-40.
108. Sweeten TL, Posey DJ, McDougle CJ. Brief report: autistic disorder in three children with cytomegalovirus infection. *J Autism Dev Disord.* 2004;34(5):583-6.
109. Kawatani M, Nakai A, Okuno T, Kobata R, Moriuchi M, Moriuchi H, et al. Detection of cytomegalovirus in preserved umbilical cord from a boy with autistic disorder. *Pediatr Int.* abril de 2010;52(2):304-7.
110. Australian Cerebral Palsy register Report, Birth Years 1993-2003. Australian Cerebral Palsy register; 2009.
111. Fink KR, Thapa MM, Ishak GE, Pruthi S. Neuroimaging of pediatric central nervous system cytomegalovirus infection. *Radiographics.* 2010;30(7):1779-96.
112. Noyola D, Demmler G, Nelson C. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J ....* 2001;138(3):325-31.
113. Boppana SB, Fowler KB, Vaid Y, Hedlund G, Stagno S, Britt WJ, et al. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics.* 1997;99(3):409-14.

114. de Vries LS, Gunardi H, Barth PG, Bok LA, Verboon-Maciolek MA, Groenendaal F. The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics*. 2004;35(2):113-9.
115. de Vries LS, Verboon-Maciolek M a., Cowan FM, Groenendaal F. The role of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in the diagnosis of infections of the central nervous system. *Early Hum Dev*. 2006;82(12):819-25.
116. Capretti MG, Lanari M, Tani G, Ancora G, Sciutti R, Marsico C, et al. Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev*. 2014;36(3):203-11.
117. Duval M, Park AH. Congenital cytomegalovirus: what the otolaryngologist should know. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;22(6):495-500.
118. Manara R, Balao L, Baracchini C, Drigo P, D'Elia R, Ruga EM. Brain magnetic resonance findings in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Radiol*. 2011;41(8):962-70.
119. Nigro G. Maternal-fetal cytomegalovirus infection: from diagnosis to therapy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22(2):169-74.
120. Cabrerizo de Diago R, Ureña-Hornos T, Gassio-Subirachs R. Infección congénita por citomegalovirus y displasia cortical difusa. *Acta Pediatr Esp*. 2006;64:185-8.
121. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing cribado--a silent revolution. *N Engl J Med*. 2006;354(20):2151-64.

122. Fortnum HM, Summerfield a Q, Marshall DH, Davis a C, Bamford JM. Prevalence of permanent childhood hearing impairment in the United Kingdom and implications for universal neonatal hearing cribado: questionnaire based ascertainment study. *BMJ*. 2001;323(7312):536-40.
123. Kennedy C, McCann D. Universal neonatal hearing cribado moving from evidence to practice. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004;89(5):F378-83.
124. Deltenre P, Van Maldergem L. Hearing loss and deafness in the pediatric population: Causes, diagnosis, and rehabilitation. *Handbook of Clinical Neurology*. 2013. 1527-1538 p.
125. Starr A, Zeng FG, Michalewski HJ. Perspectives on auditory neuropathy: disorders of inner hair cell, auditory nerve and their synapse. En: Basbaum A, Kaneko A, Sheperd G, editores. *The Senses: A Comprehensive Reference*. Ortel Acad. San Diego; 2008.
126. Dodson KM, Georgolios A, Barr N, Nguyen B, Sismanis A, Arnos KS, et al. Etiology of unilateral hearing loss in a national hereditary deafness repository. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 2012;33(5):590-4.
127. Furutate S, Iwasaki S, Nishio S-Y, Moteki H, Usami S-I. Clinical profile of hearing loss in children with congenital cytomegalovirus (CMV) infection: CMV DNA diagnosis using preserved umbilical cord. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(9):976-82.
128. Avettand-Fenoël V, Marlin S, Vauloup-Fellous C, Loundon N, François M, Couloigner V, et al. Congenital cytomegalovirus is the second most frequent cause of bilateral hearing loss in young French children. *J Pediatr*. 2013;162(3):593-9.

129. Vissers LELM, van Ravenswaaij CM a, Admiraal R, Hurst J a, de Vries BB a, Janssen IM, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 2004;36(9):955-7.
130. Cryns K, Van Camp G. Deafness genes and their diagnostic applications. *Audiol Neuro-Otology.* 2004;9(1):2-22.
131. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11(X):161-87.
132. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Ambrosetti U, Corbetta C, Sergi P. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(1):39-42.
133. Ross S a., Novak Z, Kumbla R a., Zhang K, Fowler KB, Boppana S. GJB2 and GJB6 mutations in children with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Res.* 2007;61(6):687-91.
134. De Leenheer EMR, Janssens S, Padalko E, Loose D, Leroy BP, Dhooge IJ. Etiological diagnosis in the hearing impaired newborn: Proposal of a flow chart. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75(1):27-32.
135. Fowler K, Tolan R, Ahmed A. Interim findings of the importance of congenital cytomegalovirus infection in the etiology of childhood hearing loss. En: 13th International CMV/BetaHerpesvirus Workshop, Nuremberg, Germany. 2011.
136. Foulon I, Naessens A, Faron G, Foulon W, Jansen AC, Gordts F. Hearing thresholds in children with a congenital CMV infection: a prospective study. *Int J*

Pediatr Otorhinolaryngol. 2012;76(5):712-7.

137. Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: audiologic outcome. Clin Infect Dis. 2013;57 Suppl 4(Suppl 4):S182-4.
138. Madden C, Wiley S, Schleiss M, Benton C, Meinzen-Derr J, Greinwald J, et al. Audiometric, clinical and educational outcomes in a pediatric symptomatic congenital cytomegalovirus (CMV) population with sensorineural hearing loss. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2005;69(9):1191-8.
139. Royackers L, Rector E, Verhaert N, Desloovere C. Long-term audiological follow-up of children with congenital cytomegalovirus. B-ENT. 2013;Suppl 21:57-64.
140. Numazaki K, Fujikawa T. Chronological changes of incidence and prognosis of children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection in Sapporo, Japan. BMC Infect Dis. 2004;4:22.
141. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med. 1992;326(10):663-7.
142. Ross S, Fowler K, Ashrith G, Stagno S. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. J .... 2006;148(3):332-6.
143. Townsend CL, Forsgren M, Ahlfors K, Ivarsson S-A, Tookey P a, Peckham CS. Long-term outcomes of congenital cytomegalovirus infection in Sweden and the United Kingdom. Clin Infect Dis. 2013;56:1232-9.

144. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, de Lima Isaac M, de Carvalho e Oliveira PF, Boppana S, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis.* 2009;49(4):522-8.
145. Bauer PW, Parizi-Robinson M, Roland PS, Yegappan S. Cytomegalovirus in the perilymphatic fluid. *Laryngoscope.* 2005;115(2):223-5.
146. Park AH, Mann D, Error ME, Miller M, Firpo M a, Wang Y, et al. Comparative analysis of detection methods for congenital cytomegalovirus infection in a Guinea pig model. *JAMA Otolaryngol - head neck Surg.* 2013;139(1):82-6.
147. Harris JP, Fan JT, Keithley EM. Immunologic responses in experimental cytomegalovirus labyrinthitis. *Am J Otolaryngol.* enero de 1990;11(5):304-8.
148. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(2):476-82.
149. Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: A quantitative assessment. *J Clin Virol.* 2008;41(2):57-62.
150. 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(7):943-9.
151. Karltorp E, Hellström S, Lewensohn-Fuchs I, Carlsson-Hansén E, Carlsson PI,

- Engman ML. Congenital cytomegalovirus infection - A common cause of hearing loss of unknown aetiology. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2012;101:357-63.
152. Korver AMH, de Vries JJC, Konings S, de Jong JW, Dekker FW, Vossen ACTM, et al. DECIBEL study: Congenital cytomegalovirus infection in young children with permanent bilateral hearing impairment in the Netherlands. *J Clin Virol*. 2009;46 Suppl 4:S27-31.
153. Stehel EK, Shoup AG, Owen KE, Jackson GL, Sendelbach DM, Boney LF, et al. Newborn hearing cribado and detection of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 2008;121(5):970-5.
154. Declau F, Boudewyns A, Van den Ende J, Peeters A, van den Heyning P. Etiologic and audiologic evaluations after universal neonatal hearing cribado: analysis of 170 referred neonates. *Pediatrics*. 2008;121:1119-26.
155. Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, Koyano S, Nozawa N, Ishibashi K, et al. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J Infect Dis*. 2007;195(6):782-8.
156. Kimani J, Buchman C, Booker J, Huang B, Castillo M, Powell C, et al. Sensorineural hearing loss in a pediatric population: association of congenital cytomegalovirus infection with intracranial abnormalities. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136(10):999-1004.
157. Choi KY, Schimmenti L a, 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 cribado. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(12):1095-8.

158. Rutherford KD, Lerer TS, Schoem SR, Valdez T a. Evaluation of pediatric sensorineural hearing loss: a survey of pediatric otolaryngologists. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2011;120(10):674-81.
159. Hart CK, Choo DI. What is the optimal workup for a child with bilateral sensorineural hearing loss? *Laryngoscope.* abril de 2013;123(4):809-10.
160. de Vries JJC, Vossen ACTM, Kroes ACM, van der Zeijst BAM. Implementing neonatal cribado for congenital cytomegalovirus: addressing the deafness of policy makers. *Rev Med Virol.* 2011;21(1):54-61.
161. Kadambari S, Luck S, Davis a, Williams E, Berrington J, Griffiths P, et al. Clinically targeted cribado for congenital CMV - potential for integration into the National Hearing Cribado Programme. *Acta Paediatr.* 2013;102(10):928-33.
162. Park AH, Duval M, Mcvicar S, Bale JF, Hohler N, Carey JC. A diagnostic paradigm including cytomegalovirus testing for idiopathic pediatric sensorineural hearing loss. *Laryngoscope.* 2014;(November):2624-9.
163. Williams EJ, Gray J, Luck S, Atkinson C, Embleton ND, Kadambari S, et al. First estimates of the potential cost and cost saving of protecting childhood hearing from damage caused by congenital CMV infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* noviembre de 2015;100(6):F501-6.
164. Kadambari S, Luck S, Davis A, Walter S, Agrup C, Atkinson C, et al. Evaluating the feasibility of integrating salivary testing for congenital CMV into the Newborn Hearing Cribado Programme in the UK. *Eur J Pediatr.* 2015;

165. Ciorba A, Bovo R, Trevisi P, Bianchini C, Arboretti R, Martini A. Rehabilitation and outcome of severe profound deafness in a group of 16 infants affected by congenital cytomegalovirus infection. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* octubre de 2009;266(10):1539-46.
166. ACMG. Newborn cribado: toward a uniform cribado panel and system. *Pediatrics.* 2006;117(5):S296-307.
167. Pass RF. Dried blood spots and universal newborn cribado for congenital cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis.* 1 de marzo de 2011;52(5):582-4.
168. Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang M-L, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2009;360(12):1191-9.
169. World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research involving human subjects. In: World Medical Association. URL: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/index.html>
170. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for Good Clinical Practice. In: ICH. URL: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>
171. Boletín Oficial del Estado. Real decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. BOE núm.33, de 7-2-2004, pp.5429-5443.
172. Boletín Oficial del Estado. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. BOE núm.159, de 4-7-2007, pp.28826-28848.

173. Harrison G. Cytomegalovirus. En: Cherry J, Harrison G, Kaplan S, editores. Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 7.<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014. p. 1969.
174. Waters A, Jennings K, Fitzpatrick E, Coughlan S, Molloy EJ, De Gascun CF, et al. Incidence of congenital cytomegalovirus infection in Ireland: Implications for cribado and diagnosis. *J Clin Virol*. 2014;59(3):156-60.
175. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*. 2010. p. 202-13.
176. Botet F, Figueras Aloy J, Álvarez E, de Alba C, Dorronsolo I, Echaniz Urcelay I, et al. Cribado universal de infección por citomegalovirus en prematuros de menos de 1.500 g. *An Pediatr*. 2014;(xx):1-4.
177. Escosa-García L, Baquero-Artigao F, Noguera-Julian A, Blázquez-Gamero D. [Cytomegalovirus cribado in less than 1500 g premature newborns. National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry Scientific committee]. *An Pediatr*. 2015;83(1):70-1.
178. Vives-Oñós I, Soler-Palacín P, Codina-Grau MG, Martín-Nalda A, López-Galera RM, Marín-Soria JL, 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):570-3.
179. Gibson CS, Maclennan AH, Goldwater PN, Haan E a, Priest K, Dekker G a. Neurotropic viruses and cerebral palsy: population based case-control study. *BMJ*. 2006;332(7533):76-80.

180. Fryer J, Heath A, Anderson R, Minor P. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Rep 2010. 2010;WHO/BS/10.2138.
181. McMichael G, MacLennan A, Gibson C, Alvino E, Goldwater P, Haan E, et al. Cytomegalovirus and EpsteinBarr virus may be associated with some cases of cerebral palsy. *J Matern Neonatal Med.* 2012;25(10):2078-81.
182. Simeone R, Rasmussen S, Mei J, Dollard S, Frias J, Shaw G, et al. Pilot Study Using Residual Newborn Dried Blood Spots To Assess the Potential Role of Cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii* in The Etiology of Congenital Hydrocephalus. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2013;97(7):431-6.
183. McMullan B, Palasanthiran P, Jones C, Hall B, Robertson P, Howard J, et al. Congenital cytomegalovirus-time to diagnosis, management and clinical sequelae in Australia: opportunities for earlier identification. *Med J Aust.* 2011;194(12):625-9.
184. Korver AMH, Konings S, Dekker FW, Beers M, Wever CC, Frijns JHM, et al. Newborn hearing cribado vs later hearing cribado and developmental outcomes in children with permanent childhood hearing impairment. *JAMA.* 2010;304(15):1701-8.

## ANEXOS

## ANEXO 1. ANEXO I, DOCUMENTO DE CESIÓN DE MUESTRAS



### ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS

Yo, Jolanda González Iratola, como responsable de la custodia de los papeles de filtro del screening neonatal cedo temporalmente las muestras a Raquel Pinillos Pisón, facultativo especialista de área de la unidad de neonatología del Hospital Universitario Miguel Servet e investigadora principal del proyecto "estudio retrospectivo de la infección congénita por citomegalovirus en encefalopatías e hipoacusias de causa no establecida". Las muestras permanecerán en el servicio de microbiología a cargo de la doctora Martínez-Sapiña como investigadora colaboradora y facultativo especialista del servicio de microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet durante el tiempo que suponga llevar a cabo las determinaciones. A continuación la doctora Martínez-Sapiña (unidad de microbiología) y la doctora Raquel Pinillos (unidad de neonatología/pediatría) se comprometen a entregar de nuevo las muestras a la unidad de bioquímica para su custodia definitiva.

Fdo Raquel Pinillos Pisón

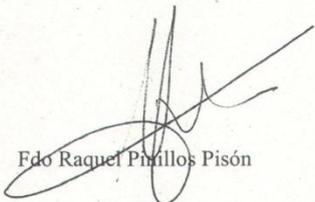
En Zaragoza, Octubre de 2015.

Fdo. Jolanda González Iratola

#### ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS

Yo, D. Juan José Puente Lanzarote, como responsable de la custodia de los papeles de filtro de screening neonatal, cedo temporalmente las muestras a Raquel Pinillos Pisón, facultativo especialista de área de la unidad de neonatología del Hospital Universitario Miguel Servet e investigadora principal del proyecto "Estudio retrospectivo de la infección congénita por citomegalovirus en encefalopatías e hipoacusias de causa no establecida".

Las muestras permanecerán en el Servicio de Microbiología a cargo de la doctora Martínez-Sapiña como investigadora colaboradora y facultativo especialista del servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet durante el tiempo necesario para llevar a cabo las determinaciones. A continuación la doctora Martínez-Sapiña (Servicio de Microbiología) y la doctora Raquel Pinillos (Unidad de Neonatología/Pediatría) se comprometen a entregar de nuevo las muestras al Servicio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario para su custodia definitiva.

  
Fdo Raquel Pinillos Pisón

  
Fdo. Juan José Puente Lanzarote

En Zaragoza, 15 de octubre de 2015

## ANEXO 2. DICTAMEN FAVORABLE DEL COMITÉ DE ÉTICA (ANEXO II).

 **GOBIERNO DE ARAGON**  
Departamento de Sanidad

**Informe Dictamen Favorable**  
**Proyecto Investigación Biomédica**  
C.P. - C.I. PI15/0252  
14 de octubre de 2015

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

**1º.** Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 14/10/2015, Acta Nº 16/2015 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

**Título: Estudio retrospectivo de infección congénita por citomegalovirus en encefalopatías e hipoacusias de causa no establecida.**

**Investigador Principal: Raquel Pinillos Pisón. HU Miguel Servet**

**Versión protocolo: septiembre/2015**  
**Versión hoja de información a los participantes y consentimiento informado: v 1, de 24/09/2015**

**2º.** Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

**3º.** Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 14 de octubre de 2015

Fdo:

  
Dña. María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

Página 1 de 1

Tel. 976 71 48 57 Fax. 976 71 55 54 Correo electrónico mgonzalezh.ceic@aragon.es