

ARTÍCULOS ORIGINALES

CITOMEGALVIROSIS CONGÉNITA EN POBLACIÓN ASINTOMÁTICA DE RECIÉN NACIDOS DE UN HOSPITAL PÚBLICO EN LA REGIÓN NORDESTE DE ARGENTINA

Asymptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection in Newborn Population of a Public Hospital in the Northeastern Region of Argentina

Héctor Marín,¹ Gerardo Deluca,¹ María Urquijo,¹ Gustavo Giusiano¹

RESUMEN. INTRODUCCIÓN: La infección por citomegalovirus (CMV) es muy frecuente en el norte argentino y conlleva un alto riesgo para los neonatos, que pueden adquirirla durante el período fetal y desarrollar la enfermedad de inclusión citomegálica con una probabilidad variable de aparición de secuelas progresivas. Aunque la infección sintomática es diagnosticada en la mayoría de los casos, no ocurre lo mismo con los recién nacidos infectados pero asintomáticos. **OBJETIVOS:** Determinar la presencia del CMV en una población silente de neonatos, considerando el riesgo de desarrollo de secuelas debido a la falla diagnóstica y la ausencia de un tratamiento oportuno. **MÉTODOS:** Durante el período 2010-2012 se estudiaron 285 muestras correspondientes a recién nacidos asintomáticos del Servicio de Neonatología del Hospital Perrando de la ciudad de Resistencia. La detección del CMV se efectuó en muestras de sangre seca de tarjetas metabólicas, mediante PCR anidada. **RESULTADOS:** Se encontró ADN de CMV en 14 muestras, lo que representa el 5% del total analizado. **CONCLUSIONES:** La elevada seroprevalencia de CMV en la región y las condiciones socioeconómicas de los pacientes que asisten a este hospital público podrían explicar la frecuencia de infección congénita encontrada en el estudio. La técnica de PCR permite realizar un diagnóstico temprano en una población de recién nacidos con riesgo de desarrollar secuelas en un futuro cercano.

ABSTRACT. INTRODUCTION: Cytomegalovirus (CMV) infection is very frequent in Northern Argentina. It involves a high risk for newborns, who may acquire the infection during the fetal period and then develop cytomegalic inclusion disease with a variable probability of progressive consequences. Although symptomatic infection is in most cases diagnosed, the situation is not the same with infected but asymptomatic newborns. **OBJECTIVES:** To determine the presence of CMV in a silent population of infants, considering the risk of developing sequelae due to diagnosis failure and absence of early treatment. **METHODS:** A total of 285 samples of asymptomatic newborns from the Neonatology Service of Perrando Hospital (Resistencia city) were studied during 2010-2012. CMV detection was performed in dry blood spot on cards by nested PCR. **RESULTS:** CMV DNA was detected in 14 samples, representing 5% of the total analyzed. **CONCLUSIONS:** The high seroprevalence of CMV infection in this region and the low socioeconomic status of the patients attending this public hospital may explain the frequency of congenital infection found in the study. PCR technique allows early diagnosis of a population of newborns at risk to develop sequelae in the near future.

PALABRAS CLAVE: Citomegalovirus - Infección congénita - PCR

KEY WORDS: Cytomegalovirus - Congenital infection - PCR

¹ Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: Secretaría General de Ciencia y Técnica, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste.

FECHA DE RECEPCIÓN: 3 de abril de 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN: 15 de diciembre de 2014

CORRESPONDENCIA A: Héctor Marín
Correo electrónico: marinhector39@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La infección por citomegalovirus (CMV) se caracteriza por su elevada morbimortalidad en los neonatos, que la adquieren durante el período fetal y desarrollan enfermedad de inclusión citomegálica, caracterizada por microcefalia, calcificaciones cerebrales, coriorretinitis, hipoacusia, hepatoesplenomegalia, petequias, etc. Este agente viral es la causa más frecuente de infección congénita en el ser humano, con una prevalencia mundial que varía entre 0,64 y 2%.^{1,2} Los síntomas sólo se presentan en alrededor de un 10% de los neonatos infectados in utero; en el resto la infección pasa inadvertida.³ Sin embargo, aproximadamente el 80% y el 15% de las poblaciones sintomáticas y asintomáticas, respectivamente, desarrolla secuelas progresivas durante la infancia, que suelen manifestarse antes de los dos años de vida.^{2,3} Entre las más frecuentes se encuentran el retardo

del crecimiento psicomotriz o alguna otra anomalía neurológica, la hipoacusia sensorineural, los defectos de la dentición y la coriorretinitis.^{1,3-6}

En la embarazada, tanto la primoinfección como la recurrencia pueden transmitirse al feto. En el primer caso el riesgo de infección fetal es elevado (aproximadamente un 40%), mientras que en una infección materna recurrente la probabilidad no llega al 1%.^{3,6,7}

El diagnóstico congénito es certero si la muestra se obtiene dentro de las dos primeras semanas de vida del neonato. Una vez transcurrido ese tiempo, resulta difícil efectuar la distinción respecto a una infección perinatal, que no genera secuelas y es asintomática o se presenta como un síndrome mononucleósido.^{6,7}

El método de referencia para el diagnóstico es el aislamiento viral en cultivo primario de fibroblastos humanos diploides a partir de orina o saliva, pero no es de uso rutinario. El desarrollo de técnicas moleculares de amplificación de ADN viral por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido detectar el CMV en neonatos con mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas serológicas.⁸ Además puede aplicarse a una amplia variedad de muestras y requiere escasos volúmenes.⁹ Particularmente, la detección de CMV por PCR en sangre seca de tarjetas metabólicas o tarjetas de Guthrie cobró importancia en estudios epidemiológicos retrospectivos desarrollados en todo el mundo, con sensibilidad y especificidad comparables al cultivo viral.¹⁰⁻¹² Actualmente se encuentra en evaluación la detección prospectiva en este tipo de muestras neonatales, a través de la técnica de PCR en tiempo real.¹³⁻¹⁵ En Argentina se han realizado estudios serológicos y moleculares acerca de la prevalencia e incidencia de este agente.^{16,17} Asimismo, se ha analizado la presencia de mutaciones relacionadas con la pérdida de audición, señalada como secuela directa de la infección congénita por CMV.¹⁸ No obstante, es sumamente escasa la información epidemiológica de la presencia del CMV en la población neonatal del Nordeste argentino. En este sentido, cabe destacar que la instauración de un tratamiento oportuno, a partir de un diagnóstico temprano y certero, es fundamental para disminuir la morbilidad en la población neonatal sintomática y evitar secuelas progresivas en recién nacidos que cursan una infección subclínica.^{3,6,7}

El objetivo de este trabajo fue aplicar un método molecular para determinar la presencia de CMV en recién nacidos asintomáticos de la ciudad de Resistencia; situada en la región Nordeste de Argentina.

MÉTODOS

Durante el período comprendido entre febrero de 2010 y febrero de 2011 se estudiaron 285 muestras de sangre correspondientes a recién nacidos del Servicio de Neonatología del Hospital Dr. Julio C. Perrando de la ciudad de Resistencia, Chaco. Teniendo en cuenta que este hospital registra aproximadamente 3.000 nacimientos anuales¹⁹ y considerando para el estudio un nivel de confianza del 95%, una precisión del 2% y una prevalencia estimada de

CMV del 2%,^{1,2} el N resultante a testear sería de 177. En esta serie se logró recoger 285 muestras, habida cuenta de la predisposición de los pacientes (consentimiento de la madre) y el cumplimiento de los criterios abajo descriptos. El muestreo se realizó dentro de los primeros 15 días posteriores al nacimiento de los neonatos asintomáticos (aquellos casos sin signos de laboratorio o evidencias clínicas que hicieran suponer la presencia de infección intrauterina por CMV). Se incluyó solamente a los recién nacidos a término, es decir, de 37-42 semanas de gestación y con un peso comprendido entre los 2.500 y los 4.000 gramos.

En todos los casos se procedió a realizar un consentimiento informado por la madre. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).

El análisis se llevó a cabo en el Área de Biología Molecular del Instituto de Medicina Regional de la UNNE en Resistencia, Chaco.

Para obtener el material genético, se recurrió a las muestras de sangre seca de las tarjetas metabólicas o de Guthrie; se removieron con un sacabocados 3 discos de 3 mm de diámetro, que se colocaron en un microtubo de 1,5 ml. Luego se agregaron 30 µl de MEM (medio mínimo de mantenimiento) sin aditivos a cada tubo, y se calentaron a 55 °C durante 60 minutos y posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Por último, fueron enfriados rápidamente a 4 °C y centrifugados a 10.000 RPM durante 3 minutos. El sobrenadante fue transferido a otro microtubo y guardado a -80 °C durante 1 hora, antes de ser usado directamente como templado para la reacción de PCR.^{20,21}

La detección del material genómico viral se efectuó mediante una PCR anidada, utilizando los cebadores desarrollados por Darlington,²² que amplifican un fragmento de la región UL-55 del genoma viral correspondiente al gen de la glucoproteína B de la envoltura del CMV (100 pb). Se emplearon 5 µl de templado en la primera ronda de amplificación y 10 µl del producto de esta en la segunda ronda, con una técnica caracterizada por niveles de sensibilidad y especificidad superiores al 95%.¹⁰⁻¹²

La PCR anidada se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción consistió en 5 µl de solución tampón de PCR 10X, que contenía 10 mM Tris-ClH (pH 8,3), 50 mM ClK, 1,5 mM Cl2Mg, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada cebador y Taq polimerasa (5 U/ul).

Las condiciones de ciclado para la primera ronda de la PCR anidada fueron las siguientes: una primera ronda de amplificación con un período de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 15 segundos a 58 °C y 15 segundos a 72 °C y un tiempo de extensión final de 5 minutos a 72 °C. La segunda ronda sólo difirió de la primera en que se desarrollaron 30 ciclos de amplificación y la temperatura de hibridación de los cebadores fue de 50 °C.

Se consideraron positivos los pacientes en los cuales se detectó ADN viral y se llevó a cabo un seguimiento por profesionales del Servicio de Otorrinolaringología del hospital, a

través del método de otoemisiones acústicas. La observación se efectuó hasta los dos años de vida.

Cada serie de muestras procesadas se incluyó un control positivo que consistió en ADN de cultivo celular infectado con CMV, cedido por el Laboratorio Central del Hospital Italiano de Buenos Aires, y un control negativo (papel de filtro embebido en agua destilada estéril). La muestra sin banda de amplificación específica fue considerada negativa, previa amplificación de una secuencia del gen de la β -globina humana (260 pb), a fin de verificar la integridad y calidad del ADN extraído.²³

Los productos de PCR obtenidos fueron corridos en gel de agarosa al 2% durante 40 minutos a 100 V, en *buffer* TAE, teñidos con solución de bromuro de etidio (0,5 ug/ml) y visualizados en transiluminador UV (320 nm).²²

Los datos epidemiológicos, recogidos en una ficha, se guardaron en una base de datos confeccionada con el programa Epi Info versión 3.5.1 (CDC - *Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Estados Unidos).

RESULTADOS

La frecuencia encontrada en el análisis de sangre seca de los 285 neonatos fue del 5% (IC95%: 2,4-7,8%), con ADN de CMV en 14 muestras. En los casos positivos, se realizó el monitoreo hasta los dos años de vida; en 2 pacientes (14%) se detectó hipoacusia unilateral, que fue considerada como secuela de la infección congénita por CMV, ya que esos niños no presentaban signos de desnutrición, otras infecciones congénitas ni factores que pudieran influir en el compromiso auditivo. Ningún otro niño infectado por CMV desarrolló secuelas en el período de observación. Todos los casos considerados negativos presentaron amplificación positiva para el gen de β -globina humana.

DISCUSIÓN

La frecuencia de infección congénita por CMV encontrada en este estudio puede considerarse elevada en comparación con la casuística mundial (0,64-2%).^{1,2} Aunque se estima que en países en vías de desarrollo la prevalencia llegaría al 5%, esos datos no están disponibles debido a la falta de registro epidemiológico.²⁴ En general, se encontraron prevalencias muy variables en todo el mundo con respecto a la citomegalovirus congénita. En Japón²⁵ y Hungría²⁶ se detectó CMV en el 10% y el 16% de los neonatos estudiados, respectivamente. En otros lugares se registraron prevalencias más bajas, como en Brasil²⁷ (2,6%), México²⁸ (0,68%) y Eslovenia²⁹ (0,14%). En Argentina, Distéfano¹⁶ halló una frecuencia del 14%, pero el estudio se realizó en niños de la provincia de Buenos Aires con sospecha de infección por CMV. Por su parte, Streitenberger¹⁸ detectó un 0,6% de prevalencia en una población de recién nacidos perteneciente a la ciudad de Bahía Blanca.

La alta frecuencia detectada en la población analizada podría atribuirse al hecho de que las muestras provenían de un hospital público, caracterizado por recibir pacientes con baja condición socioeconómica,³⁰ a diferencia de la población

mencionada de Bahía Blanca.¹⁸ El nivel socioeconómico bajo está directamente relacionado con el incremento de la transmisión congénita del CMV a través de determinadas condiciones asociadas, como escasa higiene, baja edad materna y promiscuidad sexual elevada.^{6,7} Otro factor ligado a los resultados encontrados es la elevada seroprevalencia de CMV informada en los habitantes del Nordeste del país, con registros del 80% en población general y de hasta el 90% en zonas rurales.³¹ Este hecho está descrito como una de las causas principales de infección congénita, que aumenta la probabilidad de reinfección en embarazadas seropositivas. Si bien la inmunidad materna jugaría un rol determinante en la transmisión transplacentaria, existe la posibilidad de reinfección con otros tipos de CMV, lo cual adquiere mayor importancia cuanto mayor es la circulación viral.^{3,4,6,7} Por otro lado, cabe destacar la influencia de la población rural en la estadística observada en este estudio, dado que el hospital donde se efectuó el muestreo presta asistencia a pacientes de distintas localidades del interior provincial.³⁰

El desarrollo de técnicas moleculares de amplificación de ADN viral por PCR ha permitido detectar el CMV en diversos tipos de muestras (orina, saliva, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico y sangre seca de tarjetas metabólicas) con mayor sensibilidad y especificidad que los métodos serológicos, y con un pequeño volumen de espécimen requerido.⁹ Esto es destacable, habida cuenta de que el volumen de muestra en recién nacidos resulta siempre limitante. Numerosos estudios avalan el uso de tarjetas metabólicas como soporte alternativo, destacando su elevada sensibilidad y especificidad en comparación con la técnica de detección en orina, que es considerada actualmente como el método de elección,^{13,14,17} aunque pueden existir limitaciones en cuanto al método de extracción de ADN a partir del papel. En Argentina se aplicó el método descrito por Shibata²⁰ y más tarde por Barbi,²¹ que presenta una marcada variación en la detección posterior del CMV a medida que disminuye la carga viral del soporte. Esta disminución en la sensibilidad se puede solucionar mediante el testeo por triplicado, lo que logra la equiparación a un método de extracción más moderno.^{32,33} En el presente estudio, la aplicación de la técnica de PCR en sangre seca de tarjetas metabólicas determinó una elevada circulación de CMV en una población vulnerable del Nordeste de Argentina; pero, además, el 14% de los neonatos en los cuales se detectó CMV presentó la secuela característica de la infección intrauterina por este virus. Este porcentaje coincide con lo descrito en poblaciones de recién nacidos asintomáticos, en las cuales se ha detectado CMV.²³ Es importante destacar que el seguimiento audiológico desarrollado por médicos del Hospital Perrando solamente se llevó a cabo en los niños con PCR positiva para CMV, lo que denota la importancia del diagnóstico precoz de este virus.

La detección molecular de CMV debería implementarse junto al tamizaje de patologías metabólicas que conforman el estudio obligatorio de pesquisa neonatal, dado que su alta sensibilidad y especificidad permitiría un enfoque médico

más certero en el manejo de recién nacidos infectados asintomáticos. Esto coincide con otros autores (Yinon,³ Distéfano,¹⁶ Streitenberger,¹⁸ Gomila,³⁴ Townsend³⁵), que sugieren que tanto los recién nacidos sintomáticos como los asintomáticos deberían ser testeados mediante técnicas de detección temprana, a fin de establecer el diagnóstico diferencial entre etapa congénita y perinatal, instaurar un tratamiento antiviral adecuado, e incluso el seguimiento audiológico hasta la edad escolar (debido al riesgo de desarrollar hipoacusia tardía), y favorecer la mejor recuperación de los niños afectados.

RELEVANCIA PARA POLÍTICAS E INTERVENCIONES SANITARIAS

El aporte de datos epidemiológicos acerca de infección congénita por CMV, hasta ahora inexistentes en la región, permitirá a las autoridades pertinentes implementar estrategias sanitarias adecuadas, que aborden la problemática de esta patología en sus distintos estadios (diagnóstico, tratamiento y monitoreo de secuelas). Este sería el principal aporte del presente trabajo, dentro de un marco donde la fase de mayor morbilidad del virus aparece en la etapa gestacional y neonatal.

RELEVANCIA PARA LA FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS EN SALUD

Los resultados encontrados son una importante referencia para el estudio universitario de esta patología en las carreras de Medicina, Bioquímica y otras relacionadas con la salud, sobre todo porque casi no hay trabajos de prevalencia de infección congénita por citomegalovirus en esta región argentina. Además, el desarrollo de este estudio permitió la participación e integración de médicos y personal de salud, actualizando sus conocimientos acerca de la infección citomegálica.

RELEVANCIA PARA LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

El presente trabajo demuestra una marcada circulación del CMV en una población de recién nacidos y resulta de interés tanto para médicos pediatras clínicos como para la comunidad científica dedicada al estudio de infecciones

neonatales. A partir de la investigación futura de los factores de riesgo locales, podrán surgir recomendaciones sobre pautas de prevención, que significarían un aporte en las tareas tendientes a disminuir la incidencia de la infección y sus secuelas. El estudio también promueve la aplicación de nuevas metodologías de diagnóstico con mayor sensibilidad y especificidad que las que se utilizan actualmente en la región, resaltando la importancia del diagnóstico precoz y el monitoreo de infantes infectados congénitamente como alternativa para corregir secuelas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angélica Distéfano, por el asesoramiento proporcionado en la técnica aplicada y las numerosas consultas a lo largo del período de estudio. Al Dr. Horacio Moreno, por su predisposición e interés. A la Dra. Beatriz Livellara, por proveer el control positivo de ADN viral.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
CMV	Citomegalovirus
ClH	Acido clorhídrico
ClK	Cloruro de potasio
Cl2Mg	Cloruro de magnesio
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
IC	Intervalo de confianza
MEM	Medio mínimo de mantenimiento
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanometro
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmoles	Picomoles
RPM	Revoluciones por minuto
TAE	Tris acético edta
Taq	Thermus aquaticus
U	Unidades
ug	Microgramo
ul	Microlitro
uM	Micromolar
UNNE	Universidad Nacional del Nordeste
UV	Ultravioleta
V	Voltio

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES: No hubo conflicto de intereses durante la realización del estudio.

Cómo citar este artículo: Marín H, Deluca G, Urquijo M, Giusiano, G. Citomegalovirus congénita en población asintomática de recién nacidos de un hospital público en la región nordeste de Argentina. *Rev Argent Salud Pública*. 2014;Sep;5(20):6-10.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Foulon A, Naessens W, Casteels F, et al. A 10-Year Prospective Study of Sensorineural Hearing Loss in Children with Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Pediatr*. 2008;153:84-8.
- ² Royackers L, Christian D, Frans D, Ermelinde R. Hearing Status in Children with Congenital Cytomegalovirus: Up-To-6-Years Audiological Follow-Up. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011;75(3):376-82.
- ³ Yinon Y, Farine D, Yudin MH. Screening, Diagnosis, and Management of Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 2010;65(11):736-43.
- ⁴ Ornoy A, Diav-Citrin O. Fetal Effects of Primary and Secondary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2006;21:399-409.
- ⁵ Milewska-Bobula B, Zebrowska J, Olszaniecka M, Pijanowska S, et al. Evaluation of Intellectual Development of Children Following Congenital, Mildly Symptomatic Cytomegalovirus (CMV) Infection. A Prospective Study. *Med Wieku Rozwoj*. 2010;14(4):370-3.
- ⁶ Plosa EJ, Esbenschade JC, Fuller MP, Weitkamp JH. Cytomegalovirus Infection. *Pediatr Rev*. 2012;33(4):156-63.
- ⁷ Johnson J, Anderson B, Pass RF. Prevention of Maternal and Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55(2):521-30.
- ⁸ Freymut F, Gennetay G, Petitjean J, Eugene G, et al. Comparison of Nested PCR for Detection of DNA in Plasma with pp65 Leukocytic Antigenemia Procedure for Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection. *J Clin Microbiol*. 1994;32:1614-8.
- ⁹ Miller MJ, Bovey S, Pado K, Brukner DA, et al. Application of PCR to Multiple Specimen Types for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection: Comparison with Cell Culture and Shell Vial Assay. *J Clin Microbiol*. 1994;32:5-10.
- ¹⁰ Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of Congenital CMV Infection Via Dried Blood Spots. *Rev Med Virol*. 2006;16(6):385-92.
- ¹¹ Mosca F, Pagni L. Cytomegalovirus Infection: The State of the Art. *J Chemother*. 2007;19 Suppl. 2:46-8.
- ¹² Pinillos-Pisón R, Llorente-Cereza MT, López-Pisón J, Pérez Delgado R, et al. Congenital Infection by Cytomegalovirus. A Review of Our 18 Years' Experience of Diagnoses. *Rev Neurol*. 2009;48(7):349-53.
- ¹³ Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, Castel C, 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.
- ¹⁴ Pass RF. Dried Blood Spots and Universal Newborn Screening for Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(5):582-4.
- ¹⁵ De Vries JJ, Barbi M, Binda S, Claas EC. Extraction of DNA from Dried Blood in the Diagnosis of Congenital CMV Infection. *Methods Mol Biol*. 2012;903:169-75.
- ¹⁶ Distéfano AL, Alonso A, Martín F, Pardon F. Human Cytomegalovirus: Detection of Congenital and Perinatal Infection in Argentina. *BMC Pediatr*. 2004;4(1):1-8.
- ¹⁷ Distéfano AL, González CA, Pardón F, Sarubi MA, et al. Diagnóstico de la infección congénita por citomegalovirus en muestras de sangre seca de recién nacidos en la tarjeta de Guthrie. Una técnica promisoriosa. *Arch Argent Pediatr*. 2008;106(2):132-7.
- ¹⁸ Streitenberger ER, Suárez AI, Masciovecchio MV, Laurnagaray D, et al. Audiologic and Molecular Screening for Hearing Loss by 35delG Mutation in Connexin 26 Gene and Congenital Cytomegalovirus Infection. *Arch Argent Pediatr*. 2011;109(6):479-84.
- ¹⁹ Ministerio de Salud de la Nación, Organización Panamericana de la Salud. *Indicadores Básicos 2010*. [Disponible en: <http://www.bvs.org.ar/pdf/indicadores2010.pdf>]. [Último acceso: 26 de noviembre de 2014].
- ²⁰ Shibata M, Takano H, Hironaka T, Hirai K. Detection of Human Cytomegalovirus DNA in Dried Newborn Blood Filter Paper. *J Virol Methods*. 1994;46:279-85.
- ²¹ 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.
- ²² Darlington J, Super M, Patel K, Grundy JE, et al. Use of the Polymerase Chain Reaction to Analyse Sequence Variation within a Major Neutralizing Epitope of Glycoprotein B (gp58) in Clinical Isolates of Human Cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 1991;72(8):1985-9.
- ²³ Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 1988;239:487-91.
- ²⁴ Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppina SB, et al. The "Silent" Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2013;6(1):86-102.
- ²⁵ Oda K, Oki S, Tsumura N, Nakao M, et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in Urine from Newborns in NICU Using a Polymerase Chain Reaction. *Kurume Med J*. 1995;42:39-44.
- ²⁶ Nagy A, Endreffy E, Streitman K, Pinter S, et al. Incidence and Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Selected Groups of Preterm and Full-Term Neonates under Intensive Care. *In Vivo*. 2004;18(6):819-23.
- ²⁷ Yamamoto AV, Mussi-Pinhata MM, Figueiredo LTM. Prevalencia e aspectos clínicos da infecção congénita por citomegalovirus. *J. Pediatr (Rio)*. 1999;75:23-8.
- ²⁸ Noyola DE, Matienzo-Serment L, Rodríguez-Vidal SO, Ochoa-Pérez UR, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection in Newborn Infants from the State of San Luis Potosí, Mexico. *Salud Pública Mex*. 2011;53(6):513-5.
- ²⁹ Paradiž KR, Seme K, Puklavec E, Paro-Panjan D, et al. Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection in Slovenia: A Study on 2,841 Newborns. *J Med Virol*. 2012;84(1):109-15.
- ³⁰ Ministerio de Salud de la Nación, Organización Panamericana de la Salud. *Indicadores Básicos 2012*. [Disponible en: http://www.deis.gov.ar/publicaciones/archivos/indicadores_2012.pdf]. [Último acceso: 26 de noviembre de 2014].
- ³¹ González CA, Martín F, Mallimaci MC, Legina M, et al. Prevalencia de anticuerpos para citomegalovirus en embarazadas y población indígena. En: XXIV Jornadas Científicas Anuales de la Sociedad Argentina de Virología. Córdoba: Sociedad Argentina de Virología; 2004.
- ³² 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.
- ³³ De Vries JC, 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;4:37-42.
- ³⁴ Gomila A, Rivas N, López EL. Infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)*. 2008;69(4):311-5.
- ³⁵ Townsend CL, Forsgren M, Ahlfors K, Ivarsson SA, et al. Long-Term Outcomes of Congenital Cytomegalovirus Infection in Sweden and the United Kingdom. *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1232-9.