

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**PREVALENCIA DE INFECCIÓN CONGENITA POR CMV EN
RECIEN NACIDOS POR TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO LAS
TARJETAS DEL TAMIZ NEONATAL EN EL INSTITUTO
NACIONAL DE PERINATOLOGÍA**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INFECTOLOGÍA

P R E S E N T A:

DRA. DOMINIQUE ONDINA ARGUELLES CHÁVEZ

**DR. ENRIQUE SEGURA CERVANTES
DIRECTOR DE TESIS**



México D.F.

Julio 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

**PREVALENCIA DE INFECCIÓN CONGENITA POR CMV EN RECIEN
NACIDOS POR TECNICA DE PCR UTILIZANDO LAS TARJETAS DEL TAMIZ
NEONATAL EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA**

DRA. VIRIDIANA GORBEA CHÁVEZ

Directora de Enseñanza

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

DR. ENRIQUE SEGURA CERVANTES

Profesor titular del Curso de Especialización en Infectología
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

DR. ENRIQUE SEGURA CERVANTES

Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por motivarme y brindarme fortaleza para ver los problemas como oportunidad de crecer y hacerme entender que mi mejor herencia ha sido mi carrera.

A mi hermano por cuidarme, escucharme, ser mi amigo y ejemplo a seguir.

A Oliver por ser una gran personas, caminar junto a mí, apoyarme, motivarme, enseñarme cosas maravillosas de la vida y ser mi motivo de ser.

A mis maestros: por regalarme su experiencia y conocimiento.

INDICE

Resumen	5
Introducción.....	6
Marco Teórico.....	7
Planteamiento del problema.....	16
Justificación.....	16
Pregunta de Investigación.....	16
Objetivos.....	17
Metodología.....	17
Diseño de estudio.....	17
Lugar y duración del estudio.....	17
Universo.....	17
Criterios de Inclusión.....	17
Criterios de exclusión.....	18
Métodos.....	18
Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	
Extracción de ADN.....	18
Amplificación de ADN.....	19
Resultados.....	20
Referencias bibliográficas.....	21

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La infección congénita por citomegalovirus es la causa viral más común a nivel mundial y más frecuente en países desarrollados, con una prevalencia que oscila entre 0.03 y el 2.4%. Debido a su alta prevalencia, el CMV congénito es una de las causas más frecuentes de retraso psicomotor y sordera neurosensorial de origen infeccioso. Del total de infectados el 90-95% serán asintomáticos en el nacimiento y de esos alrededor de un 15% desarrollarán secuelas. De los 5- 10% restantes sintomáticos el 90% tendrán secuelas principalmente neurológicas. Los métodos diagnósticos para la infección congénita presentan inconvenientes respecto a baja sensibilidad y/o especificidad, en algunas ocasiones con el inconveniente de ser costosos y poco accesibles. Estudios recientes han demostrado la eficacia de las tarjetas de sangre seca obtenidas en los recién nacidos dentro de sus primeros 15 días de vida como parte de programas de salud para identificar enfermedades metabólicas, para la identificación de CMV.

OBJETIVO: Estimar la prevalencia de infección congénita por citomegalovirus en recién nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología por medio de la técnica reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tarjetas de tamiz (Guthrie cards) con sangre seca.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realizó una selección aleatorizada de paciente respecto al número total de nacimientos en el Instituto Nacional de Perinatología en el período del 01 Enero al 31 de Diciembre del 2010. De los pacientes seleccionados se tomó una muestra de sus respectivas tarjetas de Guthrie, para la extracción de DNA por medio de la técnica Fenol-Cloroformo y posteriormente se realizará la amplificación de material genético obtenido con la secuencia de oligonucleótidos AGCTGCATGATGTGAGCAAG, GAAGGCTGAGTTCTTGGTAA, TGAGGATAAGCGGGAGATGT, ACTGAGGCAAG TTCTGCAGT. Se realizará de forma conjunta revisión de expedientes de los pacientes seleccionados para identificar factores de riesgo o hallazgos clínicos sugestivos de infección.

RESULTADOS PRELIMINARES

Se seleccionaron 750 pacientes, se tomó muestra a sus respectivas tarjetas de Tamiz. Al momento se ha realizado la revisión de 116 expedientes, Del total de pacientes 56(48.2%) corresponden a sexo femenino y 60 (51.7%) a sexo masculino, 104 (89.6%) pacientes son de término y 12 (10.4%) son pretérmino. En ningún paciente se ha identificado algún dato clínico sugestivo de infección congénita por CMV (microcefalia, hepatoesplenomegalia, neumonitis, etc.). El proyecto se encuentra en la fase de Extracción de DNA de las muestras recolectadas con la técnica ya descrita.

INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus (CMV) es la causa más frecuente de infección congénita a nivel mundial que presenta una elevada morbimortalidad. La primoinfección durante el embarazo condiciona un riesgo elevado de transmisión intrauterina, lo cual puede causar un daño severo al feto que incluyen hepatoesplenomegalia, ictericia, anormalidades en sistema Nervioso Central y retardo en el crecimiento. Un 95% de los recién nacidos infectados se presentan de forma asintomática, sin embargo llegan a desarrollar secuelas permanentes, especialmente hipoacusia neurosensorial y retraso psicomotor.

La elevada incidencia de hipoacusia en niños infectados asintomáticos obliga a la implementación de una tamizaje en el período neonatal.

La realización de tamizaje en las mujeres embarazada no es recomendado de forma sistemática debido a la imposibilidad de medidas preventivas y terapéuticas, la dificultad para diagnosticar una reactivación vírica y la posibilidad de infecciones congénitas sintomáticas en hijos de mujeres inmunes. Por lo anterior ha sido necesario implementar métodos diagnósticos que permitan la identificación temprana de la infección en recién nacidos con la finalidad de iniciar tratamiento oportuno.

Las opciones de tratamiento en la actualidad se indican ante evidencia de infección sintomática en un intento de disminuir las secuelas. La desaparición del virus se ha relacionado con un mejor pronóstico neurológico, el tratamiento también está indicado en neonatos sin afectación al sistema Nervioso Central, pero con enfermedad organoespecífica, sobre todo si existe un deterioro multisistémico o riesgo vital.

El programa de Tamiz Neonatal implementado en varios países, inicialmente para estudios de desordenes metabólicos ha sido una plataforma a últimos años para realizar tamizaje para infección congénita por Citomegalovirus.

MARCO TEORICO

El CMV humano pertenece a la familia Herpesviridae, como todos los virus de este grupo, tiene la característica de generar infecciones latentes una vez superada la infección primaria. La infección por CMV es muy frecuente y generalmente cursa de modo asintomático y su principal importancia radica en la gravedad de la infección que es capaz de producir en neonatos y en pacientes inmunodeprimidos. Teniendo en cuenta que CMV se ha detectado en varios fluidos corporales incluyendo saliva, orina, leche, lágrimas, heces, secreciones vaginales y cervicales, sangre y semen parece claro que la transmisión puede producirse por distintas vías. Como la excreción del virus una vez adquirida la infección es prolongada, la diseminación de este se produce fácilmente. Adicionalmente la infección puede producirse por transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos. (1,2)

La enfermedad por CMV puede producirse bien después del primer contacto con el virus (primoinfección), como consecuencia de la reactivación del virus latente o por una reinfección por una cepa heterotípica. Según el momento de la vida en que se adquiere, la infección puede ser congénita, perinatal o postnatal. La infección congénita afecta a un 0,3-2,4% de los nacidos vivos y es la causa más frecuente de malformaciones congénitas en el mundo desarrollado. Del total de infectados el 90-95% serán asintomáticos en el nacimiento y de esos alrededor de un 15% desarrollarán secuelas. De los 5- 10% restantes sintomáticos el 90% tendrán secuelas que serán principalmente neurológicas. La tasa de transmisión intraútero está íntimamente relacionada con la inmunidad materna, siendo del 25-75% cuando la madre sufre primoinfección durante el embarazo y del 0,2-2% en las recurrencias o reinfecciones. Por último, el índice de mortalidad para los recién nacidos sintomáticos oscila entre el 11-20%. (3,4)

Epidemiología de la infección congénita

Seroprevalencia

Aunque actualmente se está empezando a dar mayor importancia a la infección congénita en mujeres con inmunidad preconcepcional, en la comprensión de esta enfermedad sigue siendo fundamental el estado inmunitario de la madre, ya que aunque la presencia de anticuerpos preconceptionales solo proporciona una protección parcial, existen diferencias significativas tanto en la tasa de transmisión como en la magnitud de los daños causados al feto. Los datos de seroprevalencia en la población de mujeres tienen interés epidemiológico pues nos permiten conocer a priori la parte de la población susceptible de sufrir una primoinfección. Las seroprevalencias encontradas en países occidentales son mucho más bajas que las de países asiáticos, de la misma manera que las seroprevalencias son mayores en la población de bajo estado socioeconómico un 85% frente a la de alto, un 55%. Así vemos que en Europa se han publicado datos de seroprevalencia que oscilan entre un 42-75% con algunas cifras superiores como en España. Los estudios en población de gestantes oscilan entre el 40 y el 50%, con valores similares en EEUU. Pero a medida que nos alejamos de nuestro

entorno socioeconómico las cifras de seroprevalencia se incrementan significativamente con un rango que va del 65 al 95%, llegando a ser >90% en países como Tailandia y Japón. (3,4)

Factores de riesgo

En los estudios de seroprevalencia se ha observado que estratificando la población según distintos parámetros se obtenían valores significativamente distintos de unas poblaciones a otras, de manera que la seropositividad se asociaba con mayor edad, peores condiciones socioeconómicas, mayor paridad, mayor presencia de niños en la misma casa y grupo étnico, de modo que en los estudios realizados en Europa y EEUU siempre se encuentran prevalencias significativamente superiores en el grupo de mujeres de origen africano o asiático. Estudios epidemiológicos han documentado que los modos más frecuentes de adquirir la infección por CMV en la comunidad son por el contacto con niños infectados y la transmisión sexual. La importancia del estado socioeconómico al que pertenezca la gestante se refleja en la gran diferencia observada en las tasas de transmisión entre dos grupos de diferente extracción social, llegando a ser 10 veces mayor en el grupo socialmente más deprimido que en el de clase media-alta (2% y 0,2% respectivamente) debido a que en aquel se acumulan los factores de riesgo. (1,3,4)

Transmisión y patogénesis

Transmisión

Ya se ha comentado que la tasa de transmisión fetal oscila entre el 25-75% cuando se produce una primoinfección materna durante la gestación mientras que en las recurrencias o reinfecciones la tasa de infección fetal es del 0,2-2%. El hecho de que la inmunidad preconcepcional disminuya enormemente la transmisión intrauterina pero no la prevenga completamente, es algo que diferencia a CMV de otros agentes relacionados con la infección neonatal como Rubéola o Toxoplasma y es una de las características más incomprendidas de esta infección perinatal. Modelos experimentales en cobayas han mostrado que la transmisión, en casos de primoinfección, aumenta a medida que avanza el embarazo. Igualmente en humanos se han publicado porcentajes de entre el 20 y el 50% en el primer trimestre y de entre el 40 y 70% en el tercero. (1, 3, 4)

En cuanto a la severidad de las lesiones encontradas según el momento de la exposición en el útero algunos no han encontrado relación, pero actualmente parece demostrado por estudios epidemiológicos que los fetos expuestos en el primer o principios del segundo trimestre tienen más probabilidades de presentar secuelas que aquellos nacidos de mujeres infectadas en el tercer trimestre. (3) Se ha estudiado también el papel de los anticuerpos neutralizantes maternos en relación con la transmisión intrauterina con resultados divergentes. En un estudio realizado en el año 1995 con madres que sufrían primoinfección por CMV, vieron que las madres que transmitían el virus a sus hijos tenían títulos inferiores tanto de anticuerpos neutralizantes como de anticuerpos de alta avidéz a los de las madres

no transmisoras. Se ha especulado que los títulos altos de anticuerpos en las transmisoras reflejarían una replicación viral mayor o más prolongada debida posiblemente a heterogeneidad en la cepa, es decir, infección por cepas de CMV que no son neutralizadas por la respuesta humoral anti-gB. La caracterización de la cepa viral podría ayudar a comprender este fenómeno. En cuanto al papel de la inmunidad celular en la transmisión intrauterina del virus parece que una respuesta inmune celular específica marcada podría prevenir la transmisión, mientras que si esta es débil aquella se dificultaría.

La recuperación del virus durante la gestación a partir de exudado cervical o de la orina ya sea en infecciones primarias o recurrente es un mal indicador del riesgo de infección intrauterina. Los estudios de infección congénita por CMV se han centrado en la primoinfección y, más recientemente en las reinfecciones o recurrencias. Para ambos casos se conocen cifras de transmisión así como frecuencia y gravedad de la patología producida en el neonato, sin embargo hay muy poco escrito sobre las consecuencias para la gestación que tendría una infección producida preconcepcional o periconcepcional. (3,4)

La conclusión es que la transmisión en infecciones adquiridas antes o inmediatamente después de la concepción es inferior a las que se manejan para infecciones adquiridas durante la gestación. En cuanto al tiempo que debe transcurrir entre la infección primaria y la concepción, los mismos autores recomiendan un periodo mínimo de 6 meses basados en las observaciones existentes sobre presencia de DNA en sangre a los 6 meses de la primoinfección en inmunocompetentes y considerando este parámetro marcador potencial de infectividad. Pero la infección del neonato no solo se realiza intraútero, también puede producirse una infección postnatal a partir de madres infectadas excretoras del virus. Esto por su alta prevalencia podría suponer un importante problema de salud. (1)

Patogénesis

La patogénesis de la infección congénita por CMV es compleja y sus mecanismos no están aún bien definidos. Los modelos experimentales sugieren que las membranas extraembrionicas tienen un papel crítico en la patogénesis. Se conoce que en las infecciones congénitas por CMV existe generalmente asociada una villitis coriónica e infección de la placenta, lo que hace pensar que el virus atravesaría la placenta alcanzando así la circulación fetal y aquella actuaría, a su vez, de reservorio viral.

Un 15% de las mujeres con infección primaria al principio del embarazo abortan espontáneamente. En estos casos la placenta pero no el feto presenta evidencias de infección, lo que indicaría que la infección placentaria precedería a la infección fetal. Cuando la infección se produce en una fase más avanzada del embarazo, es causa de nacimiento prematuro y retraso en el crecimiento en un 25% de los niños, hechos claramente relacionados con patología placentaria.(2)

Se han propuesto algunas hipótesis que aún no se han confirmado in vitro como la que sugiere que el virus infectaría primero los tejidos placentarios y después a las

células amnióticas, las cuales podrían ser ingeridas por el feto después de lo cual el virus se replicaría en la orofaringe e invadiría la circulación fetal para alcanzar los órganos diana. El feto excretaría el virus al líquido amniótico por la vía urinaria, lo que haría a este una muestra de elección para el diagnóstico prenatal de infección fetal por CMV. (3)

En cuanto a los factores patogénicos dependientes del virus se ha sugerido que los distintos genotipos virales (existen 4 genotipos en base a variaciones entre cepas de zonas del gen gB) se asocian con distintas evoluciones clínicas en pacientes receptores de trasplante de médula, en pacientes con SIDA o en las retinitis por CMV, sin embargo esta correlación no se ha encontrado en trasplantados renales y tampoco pudo encontrarse relación en un grupo de niños con infección congénita en Hungría.(2)

El conocimiento de cómo se produce la transmisión es el primer paso crucial hacia el diseño racional de terapias que prevengan la infección prenatal. Estos tratamientos podrían bien aumentar la función de barrera de la placenta o disminuir la capacidad de las células maternas para transmitir el CMV al citotrofoblasto, las células placentarias fetales que son probablemente conductoras de la infección por CMV al embrión o al feto.

Recurrencia y reinfección

Es un hecho bien conocido que la infección congénita por CMV puede producirse tras una infección no primaria o recurrente en la madre y también lo es, que la presencia de anticuerpos maternos preconcepcionales proporciona una protección sustancial frente al daño congénito en el recién nacido, disminuyendo tanto la incidencia de infección congénita como la severidad de secuelas en el neonato. Pero cada vez se les está prestando mayor atención a las infecciones recurrentes ya que pueden tener más consecuencias adversas de lo que inicialmente se creía. La contribución de la infección recurrente a la incidencia global de infección neonatal por CMV dependerá de la seroprevalencia de la población estudiada. Se acepta que la reactivación y la reinfección ocurren con mayor frecuencia en el embarazo (1-14%) que la primoinfección (0,7-4%). Las bases moleculares y celulares de la prevención de la infección fetal por la inmunidad materna no están aún totalmente aclaradas pero si se conocen una serie de hechos. Primero, los anticuerpos neutralizantes del virus y su cantidad se correlacionan con el efecto protector, de modo que las madres que transmiten el virus a sus hijos tienen niveles más bajos de anticuerpos neutralizantes y anticuerpos de alta avidéz que aquellas que no lo transmiten, esto sugiere que los anticuerpos neutralizantes probablemente limiten la infección fetal por su capacidad para atravesar la placenta.

La mayoría de estos anticuerpos son subclase IgG1 para los cuales existe un transporte activo transplacentario que no se desarrolla plenamente hasta el comienzo del tercer trimestre, lo que explicaría la menor gravedad de las lesiones cuando la infección se produce en esa fase del embarazo. Segundo la edad joven (adolescencia) es un factor de riesgo significativo para la infección congénita por

CMV, por lo que podría pensarse que la respuesta inmune en jóvenes fuera marcadamente diferente a la de las mujeres de más edad. Por último la infección fetal en mujeres con inmunidad preconcepcional puede deberse a la adquisición de una nueva cepa de CMV durante la gestación y existen evidencias serológicas indirectas que confirman esta reciente teoría.

Diagnóstico materno

Teniendo en cuenta que en más del 90% de los casos las infecciones son asintomáticas o bien se acompañan de síntomas inespecíficos la aproximación diagnóstica definitiva se basa en las técnicas de laboratorio, las cuales deben encaminarse a diferenciar la infección primaria de la recurrente o persistente. Existen disponibles test serológicos para la detección de anticuerpos o de antígeno, cultivo de virus, histopatología de tejidos y detección de ácidos nucleicos. Los métodos más utilizados son los serológicos mientras que los métodos basados en la biología molecular se utilizan más en el diagnóstico prenatal. (1,3)

Seroconversión

Es la aparición de anticuerpos frente a una primera muestra negativa entre dos muestras separadas 2-3 semanas, habiendo obtenido la primera lo más cerca posible del comienzo de la enfermedad. Esto, generalmente, es complicado ya que la infección puede cursar de modo asintomático, y aunque no fuera así la primera muestra no suele tomarse tan precozmente como para poder demostrar la seroconversión, y si lo que observamos es un incremento en los niveles de IgG, este puede deberse tanto a una infección primaria o secundaria como a una estimulación inespecífica del sistema inmune. (22)

IgM específica

Esta técnica presenta una serie de inconvenientes que hacen que tampoco sea el método de elección en el diagnóstico de infección aguda por CMV. Primero, puede persistir durante meses después de la primoinfección o reaparecer en las recurrencias. Segundo, puede deberse a una respuesta inmune heterotípica causada por una infección intercurrente, como consecuencia de la estimulación policlonal de los linfocitos B de memoria, que es un fenómeno bien conocido en las infecciones agudas por Virus de Epstein Barr (VEB). Tercero, puede ser el resultado de una reactividad cruzada antigénica entre Herpesvirus. Y por último la presencia simultánea de factor reumatoide e IgG específica puede dar lugar a respuestas falsamente positivas. Por todo lo anteriormente expuesto, en muchas ocasiones ninguno de los métodos anteriores aporta resultados diagnósticos definitivos de infección aguda por CMV. Esto ha creado la necesidad de buscar nuevas pruebas que permitan afinar más en el diagnóstico, entre ellos tienen especial interés, los ensayos de avidéz Ig G, la investigación de anticuerpos neutralizantes y la detección del virus o de sus ácidos nucleicos. (3,4)

Ensayos de avidéz IgG

Únicamente está indicado su uso cuando se han realizado previamente las determinaciones de IgG e IgM y se han obtenido resultados positivos en ambas. Este método se basa en la separación de los anticuerpos de baja afinidad (avidéz) producidos en una fase temprana de la infección, de aquellos con alta afinidad que reflejan un contacto anterior con el virus. (14) Para ello se hace una determinación inicial de IgG total anti-CMV y otra después de hacer un tratamiento con un agente capaz de destruir los enlaces de baja afinidad (generalmente Urea 8M) que son los que tienen los anticuerpos recientes (tiempo inferior a 3-4 meses). Se detecta la presencia de IgG de baja avidéz si existe una reducción del título de IgG en la determinación realizada en presencia de Urea en relación con la determinación inicial. Los resultados pueden expresarse como índice de avidéz (IA) en porcentaje, según la fórmula:

$$IA(\%) = (D0 \text{ urea} / D0 \text{ referencia}) \times 100$$

La mayoría de las infecciones primarias recientes tienen un IA inferior al 50% y las pasadas tienen un IA superior al 70% (48), pero es importante hacer notar que dependiendo del paciente, el IA puede madurar de modo diferente, y en casos muy raros la maduración es lenta. En las infecciones secundarias el IA siempre es superior al 70%. Por tanto los métodos de avidéz, aunque presentan resultados prometedores, necesitan de una mayor experiencia y siempre deben realizarse simultáneamente con IgG e IgM específicas y sería el conjunto de todos los resultados obtenidos lo que nos permitiría hacer una aproximación diagnóstica más exacta. (3)

Investigación de anticuerpos neutralizantes

Los anticuerpos neutralizantes son aquellos capaces de bloquear la capacidad infectiva del virus. Estos anticuerpos aparecen después de una media de 13 semanas tras la seroconversión o de 15 semanas tras la primoinfección, por tanto la ausencia de estos anticuerpos en presencia de IgG anti-CMV sería un marcador fiable de infección primaria reciente, mientras que su presencia excluiría la infección en un tiempo inferior a 13-15 semanas. Pero poner de manifiesto estos anticuerpos en el laboratorio requiere de técnicas largas y laboriosas, y es necesario poder mantener cepas vivas del virus en cultivo celular, lo cual no es posible para la mayoría de los laboratorios clínicos. Recientemente se han propuesto dos técnicas de inmunoblot y de enzimoimmunoensayo en las que se utilizan como antígeno las mismas glicoproteínas recombinantes y uno de ellos se encuentra ya comercializado. Estas glicoproteínas se denominan gB (glicoproteína UL55) y gH (glicoproteína UL75) y se ha demostrado que son las principales dianas de los anticuerpos neutralizantes, mientras que las fosfoproteínas de tegumento viral pp150 y pp65 son más inmunogénicas pero no presentan epítomos neutralizantes para la respuesta inmune humoral. Estas técnicas deben considerarse como técnicas confirmatorias, nunca de screening, en el diagnóstico de la infección primaria por CMV. (3,4)

Detección del virus o de ácidos nucleicos virales

Se han usado poco para el diagnóstico de la enfermedad aguda materna, además no se ha encontrado relación entre la carga viral y el curso clínico de la infección y es dudosa su relación con la severidad de la afectación fetal, cuando se usa en el diagnóstico prenatal.(3)

Screening durante el embarazo

Los objetivos que persigue el control serológico de la gestante son dos: primero prevenir infecciones agudas con riesgo de transmisión vertical y segundo diagnosticar infecciones crónicas con el mismo riesgo. En el primer caso la detección de madres susceptibles de sufrir una infección aguda durante la gestación conllevaría la adopción de medidas preventivas de la infección durante el embarazo en curso y, si es posible, se tomarían las medidas necesarias para evitarla en futuros embarazos. En el segundo caso se adoptarían las medidas preventivas o terapéuticas que minimicen el riesgo de transmisión al neonato. En España existen unas recomendaciones, en las que el CMV no se incluye como agente a estudiar en el screening rutinario de la embarazada asintomática ya que no consigue ninguno de los dos objetivos anteriormente citados. (3)

Por otro lado, si llega a detectarse una primoinfección durante la gestación debería de poderse incluir a la paciente en un programa de diagnóstico prenatal que implicaría una serie de exploraciones complementarias (amniocentesis, cordocentesis etc.) que no están disponibles en muchos hospitales. Sin embargo la determinación preconcepcional de anticuerpos tendría mayor interés ya que su presencia excluiría la posibilidad de primoinfección durante la gestación que es la que más se asocia con infección fetal clínicamente significativa. (14) En las mujeres en las que no se hubieran detectado anticuerpos preconceptionales, únicamente podrían dárseles algunas medidas muy generales de prevención de la infección especialmente en aquellas que tienen riesgo ocupacional como es el contacto con niños, que es una de las fuentes de contagio reconocidas. Estas medidas serían tan simples como el lavado de manos frecuente y evitar el contacto estrecho con los niños como el beso o compartir con ellos utensilios de comida o bebida. De cualquier modo nunca podríamos evitar totalmente el contagio por las razones clínicas y epidemiológicas que ya se han expuesto. Por ello hay quienes consideran más práctico proporcionar a todas las gestantes la información referente a las medidas higiénicas que minimicen el contacto con las secreciones de niños en lugar de reservarla solo a aquellas que hayan resultado negativas en el tamizaje, el cual se realizaría solo a un grupo seleccionado de gestantes inmunocomprometidas, como son las infectadas por VIH, ya que una tercera parte de estas podrían llegar a tener enfermedad clínica por CMV en el transcurso del embarazo.

Diagnóstico prenatal

La intención del diagnóstico prenatal es en todos los casos conocer el estado o la posible afectación fetal. Además el proceso a diagnosticar debe tener un tratamiento posible o bien hacerse en un momento de la gestación en el cual

ofrecer a las embarazadas soluciones alternativas. Para multitud de problemas fetales la conducta esta hoy claramente establecida, incluso para algunos procesos infecciosos, pero no así para la infección fetal por citomegalovirus (1,21)

Creemos que la razón fundamental es, que a diferencia de otras enfermedades del grupo TORCH como toxoplasmosis o rubéola, la inmunidad preconcepcional contra el citomegalovirus proporciona solo protección parcial contra la transmisión intrauterina del virus, lo que es causa de que sucedan una proporción sustancial de infecciones congénitas en los productos de mujeres con inmunidad preconcepcional.(3) Pudieran existir otras razones, primero el desconocimiento de las vías de transmisión de la infección al feto, pues aunque se acepta como principal la vía transplacentaria, se desconoce si es posible que también se produzca por vía ascendente directa a través del contagio materno por vía sexual, incluso con membranas íntegras. Segundo las dudas sobre la fiabilidad de las pruebas diagnósticas y por último, y quizás influido por lo anterior, carecemos de estudios amplios que nos permitan conocer datos epidemiológicos fundamentales como las vías de infección, y tasas fiables de prevalencia, pues se refieren cifras muy dispares. (4)

Así actualmente se desaconseja el tamizaje de esta infección durante la gestación porque el estado del tratamiento anteparto y la prevención primaria para disminuir las secuelas de la infección son menos consistentes que para otras enfermedades, pero independientemente de la oportunidad de esta conducta, es un hecho que se diagnostican casos de infección materna por citomegalovirus, bien sea por la realización de estudios serológicos no controlados, por su solicitud ante cuadros infecciosos inespecíficos o por deseo de la paciente informada.

Desconocemos así mismo las cifras reales sobre el riesgo de afectación fetal fundamentalmente por las dificultades aludidas en la interpretación de las pruebas serológicas que impediría saber cuántas pacientes de las incluidas en los estudios son de primoinfección o reactivación o reinfección y también porque el prenatal aportará tasas distintas de transmisión pues se acepta son más altas a medida que avanza el embarazo, a la inversa que el riesgo de afectación fetal severa. Para el diagnóstico de la infección fetal por citomegalovirus se ha usado la sangre fetal y el líquido amniótico para el estudio de la IgM específica, cultivo y amplificación del DNA viral por reacción en cadena e polimerasa (PCR). El recuento hemático, la cifra plaquetaria y el estudio de la función hepática podrían también servir de ayuda para apoyar el diagnóstico y la posibilidad de afectación.

Diagnóstico de la Infección del recién nacido

El diagnóstico en el recién nacido se realiza mediante el aislamiento del virus o la identificación del genoma viral mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en muestras de orina, sangre, saliva o líquido cefalorraquídeo dentro de las 2 primeras semanas de vida. La PCR permite amplificar a gran escala, regiones específicas del ADN (Acido desoxirribunucleico), y facilita la manipulación posterior

de los fragmentos amplificados. El principio de la PCR se basa en la utilización de oligonucleótidos sintéticos que son complementarios a secuencias que flanquean un región específica del ADN molde. (18)

A finales de 1985 fue desarrollada la técnica PCR que permitía hasta 1994 el diagnóstico de CMV en muestras de sangre en recién nacidos, en comparación con el método de aislamiento viral. Este método fue simplificado por Barbi y col. En el año 2000, quienes aplicaron esta técnica en gotas de sangre seca del talón del recién nacido, recolectadas sobre papel de filtro (tarjeta de Guthrie) cuya sensibilidad fue del 100% y especificidad de 99% en comparación con el aislamiento viral. (10, 16,18)

También se diagnostica la detección de antigenemia o de anticuerpos IgM frente a CMV, aunque la sensibilidad es menor (el 30-40% y el 70% respectivamente), y su negatividad no invalida el diagnóstico. Además la IgM puede dar falsos positivos por lo que debe confirmarse el diagnóstico. (4) El cultivo viral es muy poco utilizado porque los resultados pueden demorarse 2 semanas. (20) La detección de del virus en orina mediante el cultivo en *Shell vial* es el método diagnóstico más utilizado por su rapidez y alta especificidad. Sin embargo la sensibilidad es un poco más baja (94%), por lo que, ante sospecha clínica, debe repetirse una segunda muestra o realizar una PCR en orina. El estudio anatomopatológico de la placenta puede contribuir al diagnóstico, los hallazgos van desde la normalidad hasta la inflamación o la necrosis de vellosidades con presencia de cuerpos de inclusión intranucleares de CMV o intracitoplasmáticos.(4)

Evaluación de la gravedad y pronóstico del recién nacido

Los niños con infección congénita por CMV se deben evaluar en el aspecto neurológico, hemograma completo, pruebas de funcionamiento hepático, ecografía cerebral, punción lumbar, fondo de ojo y potenciales evocados auditivos. Se recomienda también la realización de potenciales evocados visuales, incluso en neonatos sin coriorretinitis porque existe riesgo de atrofia óptica y ceguera cortical. (4) La realización de ecografía, es frecuentemente llevada a cabo durante el embarazo en mujeres con sospecha de infección por CMV, porque detecta probables malformaciones en el feto relacionadas con la infección, como retraso en el crecimiento intrauterino, ventriculomegalia, oligohidramnios, polihidramnios, hidrops, calcificaciones cerebrales, efusión pleural. En etapa postnatal el estudio permite también identificar probables lesiones (9). La tomografía axial computada no proporciona información adicional respecto a la ecografía y la Resonancia Magnética tiene mayor sensibilidad para detectar displasias corticales y lesiones de la sustancia blanca. (4)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección congénita por citomegalovirus no siempre es reconocida por los médicos que establecen el primer contacto con estos pacientes, ya que la enfermedad subclínica representa aproximadamente el 90% de los recién nacidos, lo que conlleva a falta de diagnóstico y progresión de la enfermedad con sus potenciales complicaciones y secuelas.

JUSTIFICACIÓN

La infección fetal por citomegalovirus supone la causa más frecuente de malformaciones congénitas en el mundo, afectando al 0,2-2,5% de los recién nacidos vivos. Como consecuencia afecta el neurodesarrollo y es causa de una elevada mortalidad, que llega a ser de 20-30%. Del total de infectados el 90-95% serán asintomáticos en el nacimiento y de esos alrededor de un 15% desarrollarán secuelas. Del 5- 10% restante de los pacientes sintomáticos el 90% tendrán secuelas que serán principalmente neurológicas. Esta forma clínica es diez veces más frecuente que la enfermedad clínica, por lo que es necesario implementar métodos diagnósticos que identifiquen pacientes de riesgo de forma oportuna.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la Prevalencia e infección congénita por Citomegalovirus en Recién nacidos del Instituto Nacional de Perinatología?

OBJETIVO

Estimar la prevalencia de infección congénita por citomegalovirus en recién nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología por medio de la técnica Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en tarjetas de Tamiz (Guthrie) con sangre seca.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio

Tipo de estudio: Observacional

Tipo de diseño: Transversal descriptivo, prospectivo

Lugar y duración.

El estudio se llevara a cabo en instalaciones de los departamentos de Infectología e Inmunología Perinatal y Departamento de Tamiz Neonatal del Instituto Nacional de Perinatología. El estudio se llevara a cabo en un período comprendido de 6 meses a partir del mes de Junio 2011.

Universo

Se realizará un selección representativa y aleatorizada de todos los recién nacidos en el período comprendido de 01 Enero al 31 de Diciembre del 2010, a quienes se les haya realizado toma de muestra de sangre para Tamiz Neonatal. Se llevara a cabo una recolección de muestra de sangre seca de tarjetas de Tamiz neonatal de los pacientes seleccionados y a su vez se realizara una revisión del expediente clínico del recién nacido para identificación de antecedentes perinatales, características clínicas al momento del nacimiento, evolución durante su estancia intrahospitalaria y condiciones de egreso. La recolección de datos se llevara a cabo mediante un formato que contiene características demográficas de la madre y del recién nacido.

Criterios de Inclusión.

Todos los recién nacidos durante el período comprendido de 01 de enero al 31 de Diciembre del 2010, en el Instituto Nacional de Perinatología a quienes se les haya realizado toma de muestra se sangre para Tamiz Neonatal durante las dos primeras semanas de vida extrauterina.

Criterios de Exclusión.

Pacientes recién nacidos a quienes no se les haya realizado toma de muestra de sangre para Tamiz Neonatal dentro de las primeras 2 semanas de vida.

Muestras inadecuadas

Métodos

➤ Extracción de DNA a partir de sangre absorbida en papel por técnica de Fenol-Cloroformo

Las muestras de sangre absorbida en papel filtro se cortarán (aproximadamente 0.5 cm) y se colocarán en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL libres de DNAsas y RNAsas, enseguida se adicionará 100 µL de proteinasa *K* a una concentración de 2000 µg/mL y 300 µL de buffer de lisis. Los tubos se incubarán a 56 C⁰ toda la noche en agitación constante o durante 2 horas en agitación intensa. Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se le agregará 1 mL de la mezcla fenol-cloroformo (1:1) y se agitarán en vortex durante 1 minuto, enseguida se centrifugarán a 17,000 X *g* por 10 minutos. El sobrenadante se colocará en tubos tipo Eppendorf nuevos y se adicionarán 1 mL de mezcla cloroformo-álcool isoamílico (24:1), los tubos se agitarán durante 2 minutos y se centrifugarán nuevamente 17,000 X *g* por 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se coloca en tubos nuevos y se agregarán 700 µL de etanol absoluto a -20 C⁰ y 70 µL de acetato de sodio 3M, se mezclarán por inversión y se centrifugarán a 17,000 X *g* durante 30 min, después se desechará el sobrenadante y el precipitado (en el fondo del tubo) se lavará con 1 mL de etanol al 70%, se mezclará suavemente y se centrifugará a 17,000 X *g* por 10 minutos. Finalmente, se eliminará el sobrenadante y se resuspenderá el DNA con 50 µL de solución Tris-EDTA. La integridad de DNA se verificará en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en un analizador de geles.

➤ **Amplificación del DNA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.**

Cuatro microlitros de DNA se someterán a amplificación en reacción de cadena de la polimerasa anidada (PCR) en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción contendrá: 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl, 0.2 μ M de cada DNTP, 2.0 mM de $MgCl_2$, 20 pMol/ μ L de cada iniciador (Tabla 1) y 1.5 U de *Taq* polimerasa.

Tabla 1.

Gen blanco	Secuencia
IEP4A	AGCTGCATGATGTGAGCAAG
IEP4B	GAAGGCTGAGTTCTTGGTAA
IEP4C	TGAGGATAAGCGGGAGATGT
IEP4D	ACTGAGGCAAGTTCTGCAGT

Oligonucleotidos empleados en la PCR.

La amplificación se llevará a cabo bajo las siguientes condiciones:

1ª. PCR;

94 °C 5 min 1 ciclo

91 °C 30 seg 35 ciclos

57 °C 30 seg 35 ciclos

72 °C 30 seg 35 ciclos

72 °C 10 min

2a. PCR

94 °C 5 min 1 ciclo

94 °C 30 seg 35 ciclos

57 °C 30 seg 35 ciclos

72 °C 30 seg 35 ciclos

72 °C 10 min

En cada corrida se incluirán controles positivos y negativos. Los productos de PCR serán resueltos en geles de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizados en un analizador de geles.

RESULTADOS

Se realizó una selección aleatorizada de pacientes recién nacidos en el período comprendido de Enero 01 a Diciembre 31 del 2010, se reporto un total de 4125 nacimientos en el Instituto Nacional de Perinatología. Por medio del Programa epistat se obtuvo una muestra representativa de 750 tarjetas. Se realizó la búsqueda de los pacientes seleccionados, en la base de datos del departamento del programa de tamiz neonatal para recolección de datos y búsqueda de sus tarjetas de tamiz. Se realizó la perforación de la muestra de sangre seca de las tarjetas seleccionadas, se almacenaron y se congelaron hasta el momento en que se realice la extracción de DNA y el resto del procedimiento.

Se ha realizado al momento la revisión de 116 expedientes de los recién nacidos seleccionados, con la recolección de los antecedentes prenatales, características clínicas al momento de nacimiento, evolución intrahospitalaria y condiciones de egreso. Del total de pacientes 56(48.2%) corresponden a sexo femenino y 60 (51.7%) a sexo masculino, 104 (89.6%) pacientes son de término y 12 (10.4%)son pretérmino. En ningún paciente se ha identificado algún dato clínico sugestivo de infección congénita por CMV (microcefalia, hepatoesplenomegalia, neumonitis, etc.). Un paciente pretérmino (36.1 SDG) permaneció hospitalizado 17 días con el diagnóstico de Enfermedad Hemolítica secundaria a incompatibilidad al Antígeno D, el resto de los pacientes no presentaron complicaciones y la estancia intrahospitalaria no se prolongo más de 3 días. No se ha identificado en ninguno de los pacientes antecedente materno de haber cursado con Síndrome mononucleósico durante el embarazo, todas las madres cuentan con reportes de Ultrasonidos Obstétricos, y sin reporte de alteraciones estructurales sugestivas de infección. No se reportó ninguna serología materna para CMV. Hasta el momento, el proyecto se encuentra en la fase de Extracción de DNA de las muestras recolectadas con la técnica ya descrita.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Malm G., Engman M.: Congenital cytomegalovirus infection. *Seminars in fetal and Neonatal Medicine*. 2007; 12, 154-159.
- 2.- White D., Fenner F.: Medical Virology. Fourth edition, Cytomegalovirus Chapter 20, 334-341
- 3.- Baquero F: Citomegalovirus congénito: ¿es necesario un cribado serológico durante el embarazo? *Enferm infecc Microbiol clín*: 2009; 10:1016.
- 4.- Baquero F. et al; Documento de Consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por Citomegalovirus: *An Pediatr* 2009; 71 (6): 535-547
- 5.- Blinda S., Mammoliti A., Primache V., Dido P., Corbetta C., Mosca F., et al: Pp65 antigenemia, plasma real-time PCR and DBS test in symptomatic and asymptomatic cytomegalovirus congenitally infected newborns: *BMC infectious Diseases*: 2010, 10-24.
- 6.- Boppana S., Ross S., Novak Z., Shimamura M., Tolan R., et al: Dried Blood Spot Real –time Polymerase Chain Reaction assays to screen Newborns for Congenital Cytomegalovirus Infection: *JAMA*, April 14, 2010: 303(44) 1375-82.
- 7.- 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. *The journal of Pediatrics*, July 2008: 12: 84-88.
- 8.- Grazia M., Lanari M., Lazzarotto T., Gabrelli L., Pignatelli S., et al: Very low Birth Weight infants Born to Cytomegalovirus- Seropositive mothers Fed with their mother's milk: A prespective study. *The journal of Pediatrics*, June 2009: 154: 842-848.
- 9.- Guerra B., Simonazzi G., Puccetti ch., Lanari M., Farina A., Lazzarotto T.: Ultrasound predicción of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *American Journal of Obstetrics*, April 2008; 198: 380-7.
- 10.- Distefano A., González C., Pardón F., Sarubi A., Canero C.: Diagnóstico de la infección congénita por citomegalovirus en muestras de sangre seca en recién nacido en la tarjeta de Guthrie. Una técnica promisoría. *Archivos argentinos pediátricos*, 106 (2) 132-137.
- 11.- Yeon K., Schimmenti L., Jurek A., SharonB., Daly K., et al: Detection of cytomegalovirus DNA in dried Blood Spots of Minnesota infants who do not pass

Newborn hearing screening. *The Pediatric Infectious diseases Journal*, December 2009; 28 (12) 1095-1098.

12.- Ducroux A., Cherid S., Benachi A., Ville Y., Leruez-Ville M.: Evaluation of new commercial Real-Time PCR quantification assay for prenatal Diagnosis of Cytomegalovirus congenital Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2008: 46 (6) 2078-2090.

13.- Soetens O., Vauloup-Fellous C., Dubreuil P., Saeger B., Grangeot-Keros L., Naessensi A.: Evaluation of different cytomegalovirus DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutives cases of neonates with congenital CMV infections. *Journal of Clinical Microbiology*, March 2008 46 (3)943-946.

14.- Kouri V., Correa C., Verdasquer D., Martínez P., Alvarez a., et al: Diagnosis and screening for citomegalovirus infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital infection in newborns. *The Pediatric Infectious Disease Journal* December 2010: 29 (12) 1005-1010.

15.- Karsson H., Guthenberg C., Von DobeIn U., Kristenssson K.: Extraction DNA from dried Blood on filter papers after Long- termn storage. *Clinical Chemistry* 2003: 49 (6) 979-981.

16.- Leurez-Ville M., Vauloup Fellous C., Couderc S., Parat S., Oucherif S., et al: New approach for congenital CMV infection diagnosis in neonates: sensibility and specificity of CMV detection in dried blood spots. *Retrovirology* 2009 6 (suppl 1) 1186-1187.

17.- Kramer F. M., Coen D., The Polymerase Chain Reaction: Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Current protocols in Immunology*. 1997: 10 (20) 1-10.

18.- Bereczky S., Martensson A., Gil P., Fárnert A.: Short report: DNA extraction from archive blood spots on filter paper for Genotyping of Plasmodium falciparum. *American Journal Tropical Medicine*. 2005: 72(03) 249-251.

19.- Aygan A. Nucleic acid extraction from clinical specimens for PCR applications. *Turkey Journal Biology* 2006 (30) 107-120.

20.- Szczepura A., Westmoreland D., Vinogradova Y., Fox and M Clark J. Evaluati3n of molecular techniques in prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in immunocompromised patients. *Health Technology Assessment* 2006; Vol. 10: No. 10

21.- Hassan J., Connell J. translational Mini-review series on Infectious disease: congenital cytomegalovirus infection: 50 years on. *Clinical and experimental immunology*. 2007; 149: 205-210.

22.- Kharrazi M., Hyde T., Young S., Amin M., Michael J., Cannon J. Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *The Journal Pediatrics* 2010;157 (2) 191-197.

23.- Mandell G., Bennett J., Dolin R. *Principles and Practice of infectious Diseases*, 6ta edición, Capítulo 131; pag 1786-1792.