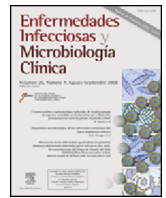




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

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



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

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

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

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

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de junio de 2013

Aceptado el 27 de septiembre de 2013

On-line el 21 de noviembre de 2013

Palabras clave:

Enfermedades y anomalías congénitas, hereditarias y neonatales

Infección por citomegalovirus

Reacción en cadena de la polimerasa

a tiempo real

ADN viral

Gota de sangre seca

Cribado neonatal

R E S U M E N

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

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

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

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

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

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

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

A B S T R A C T

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

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

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

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

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

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

Keywords:

Congenital, hereditary, and neonatal diseases and abnormalities

Cytomegalovirus infection

Real-time polymerase chain reaction

Viral DNA

Dried blood spot testing

Neonatal screening

* Autora para correspondencia.

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

Introducción

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

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

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

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

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

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

Métodos

Pacientes

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

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

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

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

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

Muestras y procedimientos

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

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

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

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

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

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

Estudio estadístico

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

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3401216>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3401216>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)