

Artículo original

Diagnóstico de la infección congénita por citomegalovirus en muestras de sangre seca de recién nacidos en la tarjeta de Guthrie. Una técnica promisoría

Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in newborn dried blood spots on Guthrie cards. A promissory technique.

Dres. Angélica L. Distéfano*, Cecilia A. González*, Fabián Pardón*, María A. Sarubi** y Cristina Canero Velazco***

RESUMEN

En la infección congénita y perinatal por citomegalovirus el laboratorio cumple un rol decisivo, si se considera que el cuadro clínico en el recién nacido es semejante al que presentan otras infecciones.

Los objetivos del trabajo son comparar los resultados de la reacción de la polimerasa en sangre seca y en orina y señalar la importancia del resultado en la tarjeta de Guthrie, para diferenciar la infección congénita de la perinatal.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán", Servicio Virosis Congénitas Perinatales y Transmisión Sexual, se estudiaron 148 pacientes derivados por sospecha de infección por CMVH. Se analizaron las muestras de sangre seca (tarjeta de Guthrie) y de orina de todos los pacientes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. De 148 pacientes, 3 presentaron otras infecciones, 95 fueron negativos y 50 positivos para citomegalovirus: 35 fueron infecciones congénitas y 15 perinatales. En los casos congénitos, la reacción de la polimerasa en la sangre seca fue positiva (sensibilidad 100%, especificidad 98,9%, VPP 98% y VPN 100%). Cuatro de ellos, con síntomas tardíos, fueron estudiados retrospectivamente. En 15 pacientes con muestras de orina tomadas después de los 15 días y polimerasa positiva (S 100%), el análisis retrospectivo de la sangre seca fue negativo, por lo que se consideró que la infección fue perinatal.

La reacción de la polimerasa en sangre seca puede utilizarse alternativamente a la reacción de la polimerasa en orina de recién nacido y permite diferenciar la infección congénita de la perinatal en los casos de infecciones congénitas con aparición tardía de los síntomas u otros casos de origen controvertido.

Palabras clave: citomegalovirus, diagnóstico, congénito, perinatal.

SUMMARY

Laboratories play a crucial role in the diagnosis of congenital and perinatal cytomegalovirus infection, considering that other viral infections in newborn infants have similar clinical characteristics.

The objectives of this work are to compare the results of the polymerase reaction in blood spots and urine as well as point out the relevance of the result in the Guthrie cards to differentiate congeni-

tal from perinatal infection.

A total of 148 patients suspicious of CMVH infections were studied in the Congenital Perinatal Infections and Sexual Transmission Laboratory, at the National Institute "Carlos G. Malbrán". The dry blood samples (Guthrie cards) and urine of all patients were studied through the polymerase chain reaction. From the 148 patients, 3 presented other infections, 95 tested negative and 50 positive for cytomegalovirus: 35 had congenital infection and 15 perinatal. In the congenital cases, the polymerase reaction in dry blood was positive (sensitivity 100%, specificity 98.9%, VPP 98% and VPN 100%). Four of them with tardive symptoms were studied retrospectively. The urine specimens from the remaining 15 patients that were taken 15 days after birth were analyzed through the same methods, showing a sensitivity of 100%, the retrospective analysis of this dry blood group yielded negative results, so the infection was considered perinatal.

Thus, the dry blood polymerase reaction of the newborn infants makes it a reliable assay for diagnosing congenital cytomegalovirus infection and could be used as an alternative method to urine polymerase reaction. In addition, this test is able to reveal whether the infection is congenital or perinatal in those cases of late symptom or other cases of controversial origin.

Key words: cytomegalovirus, diagnostic, congenital, perinatal.

* Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) Dr. "Carlos G. Malbrán".

** Hospital Materno Infantil Ramón Sardá.

*** Servicio de Gastroenterología y Hepatología. Hospital del Niño de San Justo.

Correspondencia:

Dra. Angélica L. Distéfano
adistefano@ANLIS.gov.ar

Recibido: 23-12-06

Aceptado: 4-1-08

INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano (CMVH) es un miembro de la familia *Herpesviridae*. Según los países y en relación con el nivel social, se estima que un 60-80% de los individuos han adquirido la infección al llegar a la edad adulta. En nuestro país hemos encontrado, en un estudio preliminar, una prevalencia variable de 70-98% según el nivel socioeconómico de la población y el área geográfica.¹

Durante el embarazo, la infección primaria,² la reactivación³ o la reinfección con diferentes tipos virales circulantes pueden causar una infección en el embrión o el feto de gravedad variable. La infección primaria durante el embarazo es la principal causa de la transmisión prenatal, pero la reactivación materna del virus durante este período, así como la transmisión durante la lactancia en recién nacidos prematuros,⁴ son también considerados importantes y todos ellos representan factores de riesgo para el desarrollo postnatal.

La prevalencia mundial de la infección en el recién nacido (RN) es de 0,2-2,4%.^{5,6} En Argentina no hay datos estadísticos recientes; en EE.UU. y en los países de la Comunidad Económica Europea la infección por CMVH es la más frecuente de las infecciones virales congénitas: constituye la segunda causa de retardo mental y sordera.⁷

El laboratorio cumple una función esencial en la confirmación de la infección congénita por CMVH en el RN. El método diagnóstico de referencia es el aislamiento viral en cultivo de tejidos realizado a partir de muestras de orina o saliva, tomadas durante los primeros 15 días de vida; la serología demostró ser poco sensible.⁸ En 1980 se desarrolló un método de aislamiento rápido llamado "*shell vial*", que permitió el diagnóstico viral en 24-48 h con una sensibilidad del 94,5% y una especificidad del 100%.⁹ A pesar de su ventaja, por la rápida obtención de los resultados en relación al método de referencia, en ambos métodos se utilizan cultivos celulares cuyo principal inconveniente es su costosa y laboriosa implementación en los laboratorios.

A fines de 1985 fue desarrollada la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés),¹⁰ que permitió en 1994 el diagnóstico de CMVH en muestras de sangre de RN,¹¹ en comparación con el método de aislamiento viral. Este método fue simplificado por Barbi y col.¹² en el año 2000, quienes aplicaron esta técnica en gotas de sangre seca (GSS) del talón de RN, recolectadas sobre papel de filtro (tarjeta de Guthrie), cuya sensibilidad fue del 100% y su especificidad de un 99%, en comparación con el aislamiento viral. En el siguiente trabajo se analizaron los resultados obtenidos sobre análisis GSS en las muestras de RN sospechosos de infección congénita. Las muestras fueron analizadas en los primeros 15 días del nacimiento o retrospectivamente, en el momento de aparición de los síntomas clínicos. El objetivo de nuestro estudio fue demostrar la presencia de CMVH por el método de estudio sobre GSS y comparar estos resultados con los obtenidos por

PCR realizadas en las muestras de orina de los mismos pacientes. El método de estudio sobre GSS será luego utilizado en muestras de pacientes estudiadas retrospectivamente con la finalidad de diferenciar la infección congénita de la perinatal.

POBLACIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron estudiadas, muestras de orina y sangre seca de 148 pacientes (129 con edades de hasta 15 días, y 19 de 17 días a 8 meses), que fueron derivadas al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán" por la sospecha de infección con CMVH. Todas las muestras menos una, cuyo aislamiento no pudo realizarse (cantidad de orina insuficiente), fueron procesadas con los métodos de: PCR en orina, PCR en sangre seca y aislamiento viral. El método de referencia¹³ utilizado en nuestro laboratorio es la PCR en orina, aunque también realizamos el aislamiento viral por el método convencional.

La recolección de las muestras fue realizada entre los años 1999-2004. El 38% de las muestras provenían de hospitales de Capital Federal, 39% de hospitales de la provincia de Buenos Aires, 15% de la provincia de Santa Fe, y el 8% restante de otras provincias. Todas fueron procesadas para la búsqueda de CMVH por indicación médica. En todos los casos, la serología de la madre al inicio del embarazo no fue conocida, por lo que, por definición, no podemos considerarlos como caso "probable".¹³

Los pacientes presentaban algunos de los siguientes signos clínicos y resultados de laboratorio: microcefalia, microcalcificaciones cerebrales, hepatoesplenomegalia, ictericia, púrpura, plaquetopenia, anemia, enzimas hepáticas aumentadas, trombocitopenia o bajo peso. Todos ellos fueron negativos para hepatitis A, B y C.

Las 38 muestras de los 19 pacientes que concurren al laboratorio entre los 17 días y 8 meses posteriores al nacimiento fueron: orina recogida en el momento de la presentación de los síntomas y tarjetas de papel de filtro con sangre seca que fueron tomadas al nacer. Estas tarjetas fueron solicitadas al Laboratorio de la Fundación Bioquímica Argentina, que las almacena luego de realizar los estudios genéticos y moleculares (tarjeta de pesquisa neonatal). Los pacientes de este último grupo no presentaron al nacer síntomas específicos de infección congénita por CMVH, dos tenían atresia de vías biliares, uno fue VIH-positivo, otros dos presentaron retraso madurativo y en los restantes se observó, posteriormente al nacimiento, aumento de enzimas hepáticas, anemia o sepsis.

Se excluyeron de esta serie de casos todas las muestras de 515 pacientes recién nacidos, recolectadas entre 1999 y 2004, a los cuales no se les tomó la muestra de sangre en la tarjeta o cuya toma fue realizada de forma incorrecta. Todos los pacientes estudiados pertenecían a bajos niveles socioeconómicos.

Los métodos utilizados fueron los siguientes:

Preparación de las muestras

a) Estudio sobre GSS

La sangre fue eluída y procesada por el método del *shock* térmico, que consiste en un primer calentamiento a 55° C durante 60 min, un calentamiento posterior a 100° C, 7-10 min y una centrifugación a 10.000 rpm durante 3 min; el sobrenadante es luego transferido a un tubo Eppendorff y guardado a -80° C durante 1 h, como mínimo, antes de ser usado para la n-PCR (PCR anidada).

b) Orina

Las muestras de orina se recogieron en un recipiente estéril (2-10 ml de orina) se filtraron a través de membranas de 0,2 µm y una parte se empleó para la inoculación en cultivo celular y la restante se almacenó a -20° C para PCR directa (sin extracción previa del ADN).

Reacción de PCR y n-PCR

Las muestras de sangre eluída de la tarjeta de papel de filtro y de orina fueron amplificadas por PCR y n-PCR con los cebadores (*primers*) correspondientes a la región gB (glicoproteína B), zona conservada de la región UL55 del gen viral. Para cada reacción se usaron 5µl de tampón de PCR 10X que contenía: 10mM Tris-ClH (pH 8,3), 50mM ClK, 1,5mM Cl₂Mg, 200 µM de dATP, dCTP, dTTP y dGT, 10 pmoles de cada *primer* y Taq polimerasa (5U/µl), en un volumen final de 50µl.

En cada reacción de PCR se incluyó un control positivo de amplificación mediante la cepa patrón Towne, cedida gentilmente por la Dra. María Barbi del Instituto de Virología de la Universidad de Milán y un control negativo (*spot* de tarjetas de papel de filtro embebidas en parafina).

Análisis de los productos de PCR

Alícuotas de 18 µl de cada producto amplificado fueron corridas en geles de agarosa al 2%, con bromuro de etidio (0,5µg/ml), durante 40 min a 130 voltios, y observadas con luz ultravioleta en el transiluminador.

c) Ensayo en cultivo de tejido

Las muestras de orina filtradas fueron inoculadas (200 µl) en monocapas confluentes de fibroblastos humanos de prepucio (PTP: línea celular establecida por el servicio de cultivo de tejidos, INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"), y el cultivo

fue examinado hasta la aparición del efecto citopático viral característico. Los cultivos positivos fueron confirmados por la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos.

RESULTADOS

De los 148 pacientes estudiados, dos RN fueron positivos por serología para rubéola IgM (enzimoinmunoanálisis) y otro para HSV1 por aislamiento viral con confirmación con anticuerpos monoclonales específicos y PCR realizada a partir de la sangre eluída de la tarjeta. De los 145 restantes, 50 casos fueron positivos para CMV por dos o más métodos de laboratorio (PCR en orina, PCR en sangre seca y aislamiento viral), los restantes 95 fueron negativos, excepto un paciente que se consideró falso positivo (CMV positivo por el estudio sobre GSS y orina negativo por aislamiento en cultivo de tejido y PCR). Para su confirmación esta reacción fue repetida mediante diluciones de la orina y una purificación del ADN por columnas, para eliminar posibles inhibidores.¹⁴ (Figura 1).

De los 50 casos positivos, 31 enviaron las 62 muestras de orina y sangre seca en los primeros 15 días de vida; estas muestras fueron procesadas por los tres métodos (PCR en orina, PCR en sangre seca y aislamiento viral) inmediatamente arribadas al Laboratorio de Virosis Congénitas Perinatales y Transmisión Sexual del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", mientras que en las restantes 8 muestras de 4 pacientes, las orinas fueron procesadas a su llegada al laboratorio por los métodos de PCR y aislamiento viral; posteriormente, fueron analizadas retrospectivamente por el estudio sobre GSS las tarjetas enviadas por el banco de datos de la "Fundación Bioquímica Argentina". En estos 35 pacientes, los resultados de la utilización de los

FIGURA 1. Población en estudio y resultados finales

Número de pacientes sospechosos			
148 (100%)			
Negativos	Positivos p/ rubéola y HSV1		Positivos p/ citomegalovirus
95 (64,2%)	2 (2%)	1	50 (33,8%)
			IC 35 (70%)
			IP 15 (30%)

métodos de PCR en orina y del estudio sobre GSS coincidieron, mientras que los aislamientos virales sólo se lograron en 24 muestras de orina (Tabla 1).

En los quince pacientes restantes, que al concurrir al laboratorio tenían entre 17 días y 8 meses (Tabla 2), se confirmó la presencia de CMVH en las muestras de orina por los métodos de aislamiento viral y PCR. El estudio sobre GSS fue también realizado retrospectivamente.

Los 50 casos positivos para CMVH fueron agrupados de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio sobre GSS, como se muestra en la Tabla 1; 35 pacientes: infección congénita, estudio sobre GSS positivo; y en la Tabla 2; 15 pacientes: infección perinatal, estudio sobre GSS negativo.

DISCUSIÓN

La recolección de muestras del talón del RN sobre una tarjeta (método de Guthrie) es actualmente un procedimiento habitual para el diagnóstico de las enfermedades metabólicas y endocrinológicas. A comienzos de 1999, nuestro laboratorio incorporó la recolección de sangre en la tarjeta de Guthrie al diagnóstico de la infección congénita por CMVH, que se realizaba en la muestra de orina de recién nacido por el método clásico de aislamiento viral y la n-PCR, con el objetivo de comparar los resultados de las PCR de dos materiales diferentes: orina y sangre seca, tomados del mismo paciente y realizar la puesta a punto de esta técnica. Posteriormente, la PCR en sangre seca fue utilizada en el diagnóstico tardío de la infección congénita por citomegalovirus.

Las muestras de los 148 pacientes fueron enviadas al laboratorio con la finalidad de descartar la infección congénita por CMVH. Todas ellas menos una, cuya cantidad fue insuficiente, fueron inoculadas en cultivos celulares de fibroblastos de pre-

pucio humano. La técnica de PCR se empleó para determinar la presencia de CMV en la muestra de sangre seca y en la orina de cada paciente, con la doble finalidad de confirmar el resultado obtenido por una misma técnica en dos materiales diferentes y validar la eficiencia de la prueba realizada en sangre seca a partir de la tarjeta de Guthrie. Esta última técnica ha sido utilizada en algunos laboratorios europeos para confirmar la infección congénita, la etiología de la sordera neurosensorial, la prevalencia de la infección congénita en determinadas poblaciones^{12,15,16} y para relacionar las imágenes anormales por resonancia magnética en pacientes con infección congénita.¹⁷

En nuestro laboratorio, la técnica de PCR en orina es considerada la técnica de referencia, por los problemas relacionados con el aislamiento viral; otros laboratorios, pertenecientes a países en que la enfermedad es notificable¹³ también la consideran como una técnica de referencia.

Las muestras de sangre seca utilizadas para el análisis sobre GSS y las orinas de pacientes, infectados congénitamente por CMVH, tomadas simultáneamente al momento del nacimiento, resultaron todas positivas por PCR, excepto en uno de los pacientes, que presentó el aislamiento y la PCR en orina negativas mientras que el análisis de la sangre seca en el la tarjeta de Guthrie fue positivo, por lo que fue considerado un falso positivo. No está claro si este hallazgo es un falso positivo realmente o si tiene algún significado clínico.¹⁸ La sensibilidad de la PCR en sangre seca respecto de la PCR en orina fue del 100%, la especificidad 98,9%, el VPP del 98% y el VPN del 100%. La sensibilidad del aislamiento viral fue de 68,57%, esta baja sensibilidad puede estar relacionada con la inactivación viral causada por la inadecuada conservación de las muestras o con alguna característica de la línea celular utilizada en relación a la cepa viral que no permite su recuperación.

Tabla 1. Sensibilidad-especificidad-valor predictivo positivo y negativo de las PCR en orina y tarjeta en presencia y ausencia de CMVH en el recién nacido

		Infección por CMVH					
		Sí	No	S	E	VPP	VPN
n-PCR	positivo	31	0	100	100	100	100
en orina	negativo	0	95				
n-PCR	positivo	31	1	100	98,9	98	100
en tarjeta	negativo	0	94				

Cuatro muestras de sangre seca estudiadas retrospectivamente por n-PCR fueron positivas.

Veinticuatro muestras de orina fueron positivas por aislamiento viral.

Tabla 2. Infección perinatal (15 pacientes)

N	aislamiento orina	n-PCR orina	estudio sobre GSS
	+/-	+/-	+/-
10	9*/0	10/0	0/10 [#]
5	0/5	5/0	0/5 [#]
T	15	15/0	0/15[#]
%	100	100	100

N: Número de pacientes, T: total de las muestras, #: muestras estudiadas retrospectivamente, *: una muestra no se realizó.

Los valores obtenidos demuestran que la PCR en sangre seca puede ser utilizada en lugar de la PCR en orina para el diagnóstico de la infección congénita, lo que resulta de suma utilidad para estudios retrospectivos. La puesta a punto de este método en nuestro laboratorio nos permitió estudiar a 19 pacientes cuyas muestras de orina se enviaron entre los 2 meses a 20 meses de edad y cuyas PCR fueron positivas para CMVH. En este grupo, el análisis por PCR de la sangre seca tomada en los primeros 15 días de vida (tarjeta de pesquisa neonatal) nos permitió identificar a 4 pacientes con infección congénita por CMVH (tarjeta positiva), los 15 restantes fueron infecciones perinatales (tarjeta negativa). En este último grupo de pacientes, los resultados positivos en las muestras de orinas fueron consecuencia de una exposición a las secreciones vaginales al momento del nacimiento, a través de la leche materna o por contacto cercano con alguna persona que haya estado eliminando el virus ya que ninguno de ellos fue transfundido. En estas muestras, la sensibilidad del aislamiento viral fue de 60%, mientras que la PCR de las muestras de orina presentó una sensibilidad del 100%. Esta baja recuperación viral ya ha sido descrita en las infecciones perinatales que se caracterizan por una eliminación intermitente del virus y en menor cantidad.

La PCR en orina se considera actualmente como un método con una sensibilidad y especificidad semejantes a las del aislamiento viral en cultivo de tejido;¹⁹ la coincidencia en los resultados obtenidos a partir del estudio sobre GSS en relación con la PCR en orina nos permiten considerarla como una técnica alternativa. El estudio sobre GSS permite estudiar las muestras retrospectivamente en los casos en que, como es frecuente en esta infección viral, el recién nacido es asintomático con posterior aparición de síntomas.¹⁶ Esto es particularmente importante en los casos de sordera y sería necesario sumar esta prueba a los estudios de audiometría,¹⁷ ya que es una técnica rápida y no costosa. Otras ventajas son que la conservación y el envío de la muestra no implica mayores inconvenientes y puede realizarse sencillamente a través del correo, lo que es importante en países extensos, como el nuestro. Proporciona un método práctico para realizar estudios epidemiológicos así como el seguimiento y la identificación retrospectiva de los casos de retardo en el desarrollo psicomotor u otros casos, como en la colestasis neonatal, cuya etiología por CMVH está en discusión. Asimismo, la posibilidad de obtener un diagnóstico de certeza rápido le permite al médico evitar tratamientos innecesarios, realizar un seguimiento para detectar la apa-

rición de síntomas tempranamente y el apoyo familiar adecuado, así como la evaluación de un implante, en los casos de sordera.²⁰ Estos resultados permitieron demostrar que un tercio de las infecciones de pacientes considerados sospechosos por los neonatólogos, fueron causadas por citomegalovirus y que, de ellas, la mayor parte fueron congénitas; entre las perinatales, hubo algunos casos con grave compromiso clínico del paciente.

Actualmente, la tarjeta de Guthrie tiene un campo cada vez más amplio de utilidad en la pesquisa de enfermedades infecciosas virales,²¹ metabólicas y genéticas. 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.

Agradecimientos

A la Dra. María Barbi por su generosidad y apoyo continuo, al Dr. G. Borrajo por el suministro de una parte de las tarjetas del banco de datos de la Fundación Bioquímica Argentina, a la Dra. Angélica Teyssié por la revisión y discusión del texto y al Servicio de cultivo de tejidos del Departamento de Virus por la provisión de la línea celular de fibroblastos humanos desarrollada por ellos. ■

BIBLIOGRAFÍA

- González CA, Martín F, Mallimaci MC (Ushuaia), Legina M (Tucumán), Rodríguez CE (Formosa), Fousal MD (Chaco), Mattoni S (Prov. de Bs. As.), Distéfano A. INEI Carlos G. Malbrán. Red de infecciones virales en la embarazada y el recién nacido. Prevalencia de anticuerpos para citomegalovirus en embarazadas y población indígena. XXIV Jornadas Científicas anuales de la Sociedad Argentina de Virología. 14 al 17 de noviembre, Córdoba 2004. Sec. N°6, com. N° 46.
- Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(4):680-715.
- Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, et al. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001;344(18):1366-71.
- Meier J, Lienicke U, Tschirch E, et al. Human Cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *J Clin Microbiol* 2005; 43(3):1318-24.
- Plotkin SA. Vaccination against cytomegalovirus. The Changeling Demon. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:313-326.
- Primache V, Clerici D for the NEOCMV Group. Congenital cytomegalovirus infection in a Northern Italian region. *Eu J Epidemiol* 1998; 14(8):791-6.
- Rivera L, Boppana S, Fowler K, et al. Predictors of hearing loss in children with symptomatic Congenital Cytomegalovirus infection. *Pediatric* 2002; 110(4): 762-767.
- Distéfano AL, Alonso A, Martín F, Pardón F. Human Cytomegalovirus detection of congenital and perinatal infection in Argentina. *BMC Pediatr* 2004, 4(1):1-8.

9. Stirk PR, Griffiths PD. Use of monoclonal antibodies for the diagnosis of cytomegalovirus infection of the detection of early antigen fluorescent foci (DEAFP) in cell culture *J.M. Virol* 1987; 21:329-337.
10. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al.. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-1354.
11. Shibata M, Takano H, Hironaka T, Hirai K. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper. *J Virol Methods* 1994; 46:279-285.
12. Barbi M, Binda S, Primache V, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol* 2000; 17:159-165.
13. Public Health Agency of Canada. Notifiable diseases management guidelines. Congenital cytomegalovirus. Alberta, Canada. June 2005.
14. Wilson I. Inhibition and facilitation of nucleic acid, amplification. *Appl Environ Microbiol Minireview* 1997; 63:3741-3751.
15. Fischler B, Rodensjo P, Nemeth A, et al. Cytomegalovirus DNA detection on Guthrie cards in patients with neonatal cholestasis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 80(2):130-134.
16. Barbi M, Binda S, Caroppo S, et al. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:39-42.
17. van der Knaap Ms, Vermeulen G, B Barkhof F, et al. Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use the polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology* 2004; 230:529-536.
18. Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. Review. *Rev Med Virol* 2006; 16:385-392.
19. Sandin RL, Rodríguez ER, Rosenberg E, et al. Comparison of sensitivity for human cytomegalovirus of the polymerase chain reaction, traditional tube culture and shell vial assay by sequential dilutions of infected cell lines. *J Virol Methods* 1991; 32:181-191.
20. Kimberlin D, Lin Chin-yu, Sánchez P, et al. For the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Collaborative Antiviral Study Group. 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.
21. Barbi M. Use of Guthrie cards for the early diagnosis of neonatal herpes simplex virus diseases. Brief reports. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(3):251-252.