

## ● ARTÍCULO ORIGINAL

### Citomegalovirus en pacientes inmunocomprometidos detectados por PCR en Paraguay del 2008 a 2015

#### Cytomegalovirus in immunocompromised patients detected by PCR in Paraguay from 2008 to 2015

**Autores:** Carmen Portillo<sup>1</sup>, Derlis González<sup>2</sup>, Duilio Núñez<sup>3</sup>, Gustavo Benítez<sup>4</sup>

**Artículo recibido:** 9 junio 2016

**Artículo aceptado:** 3 agosto 2016

#### Resumen

**Introducción:** la infección por el citomegalovirus (CMV) se adquiere por contacto directo de secreciones infectadas, frecuente en países en desarrollo, produciendo estado de latencia, cronicidad e infección activa con replicación en ausencia de enfermedad clínica. En trasplantados se relaciona a desarrollo tardío de enfermedad y en recién nacidos (RN) a infección congénita.

**Objetivo:** identificar el ADN del CMV por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) cualitativa para confirmar la infección y el desarrollo de la enfermedad con la carga viral, en pacientes de diferentes servicios de salud con algún tipo de inmunosupresión en Paraguay.

**Metodología:** diseño descriptivo, corte transversal realizado del 2008 a 2015. Se tomaron muestras de sangre con EDTA o líquido cefalorraquídeo (LCR). La extracción del ADN se realizó con Qiagen®, seguido de una Nested PCR, que detecta un producto de 78 pb, para carga viral el CMV artus de Qiagen® en equipo Rotor Gene por PCR en tiempo real.

**Resultados:** se incluyeron 521 muestras, 416 para PCR cualitativa: 338 de sangre, 78 de LCR y 105 para cargas virales. Hombres fueron 247, mujeres 246 y RN 28; 303 del Hospital Central Instituto Previsión Social, 129 del Ministerio de Salud y 89 de hospitales privados. La PCR detectó el ADN del CMV en 248 (60%): 63% en sangre y 45% en LCR; 124 en mujeres y 107 en hombres, 17 en RN y 60 a 62 % en el grupo de 0 a 30 años. La carga viral resultó en 81 (77%): <10 copias/ml o no detectable, en 24 muestras se observaron valores desde 30 a 221.000 copias/mL.

**Conclusiones:** se confirmó en Paraguay infección por CMV con la PCR cualitativa y el desarrollo de enfermedad por carga viral, en inmunocomprometidos: trasplantados, dializados, con HIV; en RN a infección congénita. La mayoría fue joven (0-30 años), de servicios públicos, instaurándose la profilaxis o terapia anticipada con el antiviral.

**Palabras claves:** infecciones por citomegalovirus, inmunosupresión, reacción en cadena de la polimerasa, carga viral, huésped inmunocomprometido

<sup>1</sup>Bioquímica. Laboratorio Carmen Portillo. Asunción-Paraguay

<sup>2</sup>Hematólogo. Servicio Oncohematología, Hospital Central IPS. Asunción-Paraguay

<sup>3</sup>Infectólogo. Servicio de Infectología, Hospital Central IPS. Asunción-Paraguay

<sup>4</sup>Infectólogo. Servicio de Infectología. Instituto de Medicina Tropical. Asunción-Paraguay

#### **Autor correspondiente:**

Dra. Carmen Portillo

Dirección: Asunción, Paraguay

Teléfono: +(595) 981 446594

Correo electrónico: portillo@lab@gmail.com

## Abstract

**Introduction:** The infection by cytomegalovirus (CMV) is acquired by direct contact with infected secretions, is frequent in developing countries, and produces latency state, chronicity and active infection with replication in the absence of clinical disease. In transplant recipients, it is related to a late development of the disease and in newborns (NB) to congenital infection.

**Objective:** The aim was to identify CMV DNA by qualitative PCR (polymerase chain reaction) to confirm infection and the development of the disease by viral load in patients from different health services who have some form of immunosuppression in Paraguay.

**Methodology:** Design: descriptive cross-sectional study from 2008 to 2015. We included EDTA blood samples or cerebrospinal fluid (CSF). The DNA extraction was made with Qiagen® followed by nested PCR which detects a product of 78 bp, Artus® CMV Rotor Gene Qiagen Test in a real time PCR equipment was used for viral load.

**Results:** In total, 521 samples were included, 416 for qualitative PCR: 338 from blood, 78 from CSF and 105 for viral loads. There were 247 men, 246 women and 28 NBs; 303 from the Central Hospital of the Social Security Institute, 129 from the Ministry of Health and 89 from private hospitals. PCR detected CMV DNA in 248 (60%) samples: 63% in blood and 45% in CSF; 124 in women and 107 in men, 17 in NBs and 60-62% in the group of 0-30 years. Viral load resulted in 81 (77%) samples: <10 copies/mL or undetectable, in 24 samples values from 30 to 221,000 copies/mL.

**Conclusions:** CMV infection was confirmed in Paraguay using qualitative PCR and development of the disease by viral load in immunocompromised patients: transplanted, dialyzed, and with HIV; in NBs due to congenital infection. Most patients were young (0-30 years) and from public services, viral prophylaxis or early therapy was implemented.

**Keywords:** cytomegalovirus infections, immunosuppression, polymerase chain reaction, viral load, immunocompromised host

## Introducción

La infección por el citomegalovirus (CMV) se adquiere por contacto directo de secreciones infectadas, siendo muy frecuente en países en desarrollo. Produce un estado de latencia, cronicidad e infección activa con replicación viral en ausencia de enfermedad clínica. En trasplantados su detección se relaciona con desarrollo de enfermedad y en recién nacidos (RN) a infecciones congénitas. El CMV es de distribución mundial con una tasa de infección de 50 a 100%<sup>1</sup>, siendo 60% de infección subclínica en países desarrollados y casi 100% en pobladores del área rural. En grupos de riesgo como inmunocomprometidos, las infecciones primarias, reactivaciones de la replicación del CMV latente o recurrencia por reinfecciones con nuevas cepas, pueden conducir a formas severas, con importante tasa de morbi-mortalidad<sup>2</sup>. En ellos, tanto en la infección primaria como la recurrencia pueden manifestarse neumonías, hepatitis, coriorretinitis y afecciones neurológicas en pacientes con HIV<sup>3</sup>. La transmisión congénita involucra a alrededor del 0,5 al 1% de los recién nacidos siendo otro grupo de riesgo<sup>4</sup>, en quienes la enfermedad implica al sistema reticuloendotelial, sistema nervioso central, hepatoesplenomegalia, ictericia, microcefalia y coriorretinitis. El aumento de pacientes trasplantados así como el creciente uso de tratamiento con inmunosupresores ha motivado la necesidad de desarrollar métodos diagnósticos rápidos para detección de la infección. La serología es un excelente marcador de la actividad viral en la infección primaria, sin embargo es tardía por la necesidad de demostración de seroconversión<sup>2</sup>, generalmente a los 8 días de aparición de los síntomas. Ante la dificultad de interpretar esta serología, se han desarrollado y recomendado la Antigenemia (pp65) en trasplantados y el Shell vial en Recién nacidos para confirmar una infección por su diseminación, porque detectan proteínas tempranas que se producen en la

transcripción primaria, mediante anticuerpos monoclonales específicos. Los marcadores clásicos empleados en la monitorización, como son la antigenemia (pp65) y la carga viral de CMV (ADNemia), dependen de los dos factores envueltos en la patogénesis del virus (el virus y el sistema inmune), ya que tanto la replicación como la enfermedad dependen de su interacción.<sup>6</sup> Las técnicas moleculares, son de elección en la actualidad porque presentan alta sensibilidad y especificidad, por lo que han ido sustituyendo al cultivo y/o detección de antígeno, siendo actualmente los procedimientos más utilizados en el diagnóstico de rutina y control de la infección por CMV<sup>7</sup>. La PCR cualitativa, conocida como anidada (Nested) permite amplificar regiones genómicas de fragmentos de genes tempranos y tardíos aumentando la sensibilidad y especificidad, permite utilizar diferentes muestras como son: sangre entera, leucocitos, LCR y orina, posibilitando el seguimiento y evaluación de la terapia antiviral. La Carga viral o estudio de niveles de ADN en sangre son más sensibles y permite predecir con anterioridad la aparición de la enfermedad por CMV, su aumento rápido se correlaciona con síntomas de la enfermedad en trasplantados y falla en el tratamiento.<sup>2</sup>

Los antivirales disponibles y con mayor actividad frente a CMV hasta el momento son ganciclovir intravenoso y valganciclovir (de administración oral). En la terapia anticipada los pacientes solamente son tratados cuando hay evidencia de replicación asintomática de CMV, detectada mediante la monitorización con antigenemia o carga viral de CMV (ADNemia o RNAemia), por encima de un punto de corte establecido<sup>8</sup>.

Los primeros datos en el país sobre el CMV en inmunosuprimidos y recién nacidos se remontan al año 2003, con el 50% de trasplantados con la antigenemia y un 37%<sup>5</sup>, mediante el Shell vial, posteriormente en el Instituto de Medicina Tropical (Asunción, Paraguay) en pacientes con VIH.

El objetivo del presente trabajo fue identificar el ADN del CMV por PCR cualitativa y la carga viral en pacientes con algún tipo de inmunosupresión en Paraguay de diferentes servicios de salud.

## Materiales y métodos

**Diseño:** descriptivo, corte transversal realizado desde el 2008 a Setiembre de 2015.

**Metodología:** se utilizaron muestras sangre con EDTA, de pacientes de todas las edades y sexo, provenientes de diferentes Servicios Públicos y privados del país con sospecha de infección por CMV, además de algún tipo de inmunosupresión, ya sea del grupo de trasplantados, dializados, enfermedad linfoproliferativa o infección congénita. En pacientes HIV, con compromiso del SNC, la muestra utilizada fue el LCR.

La extracción del ADN ya sea de Sangre o LCR se realizó utilizando el kit comercial de Qiagen®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En la PCR cualitativa se realizó la amplificación de acuerdo al protocolo de Casas, Tenorio,<sup>15</sup> en 50 ul de volumen final con la Taq DNA Polimerasa, Recombinant de Invitrogen® una primera ronda de 35 ciclos de 94°C por 5 min, 94°C por 15seg, 54°C por 15 seg, 72°C por 15 seg y una extensión final de 72 por 5min. Del producto obtenido se tomaron 1 ul para la segunda ronda con 35 ciclos de 94°C por 5 min, 94°C por 15 seg, 49°C por 15 seg, 72°C por 15 seg y una extensión final de 72°C por 5min, también a un volumen de 50 ul. Los primers utilizados fueron sintetizados por Invitrogen® y que detectan unos productos de 78 pb, visualizados en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El límite de detección fue de 5 copias/ml y los controles positivos utilizados fueron gentilmente proveídos por el Instituto, ANLIS: Carlos Malbran-Argentina y la actina como control de inhibición de la PCR. Todo este protocolo se pasó a tiempo real, desde el 2011 utilizando el equipo Rotor gene® y Master mix Sso Fast EvaGreen Supermix de Bio Rad respectivamente. Los resultados se informaron Detectables y No detectables.

Para la carga viral se utilizó también muestra de sangre, el Kit DSP para la extracción y el kit comercial CMV artus de Qiagen® en equipo Rotor Gene por PCR en tiempo real, siguiendo el protocolo de acuerdo a la instrucciones del fabricante, con un límite de detección 10 a 10.000 copias/ml y sus propios controles internos.

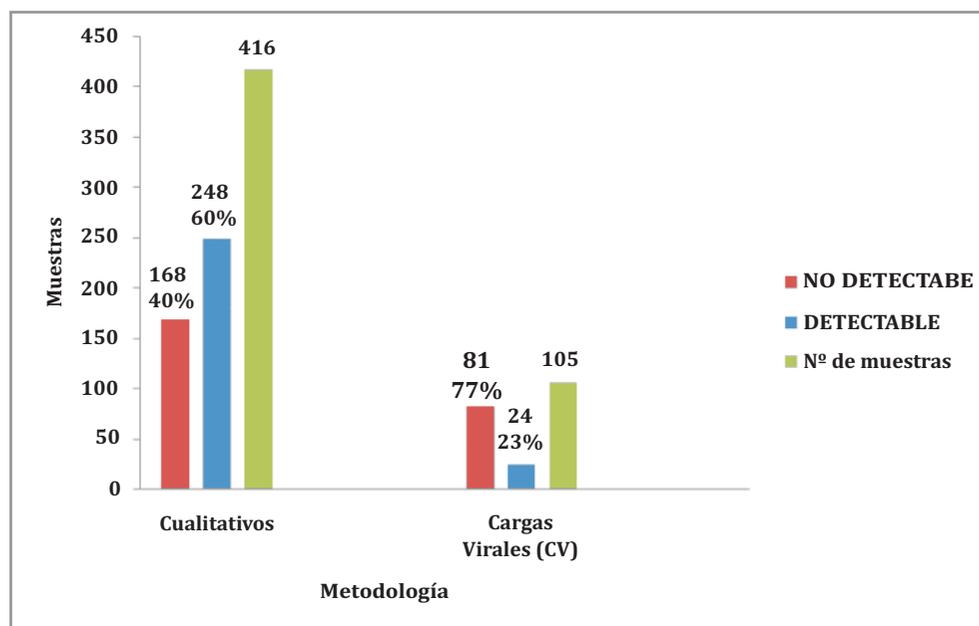
## Resultados

Durante los 8 años del estudio se incluyeron unas 521 muestras de pacientes: 247 fueron hombres, 246 mujeres y 28 sin datos que correspondieron a recién nacidos. El rango de edad fue de 0 a 91 años, que se agruparon en de 0-17 años con 123 muestras; de 18 a 30 años con 110; de 31 a 60 años con 223 y de 61 a 91 con 65 muestras con una mediana de 32 años. Procedentes de varios servicios de salud del país: 303 del Hospital Central del IPS (HCIPS), 129 de diferentes Hospitales del Ministerio de Salud y 89 de los servicios privados.

Por la PCR cualitativa se analizaron 416 muestras, 338 en sangre y 78 en LCR, en cambio para las cargas virales las 105 muestras fueron de sangre; cuyos resultados se detallan en el gráfico 1.

**Gráfico 1**

**Detección de Citomegalovirus por PCR y carga viral en inmunocomprometidos (n 521)**



En este 60% de muestras detectadas por la PCR cualitativa, la distribución por edades mostro valores desde 54% hasta 76%, tal como se observa en la siguiente tabla.

**Tabla 1**

**Distribución por edades de CMV detectados por PCR (n 416)**

	Nº de muestras	Detectables	%
0-17 años	107	64	60
18-30 años	91	56	62
31-60 años	172	93	54
61-91 años	46	35	76

Para la determinación de las cargas virales donde fueron incluidas 105 muestras, los resultados se agruparon en < 10 copias/mL o no detectables y otros dos grupos con valores desde 35 hasta 221.700 copias/mL. Estas correspondieron en su mayoría a pacientes con una PCR detectable para inicio del tratamiento o su monitoreo en algunos de ellos, que se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2****Rango de las cargas virales detectadas (n 105)**

NO DETECTABLE	<10 copias/ml log <1,0	81	77,14 %
DETECTABLE	35 - 1200	12	11,43 %
	1500 - 221700	12	11,43 %

En cuanto a la procedencia de las muestras que fue muy diversa, en su mayoría fueron de los Servicios del Hospital Central del IPS asociados a pacientes con trasplante de órgano sólido, dializados y enfermedades linfoproliferativas. De los Servicios de Ministerio de Salud, en los que se incluyeron principalmente a los provenientes del Hospital Nacional, fueron del Servicio de Diálisis, del Instituto de Medicina Tropical, en su mayoría asociados a infección por VIH. Por sospecha de infección congénita y trasplante del Pediátrico de Acosta Ñu y otros de los servicios privados, de acuerdo a la tabla 3.

**Tabla 3****Distribución por procedencia de CMV detectados por PCR y carga viral (n 521)**

	Detectables	No detectables	Total
<b>HC IPS</b>	157	146	303
<b>M.S.P. y B.S.</b>	73	56	129
<b>Privados</b>	42	47	89

En cuanto a la distribución por sexo, de las 246 muestras de mujeres, en 133 la PCR y las cargas virales, fueron detectables a diferencia de los 122 en los 247 hombres incluidos. Aunque el sexo de los RN no se identificó en el registro del laboratorio, el 17(61%) fueron detectables solo por la PCR.

**Discusión**

Con la implementación de estas técnicas moleculares, se confirmó en Paraguay infección por CMV con PCR en 248 muestras (60%), en muestras de sangre fue 63% y en LCR 45 %.

Aunque en la PCR cualitativa la sensibilidad se mejora mucho con la Nested<sup>13</sup>, en este estudio, que detectó en 60%, resultó ser más baja comparada con 100% de sensibilidad y 98,9% de especificidad obtenido por

la algunos autores con las tarjetas de Gutrie.<sup>10</sup> Es sabido que las PCR cualitativas, como en su mayoría son caseras, no existen metodologías estandarizadas y comparables entre laboratorios porque se utilizan deferentes regiones del genoma para la amplificación (unos tardíos o tempranos)<sup>7,21</sup>.

La mayoría de los afectados por la infección por CMV fue población joven, del grupo de entre 18 a 30 años en los que se observaron 62 % de positividad, aunque con un 76% en el grupo de mayores de 65 años.

En los 28 RN la detección se asoció a la sospecha de infección congénita (61%), cifra muy superior a la casuística chilena con solo 12,6%<sup>14,17</sup>, aunque no se pudo determinar el sexo ni la edad, por deficiencias en el llenado de datos, ni tampoco pudimos determinar la fuente trasmisión, si fue de la madre, leche o institucional, como refiere la literatura<sup>20</sup>.

Los grupos de edades de entre 0 a 30 años que mostraron 60 y 62% de detección respectivamente, son importantes porque, sobre todo aquellos, que se asociarían a infección congénita en los RN, por un lado y a población económicamente activa, en quienes sería conveniente vigilar a fin de evitar todo el gasto que conlleva el tratamiento, con el agravante de las reactivaciones frecuentes que conlleva la infección por el CMV. Resultó llamativo que en el grupo de 31 a 60 años, con la mayor cantidad de muestras, solamente 93 fueron detectables, resultando ser el menor con 54% de detecciones del ADN con respecto a los otros grupos. En cambio, el 76% observado en el grupo de 61 a 91 años podría deberse a que estos pacientes tendrían además otras comorbilidades asociadas a su edad.

Referente a la procedencia de los pacientes, fueron de los diferentes servicios públicos, ya sea de la Seguridad Social o del Ministerio de Salud, en las 432 muestras que pudieron confirmarse por PCR y CV, fueron de los Servicios de trasplantes, diálisis, hematología, oncología o pacientes con HIV, quienes tendrían un claro antecedente de inmunosupresión.

Si bien estos datos son muy crudos aun, es importante mencionar que faltan muchos por analizar para asociarlos y realizar aseveraciones precisas, por ejemplo, como la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las metodologías utilizadas. Así mismo, faltaría determinar también cuáles fueron los pacientes que presentaron una primoinfección, recurrencia o reactivación<sup>11,14</sup>, cuántos fueron trasplantados, dializados, con procesos linfoproliferativos y los portadores de VIH<sup>22</sup>

En algunos de los LCR que resultaron detectables, se debieron a sospecha de afecciones del sistema nervioso central en pacientes con VIH, ya que una patología frecuente en estos pacientes, relacionándose con los publicado del mismo servicio en el 2010<sup>9</sup>, aunque en ese grupo en su mayoría presentó afectación respiratoria.

El desarrollo de enfermedad se asoció a las cargas virales detectadas, distribuidas en <10 copias o niveles no detectables en 81 casos (77%) y en 24 casos (23%) con niveles elevados, en pacientes inmunodeprimidos: entre ellos trasplantados, dializados, con VIH. Este grupo (77%) con niveles de < 10 copias/mL y en 24 (23%) con niveles elevados, pareciera que se correlacionaron mejor con la sospecha clínica de infección por CMV, por ser esta más sensible, confirmando la evolución de la infección hacia enfermedad, necesaria para instaurar el tratamiento con el vangancyclovir intravenoso, medicación universal a fin de evitar las complicaciones que puedan comprometer la vida de los pacientes de este grupo. Esto se constató porque algunos de los pacientes volvieron para una segunda determinación, a fin de monitorear la eficacia de dicho tratamiento, observándose en muchos casos la remisión por niveles no detectables<sup>12,18</sup>.

A pesar de todas las limitaciones de estas metodologías, se ha avanzado mucho desde la serología y

ha servido como una herramienta diagnóstica rápida, de apoyo al equipo médico de nuestro país, lo que posibilitó instaurar el tratamiento en muchos casos de evolución a enfermedad por el CMV, confirmando una prevalencia alta, especialmente en este grupo de pacientes inmunodeprimidos y RN<sup>11,15,19</sup>.

Estos datos podrían servir a que los programas de Salud Pública que apoyan los trasplantes de órganos y a los pacientes dializados, oncológicos y VIH, tengan presente la importante participación del CMV demostrada en este estudio así como la necesidad de su detección precoz y de su utilidad en el monitoreo del tratamiento antiviral, cuyo costo no es despreciable. Otro aspecto a considerar, tal como lo recomiendan varios autores, es utilizar la terapia anticipada en lugar de la profilaxis, porque la aparición tardía de la enfermedad por CMV en transplantados, proporcionalmente a la duración de la profilaxis y a la potencia antiviral. También sería interesante modificar en el laboratorio el protocolo de la PCR cualitativa<sup>16</sup>, a pesar de ser el mencionado en varias bibliografías sobre todo para los LCR en los que se solo en el 45% se detectó, con otros primers, amplificando otras regiones del genoma de CMV, a fin de aumentar la sensibilidad de la metodología cualitativa y por otro lado, implementar la genotipificación, a fin de determinar si son recurrencias por la detección de nuevas cepas del CMV en los pacientes conocidos infectados.

Concluyendo, se confirmó en Paraguay infección por CMV con la PCR cualitativa y el desarrollo de enfermedad por carga viral, en inmunocomprometidos: transplantados, dializados, con HIV; en RN a infección congénita. La mayoría fue joven (0-30 años), de servicios públicos, instaurándose la profilaxis o terapia anticipada con el antiviral.

### Referencias bibliográficas

1. Carballal G, Oubiña J. Citomegalovirus. In: Virología médica. 4ª ed. Buenos Aires: Corpus; 2015. p. 404-14
2. Carballal G, Oubiña J. Infecciones virales en pacientes con inmunosupresión post trasplante. In: Virología médica. 4ª ed. Buenos Aires: Corpus; 2015. p. 669-78.
3. Avendaño F, Ferres M, Spencer E. Citomegalovirus. In: Virología clínica. Chile: Mediterraneo; 2011. p.223-31.
4. Avendaño F, Ferres M, Spencer E. Virus en inmunocomprometidos. In: Virología clínica. Chile: Mediterraneo; 2011. p.299-04.
5. Pérez JL. Monitoring techniques in cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enf Inf y Microb Clin.* 2011; 29(Suppl 6):18-23.
6. Fernández Alonso M, Rodríguez Macías A. Aproximación al estudio de coste-efectividad de la inclusión de la monitorización de la respuesta inmune celular específica frente a CMV como guía para el manejo de la enfermedad por CMV en pacientes transplantados. *Gest y Eval Cost Sanit.* 2014; 15(4):433-56.
7. Sanbonmatsu Gámez S, Pérez Ruiz M, Navarro Marí JM. Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; 32(Suppl 1):15-22.
8. Boza Cordero R. Citomegalovirus: de la infección neonatal a las infecciones en pacientes transplantados y de la citomegalia a la biología molecular. *Rev CIEMed UCR.* 2012; 7(2): 5-23.

9. Alarcón R, Arredondo MR, Samaniego S, Taboada A, Benítez G. Infección por citomegalovirus en pacientes con SIDA. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2009; 4(2):7-13.
10. Distéfano A, González CA, Pardón F, Sarubi MA, Canero Velazco C. 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.
11. Roncero García-Escribano O, Legaz Huidobro M, Bernardos E, Sánchez Manajavacas N, Villanueva Hernández R. Reactivación de CMV: ¿dónde está el límite del diagnóstico? *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al día.* 2012; 11(2):118-24.
12. Owers DS, Webster AC, Strippoli GF, Kable K, Hodson EM. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 28(2):CD005133.
13. Razonable RR, Hayden RT. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4):703-27.
14. Peña A, Larrañaga C, Luchsinger V, Villarroel J, Chávez A, Wu E. Enfermedad por citomegalovirus en niños chilenos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana-1. *Rev Chil Infect.* 2007; 24(6):477-84.
15. Conca N, Santolaya ME, Farfan MJ, Cofré F, Vergara A, Salazar L, Torres JP. Etiologic diagnosis in meningitis and encephalitis molecular biology techniques. *Rev Chil Pediatr.* 2016; 87(1):24-30.
16. De la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, Aguado JM, Cantisán S, Carratalá J, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infections in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(10):735-58.
17. Alarcón Allen A, Baquero-Artigao F. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc).* 2011; 74(1):52.e1-52.e13.
18. Ruiz-Tachiquín ME, Gómez-Delgado A, Valdez-Salazar HA, Aguilera P. Detection of cytomegalovirus by real-time PCR in HIV-positive plasm. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2014; 52(6):624-9.
19. Reina J, Weber I, Riera E, Busquets M, Morales C. Usefulness of a real-time quantitative polymerase-chain reaction (PCR) assay for the diagnosis of congenital and postnatal cytomegalovirus infection. *An Pediatr (Barc).* 2014; 80(5):299-303.
20. Martínez-Contreras A, Lira R, Soria-Rodríguez C, Hori-Oshima S, Maldonado-Rodríguez A, Rojas-Montes O, et al. Cytomegalovirus: congenital infection and clinical presentation in infants with respiratory distress syndrome. *Rev Med Inst Mex seguro Soc.* 2015; 53(3):286-93.
21. Cifuentes-Cifuentes Y, Granadillo-Vásquez T. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital infection cytomegalovirus: A purpose of a case of aseptic meningitis. *Infectio.* 2015; 19(4):175-8.
22. Arellano- Galindo J, Jiménez-Hernández E, Velásquez-Guadarrama N, Montaña-Figueroa EH, Moreno-Galván M, Bello-González A, Vázquez-Meraz E. Frecuencia de infección activa por citomegalovirus en pacientes pediátricos en estado crítico e inmunodeprimidos. *Patol Rev Latinoam.* 2009; 47(3):198-203.