

Citomegalovirus y embarazo

Nicolás García Ruiz¹
Luisa García Picazo²
Enrique Iglesias Goy³
Luis Ortiz Quintana⁴

¹Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital El Escorial

²Servicio de Microbiología Hospital El Escorial

³Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Puerta de Hierro

Profesor Titular de la Universidad Autónoma

⁴Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Gregorio Marañón

Profesor Titular de la Universidad Complutense Madrid

Correspondencia:
Nicolás García Ruiz
Hontoria del Pinar 5, 14B
28033 Madrid
E-mail:
nicolasjuncal@eresmas.com

Resumen

La infección fetal por citomegalovirus supone la causa más frecuente de malformaciones congénitas en el mundo desarrollado, afectando al 0,2-2,5% de los recién nacidos vivos.

La tasa de transmisión intraútero está íntimamente relacionada con la inmunidad materna lo mismo que la posibilidad de afectación fetal, aunque la inmunidad materna no supone en este caso, a diferencia de lo que sucede con otras enfermedades infecciosas, una protección absoluta, pudiendo producirse enfermedad neonatal por reactivación de una infección latente o por reinfección por cepas diferentes.

El diagnóstico de la primoinfección materna se basa en la demostración de la seroconversión, el estudio de la IgM específica y en los ensayos de avidéz para la IgG. En un futuro la investigación de anticuerpos neutralizantes pueden ser de utilidad para determinar el momento de la primoinfección.

El diagnóstico de la infección congénita se basa en la detección del virus o de productos virales en sangre fetal o líquido amniótico.

Hasta la fecha se desaconseja el "screening" del estado inmunitario materno durante el embarazo, pero la determinación de anticuerpos en el estudio preconcepcional tendría mayor interés ya que su presencia excluiría la posibilidad de primoinfección durante la gestación.

Palabras clave: Citomegalovirus. Embarazo. Diagnóstico.

Summary

Congenital cytomegalovirus infection is the most frequent cause of foetal malformations in the developed world, with rates of foetal infection ranging from 0.2-2.5% of live-born infants.

Intrauterine transmission of cytomegalovirus and foetal damage are closely connected with maternal immunity. Unlike preconceptional immunity against another virus, the presence of maternal antibodies to cytomegalovirus does not provide a total protection against intrauterine transmission of the virus, so it remains possible a congenital infection by reactivation of latent virus or by reinfection with a different strain of cytomegalovirus.

Diagnosis of primary infection during pregnancy may be achieved by one or more of the following analysis: seroconversion, cytomegalovirus specific IgM antibodies and IgG avidity assay. In the future, determination of cytomegalovirus neutralizing antibodies may be an additional useful parameter for identification and timing of primary infection.

Diagnosis of congenital infection is made by detection of virus or viral products in foetal blood or amniotic fluid. Until now it is not advised routine serologic screening of pregnant women, but it would be more useful to determine cytomegalovirus immune status before pregnancy in order to exclude the possibility of primary infection during pregnancy.

Key words: Cytomegalovirus. Pregnancy. Diagnosis.

Introducción

El Citomegalovirus humano (CMV) pertenece a la familia Herpesviridae junto con el VEB, VHS tipos 1 y 2, VVZ y HHV tipos 6 y 7.

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 órganos¹.

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 heterotípica². Según el momento de la vida en que se adquiera, las infecciones pueden ser congénitas, perinatales o postnatales. La infección congénita afecta a un 0,2-2,5% 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. Del 5-10% restantes sintomáticos el 90% tendrán secuelas que serán principalmente neurológicas³⁻⁶.

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% según las series³.

Epidemiología de la infección congénita

Seroprevalencia

Aunque actualmente se está empezando a dar mayor importancia a la infección congénita en mujeres con inmunidad preconcepcional², 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 (Tabla 1),

| Autores (Ref.) Año publicación | Año de estudio | País | Población estudiada | Prevalencia (%) |
|---|----------------|----------------------|---|-----------------|
| De Ory, <i>et al.</i> ⁸ 2001 | 1993-1994 | España (Madrid) | Población gral | 62.8 |
| | | | Hombres | 58.4 |
| | | | Mujeres | 66.7 |
| De Ory, <i>et al.</i> ⁹ 1998 | 1993-1994 | España (Madrid) | Población gral | 75.6 |
| | | | Edad 15-25 | 60.6 |
| | | | Edad 36-45 | 94.6 |
| Gambarotto, <i>et al.</i> ¹⁰ 1997 | - | Francia (Limoges) | Mujeres gestantes | 47.9 |
| | | | Mujeres metropolit. | 42.6 |
| | | | Mujeres inmigrantes | 94.5 |
| Gratacap, <i>et al.</i> ¹¹ 1998 | - | Francia (Isere) | Mujeres gestantes | 51.5 |
| Gouarin, <i>et al.</i> ¹² 2001 | 1992-1999 | Francia | Mujeres gestantes | 44.6 |
| Peckham, <i>et al.</i> ¹³ 1983 | - | Reino Unido | Mujeres gestantes | 56 |
| Griffits, <i>et al.</i> ¹⁴ 1980 | - | Reino Unido | Mujeres gestantes | 52.7 |
| Yow, <i>et al.</i> ¹⁵ 1988 | 1981-1986 | EEUU | Mujeres gestantes | 52 |
| Walmus, <i>et al.</i> ²² 1988 | 1981-1986 | EEUU | Mujeres gestantes | 50 |
| Marshal, <i>et al.</i> ²³ 1993 | 1991 | EEUU (Kentucky) | Sangre de cordón | 62 |
| | | | Mujeres blancas clase social media-alta | 47 |
| Odland, <i>et al.</i> ¹⁹ 2001 | 1995 | Rusia | Mujeres gestantes | |
| | | | Mujeres con abortos recurrentes | 7881.1 |
| Urkin, <i>et al.</i> ²⁰ 1988 | 1977 | Israel | Mujeres urbanas origen afro-asiatic. | 80 |
| | | | origen euro-ameríc. | 65 |
| Kamada, <i>et al.</i> ¹⁶ 1983 | - | Japón (Sapporo) | Mujeres gestantes | 93.8 |
| Hirota, <i>et al.</i> ¹⁷ 1992 | 1976-1990 | Japón (Shiogama) | Mujeres gestantes | 95 |
| Hoshiba, <i>et al.</i> ²¹ 1998 | 1980-1997 | Japón | Mujeres gestantes | |
| | | | 1980-1997 | 93.6-66.7 |
| | | | 1985 | 87.4 |
| | | | 1997 | 75.2 |
| Tantivanich, <i>et al.</i> ¹⁸ 1982 | - | Tailandia | Mujeres gestantes | 95 |

Tabla 1.
Datos de seroprevalencia

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%⁷. Así vemos que en Europa se han publicado datos de seroprevalencia que oscilan entre un 42-75%⁸⁻¹⁵ con algunas cifras superiores como la encontrada por De Ory, *et al.*⁸ 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 Japón¹⁶⁻²¹.

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^{8,11,15,22,23}.

Estudios epidemiológicos han documentado que los modos más frecuentes de adquirir la infección por CMV en la comunidad es el contacto con niños infectados y la transmisión sexual²⁴⁻²⁶.

La importancia del estado socioeconómico al que pertenezca la gestante se refleja en la gran diferen-

cia 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^{3,25,27,28} (Tabla 2).

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 perinatal³.

Modelos experimentales en cobayas han mostrado que la transmisión, en casos de primoinfección, aumenta a medida que avanza el embarazo^{29,30}. 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^{7,31}.

En cuanto a la severidad de las lesiones encontradas según el momento de la exposición en el útero algunos no han encontrado relación^{31,32}, pero actualmente

Tabla 2.
Factores de riesgo en la transmisión materno fetal de CMV

| Factores de riesgo primarios | Factor de riesgo secundarios |
|---|---|
| <p>Edad</p> <p>Menor edad ↓ Menor prevalencia de anticuerpos ↓ Mayor riesgo de primoinfección</p> <p>Contacto con niños</p> <p>Relaciones sexuales</p> <p>Mayor nº de parejas ↓ Mayor riesgo de ETS ↓ Mayor riesgo de exposición a CMV ↓ Mayor tasa de transmisión materno fetal</p> | <p>Estado socioeconómico bajo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mayor hacinamiento, menores condiciones higiénicas, lo que facilita el contacto con niños infectados - Mayor proporción de población inmigrante (procedente de Asia y África principalmente) - Mayor precocidad en el primer embarazo (a menor edad mayor riesgo de primoinfección) |

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 trimestre³.

Se ha estudiado también el papel de los anticuerpos neutralizantes maternos en relación con la transmisión intrauterina con resultados divergentes. Britt, *et al.*³ en 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 avidez a los de las madres no transmisoras

Por otro lado Eggers, *et al.*³³ en el año 2001 encontraron el sorprendente hallazgo de que la infección fetal congénita se producía mayoritariamente en aquellas mujeres que habían desarrollado anticuerpos anti-gB en el momento del nacimiento, mientras que la ausencia de estos anticuerpos parecía relacionarse con un menor riesgo de transmisión intrauterina, siendo este hallazgo estadísticamente significativo. 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 fenómeno³³.

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 dificultaría³³.

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 intrauterina⁷.

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. La conclusión es que la transmisión en infecciones adquiridas antes o inmediatamente después de la concepción son bastante inferiores a las que se manejan para infecciones adquiridas durante la gestación⁷.

En cuanto al tiempo que debe transcurrir entre la infección primaria y la concepción, los mismos auto-

res 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 infectividad⁷.

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^{34,35}.

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 extraembrionarias 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 viral³⁶.

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. Por tanto la infección placentaria y la transmisión del virus estarían relacionados causalmente³⁷.

Modelos experimentales en cobayas han demostrado que siempre que hay infección fetal el virus es aislado de la placenta, pero no siempre que hay infección placentaria existe infección fetal, únicamente en el 27% de los casos, lo que sugeriría que la placenta del cobaya actuaría como reservorio en el que el virus se replicaría previamente a la transmisión fetal³⁷.

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.

En los neonatos nacidos vivos la demostración de virus en la orina durante las tres primeras semanas de vida es indicativo de infección congénita³⁸.

En cuanto a los factores patogenéticos 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 transplantados renales y tampoco pudo encontrarse relación en un grupo de niños con infección congénita en Hungría³⁸.

Los objetivos actuales deben centrarse en la investigación que nos permita paliar el desconocimiento existente de los mecanismos moleculares involucrados en la infección congénita. 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 feto³⁷.

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^{2,39,40} y también lo es, que la presencia de anticuerpos maternos preconceptionales 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^{3,41}. 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%)⁴².

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 hechos³. 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 avididad que aquellas que no lo transmiten, esto sugiere que los anticuerpos neutralizantes probablemente limiten la infección fetal por su capacidad para atravesar la placenta. Aunque ya hemos comentado en el capítulo de transmisión la sorprendente asociación encontrada por un grupo de trabajo entre la presencia de anti-gB y la transmisión maternofetal³³.

La mayoría de estos anticuerpos son subclase Ig G1 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 preconceptional 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^{29,43}.

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^{44,45}.

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^{46,47}. 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 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.

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. 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 inicial⁴⁸⁻⁵⁰.

Los resultados pueden expresarse como índice de avidéz (IA) en porcentaje, según la fórmula:

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

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%⁴⁵.

Actualmente existen al menos dos kits de reactivos comercializados^{49,50}, que se evalúan según su capacidad de exclusión y de detección de infección reciente. Ambos han mostrado buenos resultados en la detección de infección reciente pero existe mayor variabilidad en la exclusión de esta, ya que algunas infecciones antiguas presentan un índice de avidéz inferior al punto de corte establecido, lo que haría pensar erróneamente en una infección reciente. La capacidad de exclusión puede mejorarse bajando el punto de corte pero a costa de disminuir la especificidad de la técnica, de modo que pacientes con infección reciente presentarían un índice de avidéz superior al punto de corte y serían erróneamente clasificados como infección antigua.

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^{49,50}. No obstante no hay que olvidar que se han descrito casos de infección intraútero en los que no se detectaron anticuerpos en la madre⁵¹.

Investigación de anticuerpos neutralizantes

Los anticuerpos neutralizantes son aquellos capaces de bloquear la capacidad infectiva del virus contra el que van dirigidos. 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^{33,52}. 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^{33,52,53}. 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.

En el método de inmunoblot propuesto por Eggers, *et al.*³³ se utilizaron ambas glicoproteínas gB y gH, y se estudió una muestra de 529 sueros procedentes de 507 gestantes con infección previa. De ellos el 93,6% reconocían alguna de las dos glicoproteínas, mientras que un 6,4% eran no respondedores en cuanto a la producción de estos anticuerpos, lo que aparentaría por tanto una infección reciente siendo anti-gua.

Se han comparado técnicas de enzimoimmunoensayo anti-gB con ensayo de avididad IgG obteniéndose en ambos muy buenos resultados en la capacidad de detección de infección reciente en pacientes con seroconversión documentada, mientras que la capacidad de exclusión en pacientes con infección pasada, disminuía con cada método pero ascendía al 94% cuando se combinaban ambos. Su utilización conjunta supondría una manera sencilla de mejorar el diagnóstico^{52,53}.

Por todo esto estas técnicas deben considerarse como técnicas confirmatorias, nunca de screening, en el diagnóstico de la infección primaria por CMV.

La Figura 1, se recoge nuestra propuesta de algoritmo diagnóstico.

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 infección⁵⁴ y es dudosa su relación con la severidad de la afectación fetal, cuando se usa en el diagnóstico prenatal⁵⁵.

SCREENING DURANTE EL EMBARAZO

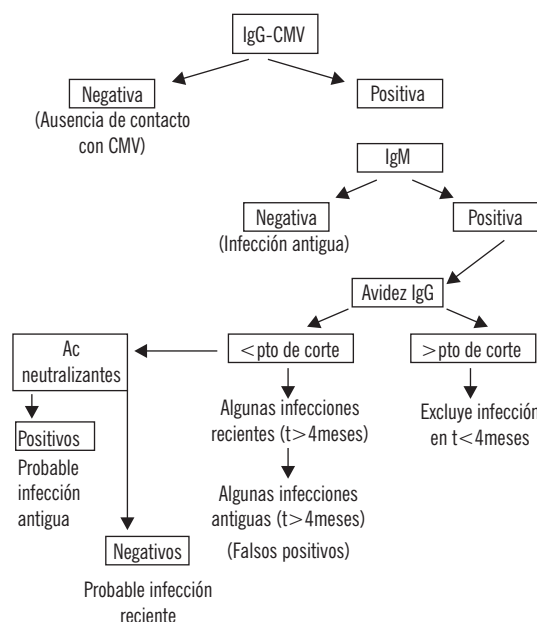
Los objetivos que persigue el control serológico de la gestante son dos. Primero prevenir infecciones agudas con riesgo de transmisión vertical y segundo diagnosticar infecciones crónicas con el mismo riesgo.

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 elaboradas en el año 1994 por un comité de expertos y respaldadas por las autoridades sanitarias⁵⁶, 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. A esto habría que añadir las limitaciones de los test serológicos para el diagnóstico de infección aguda que ya se han visto en el apartado de diagnóstico. 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 hospitales⁵⁷.

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 infec-

Figura 1. Algoritmo diagnóstico de infección aguda materna



ción fetal clínicamente significativa. En las mujeres en las que no se hubieran detectado anticuerpos preconceptionales (que en España estarían entre un 30-40%) únicamente podrían dárseles algunas medidas muy generales de prevención de la infección especialmente a 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 bebida⁵⁷. 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 screening preconcepcional, 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 embarazo⁵⁸.

Diagnóstico prenatal

La intención del diagnóstico prenatal es en todos los casos conocer el estado o la posible afectación fetal, independientemente de la razón que motive el estudio. Además el proceso a diagnosticar debe tener un tratamiento posible o bien hacerse en un momento de la gestación en el cual ofrecer a la embarazada soluciones alternativas.

Para multitud de problemas fetales la conducta esta hoy claramente establecida, incluso para algunos procesos infecciosos, pero no es así para la infección fetal por citomegalovirus.

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 preconcepcional². 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 íntegras⁵⁹. 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 infección²⁶, y tasas fiables de prevalencia, pues se refieren cifras muy dispares.

Así actualmente se desaconseja el cribaje 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... Debemos conocer pues las técnicas empleadas en el diagnóstico prenatal.

Las gestantes candidatas al diagnóstico prenatal de la infección fetal por citomegalovirus son principalmente todas aquellas que hayan tenido una primoinfección durante la gestación. No se descarta su indicación actual, o futura, para los casos de reactivación o reinfección, pues aunque se piensa que en estos casos la tasa de transmisión es mucho mas baja, se desconocen las cifras reales, igual que la probabilidad de daño neurológico, refiriéndose que si bien la inmunidad materna reduce la transmisión, la severidad de la infección congénita por citomegalovirus no es significativamente mayor después de la transmisión viral en el curso de una primoinfección que cuando se produce por una recurrencia o reactivación⁵⁹. Desconocemos así mismo las cifras reales sobre el riesgo de afectación fetal fundamentalmente por las dificultades aludidas en la interpretación de los tests serológicos que impediría saber cuantas pacientes de las incluidas en los estudios son primoinfección o reactivación o reinfección⁶⁰ y también porque el momento del embarazo en el que se realice el diagnóstico prenatal aportará tasas distintas de transmisión pues se acepta son mas altas a medida que avanza el embarazo, a la inversa que el riesgo de afectación fetal severa⁶¹.

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 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

fetal. También analizaremos las técnicas no invasivas como la ecografía de alta resolución.

Selección de pacientes

Como se ha dicho las gestantes candidatas al diagnóstico prenatal de la infección fetal por citomegalovirus, se limitan hoy en día a los casos de primoinfección durante la gestación.

Métodos

IgM específica en sangre fetal

Como los anticuerpos IgM no pasan la placenta su presencia indicaría infección fetal, pero del estudio de la IgM específica de sangre fetal obtenida por cordocentesis se han comunicado niveles muy bajos de sensibilidad, con altas tasas de falsos negativos, posiblemente relacionadas con la precocidad en la obtención de la muestra, pues se conoce que antes de la 21-22 semanas existe una respuesta inmunológica limitada por parte del feto⁵⁹ por inmadurez del sistema inmunitario y por la competencia entre los altos niveles de IgG maternos, que si atraviesan la barrera placentaria, y los relativamente bajos niveles de IgM en sangre fetal⁶². Se comunican altas tasas de especificidad, próximas al 100%, y bajas de sensibilidad (entre el 20 y el 70%) en lo que pudiera influir la insuficiente capacidad diagnóstica de los inmunoensayos actualmente disponibles^{47,63}. Contrariamente resultados falsos positivos derivarían en parte por la interferencia con el factor reumatoide que se produce comúnmente durante la infección. Podemos decir sin embargo que la significación pronóstica de la IgM en sangre fetal no se ha evaluado sistemáticamente en estudios bien diseñados con número suficiente de pacientes⁶⁴. No estamos en condiciones pues de descartar que su estudio en un momento adecuado, después de la semana 20, pueda ayudar en el diagnóstico y hasta en el pronóstico de los fetos con infección congénita por citomegalovirus⁶⁴. Por el contrario está por aclarar si el uso de técnicas mas agresivas como la cordocentesis para la realización de esta determinación, aumentan la fiabilidad de las realizadas en líquido amniótico. En la actualidad se duda de la utilidad de esta determinación, aunque posiblemente debería formar parte de cualquier trabajo de investigación, asumiendo que debe realizarse después de la 21 semanas de gestación y que es aconsejable que hayan transcurrido al menos 6 semanas desde el diagnóstico de la infección materna, lo que aumentaría la fiabilidad de la técnica y evitaría el posible contagio iatrogénico al feto⁶⁵. Por otra parte se desaconseja reiteradamente su uso aislado para fines diagnósticos.

Cultivo viral y análisis del DNA viral en líquido amniótico

Las sensibilidades referidas para el cultivo viral y el análisis del DNA por PCR en líquido amniótico oscilan entre el 50-70% para el primero y el 70-100% para el segundo siempre y cuando las muestras de líquido amniótico se obtengan después de la semana 20 de gestación^{59,66,67}. Para muestras obtenidas antes de ese momento las sensibilidades disminuyen de forma llamativa oscilando entre el 43 y 65% para el cultivo y el 57 y 75% para la amplificación del DNA viral por PCR, debido a un mayor porcentaje de falsos negativos pues el feto excreta citomegalovirus por la orina al líquido amniótico y la diuresis fetal queda claramente establecida después de ese momento⁶⁸. Realizar estas determinaciones después de la 21 semana y la combinación de ambas con el fin de aumentar su sensibilidad y especificidad parece la recomendación de la mayor parte de los autores^{12,29,45,59,61,64-66}, comunicándose en estos casos, en una de las series mas amplias, sensibilidades del 84% y especificidades del 100%⁶⁹. De cualquier forma la fiabilidad de las dos técnicas solas o en asociación permanece por determinar⁶³ pues un fallo en el aislamiento de citomegalovirus por cualquiera de las dos técnicas no necesariamente excluye la infección intrauterina por este virus y el resultado positivo no siempre se relaciona con la infección neonatal^{66,70}. Así se han comunicado falsos positivos para la PCR debido al paso transplacentario de virus defectuosos o fragmentos virales capaces de iniciar la replicación pero incapaces de producir infección-afectación fetal, a la transmisión de pocas partículas virales que junto con la existencia previa de anticuerpos neutralizantes específicos y la actividad de la inmunidad celular sean capaz de inhibir la actividad viral, es decir que las defensas maternas o fetales producirían una "limpieza" del virus, o a la realización de la amniocentesis muy precozmente antes de un crecimiento viral suficiente en los tejidos fetales. Los falsos negativos para el cultivo podrían deberse a un proceso inverso, paso transplacentario de bajos niveles virales con capacidad infectante pero insuficientes para positivizar el cultivo⁶⁰. También el desconocimiento de ciertos hechos fundamentales, como el tiempo que transcurre desde la infección materna hasta la transmisión al feto y desde esta hasta que el virus es detectable en el líquido amniótico contribuyen a la tasa de falsos negativos para cualquiera de las dos técnicas⁶⁴. Se acepta no obstante que un tiempo prudencial para obtener el mayor rendimiento y fiabilidad de los test diagnósticos serían las 6 semanas desde la primoinfección, siempre y cuando las muestras se obtuvieran como se ha dicho después de las 21 semanas de gestación^{45,65,68,69}.

Pero la detección de citomegalovirus en muestras de líquido amniótico no nos sirve para discriminar entre los fetos infectados que van a desarrollar una enfermedad sintomática y aquellos que permanecerán asintomáticos⁵⁵. Para distinguir la infección por citomegalovirus de la enfermedad se ha propuesto la cuantificación del DNA, por el papel potencial que pudiera jugar la carga viral como factor pronóstico. Que sepamos, fundamentalmente tres grupos de trabajo^{55,68,71} han comunicado sus datos con resultados controvertidos.

Revello, *et al.*⁷¹ Comunican que los niveles de DNA en muestras de líquido amniótico no son estadísticamente diferentes entre fetos sintomáticos y asintomáticos, aunque la media de la carga viral mediante la cuantificación por PCR es mayor en el grupo de los sintomáticos. Sin embargo más recientemente Guerra, *et al.*⁶⁸ usaron la PCR para la cuantificación de equivalentes genómicos (EG), y mediante esta técnica comunicaron que el hallazgo de más de 103 EG/ml en el líquido amniótico predice la transmisión materno-fetal con un nivel de probabilidad del 100%. La detección de más de 105 EG/ml daría una probabilidad del 100% de predecir la presencia de infección sintomática en el feto o neonato. Al contrario niveles inferiores a 105 EG / ml excluiría con un 95% de probabilidades la afectación sintomática fetal o neonatal. Niveles inferiores a 103 EG / ml también excluirían la infección con una probabilidad del 81% y para niveles superiores la probabilidad de infección es del 100%. Últimamente otro grupo de autores⁵⁵ han comunicado sus resultados sobre la cuantificación de DNA viral mediante el uso de "real-time" PCR estudiando tres grupos de muestras. Aquellas procedentes de fetos con graves anomalías estructurales, es decir con severa afectación fetal, de otro grupo asintomático, y otro grupo con anomalías ecográficas menores. Concluyen que la carga viral se relaciona con la afectación fetal, pero sus cifras no revelan conclusiones tan categóricas como el grupo de Guerra⁶⁸. En los tres trabajos se afirma que la baja carga viral no excluye la infección fetal.

Asumiendo que el uso de la cuantificación del DNA viral en muestras de líquido amniótico puede ser un marcador pronóstico de enfermedad fetal, debemos ser precavidos al interpretar la correlación entre la carga viral y el estado fetal. Es decir que aun no disponemos de un nivel crítico que sea capaz de predecir la infección sintomática pudiendo existir casos de afectación fetal severa con baja carga viral y otros asintomáticos con alta carga viral, pues estos pueden estar influidos como se ha dicho por el momento de la gestación en que se hace la determinación y por el tiempo transcurrido entre la infección mater-

na y la toma de la muestra⁵⁵, momento que por otra parte es con frecuencia difícil de determinar. Se ha propuesto que sería más adecuado que una determinación aislada aceptando un nivel crítico, una determinación seriada a lo largo del embarazo, lo cual hoy es difícil de justificar⁵⁵. Las distintas técnicas de cuantificación, la diferencia entre los grupos estudiados y el pequeño número de casos hace difícil extraer conclusiones.

Hasta el momento existen muchas dificultades para determinar algunas variables como la edad gestacional en la que se produce la infección materna o el momento de la transmisión intrauterina al feto, y añadido a la dificultad del seguimiento de la infección durante la vida fetal hacen difícil determinar un único marcador de infección sintomática. Aun así la carga viral en líquido amniótico parece asociarse con el resultado fetal⁷, pero hasta la fecha parece más lógico hacer uso de las técnicas a nuestro alcance.

El riesgo de transmisión durante el diagnóstico prenatal mediante amniocentesis o cordocentesis y en presencia de viremia materna no parece ser relevante, aunque no se puede excluir. Esta conclusión se ve refrendada por el hecho de que las tasas de transmisión no son distintas entre aquellas gestantes sometidas a uno o varios procedimientos de diagnóstico prenatal, ni son distintas las tasas históricas con las que se comunican desde el inicio de estas técnicas⁷.

Otros estudios en sangre fetal

El recuento hemático, plaquetario y el estudio de la función hepática son de realización obligatoria cuando con motivo del diagnóstico prenatal se realiza una cordocentesis. Las alteraciones en estos parámetros sugerirían infección reciente si se asocian anemia, trombopenia y alteración de los test de función hepática⁵⁹ y aunque parece más probable que en estos casos exista afectación fetal severa, se desconoce su relación con el resultado final. Se ha comunicado trombopenia y anomalías de la función hepática hasta en un 80% de los casos de fetos sintomáticos⁷², pero de cualquier forma no dejan de ser signos indirectos insuficientes para identificar los fetos con riesgo de secuelas severas⁶⁹.

Ecografía

Es evidente el valor de la ecografía en la detección de anomalías estructurales, y que cuando por este método se detectan en el curso de una infección fetal por citomegalovirus es indicativo de una afectación fetal severa. Pero las alteraciones fetales son evolutivas y pueden hacerse evidentes tardíamente en el curso de la gestación alejándose del objeto del

diagnóstico prenatal⁷³. Así aunque cuando hay sospecha de infección fetal por citomegalovirus se aconseja un seguimiento ecográfico frecuente, cada cuatro semanas (59), el valor de la técnica para el diagnóstico prenatal permanece por determinar y sobra decir que una ecografía normal no excluye ni infección ni afectación fetal.

Tratamiento y vacunación

Respecto al tratamiento de la infección congénita solo existen estudios anecdóticos sobre dos fármacos antivirales, el ganciclovir y el foscarnet, el primero con una importante toxicidad hematológica y el segundo renal. Ello unido a lo poco que se conoce sobre su posible teratogenicidad y a que no ha demostrado eficacia terapéutica, desaconsejan su uso durante la gestación, tanto con el fin de disminuir la transmisión maternofetal como para el tratamiento de la sospecha de la infección fetal por citomegalovirus.

Como hemos comentado es posible la infección congénita sintomática por CMV en casos de madres con inmunidad preconcepcional, pero la tasa de transmisión se reduce de un 40% a menos del 1% (0,2-2%) en los casos de infección recurrente⁶². Para algunos autores esto supondría la justificación suficiente para la elaboración de vacunas con el fin de prevenir-disminuir la infección congénita por citomegalovirus pues la formación de anticuerpos podría producir una protección parcial de eficacia similar a la primoinfección natural⁴².

El apoyo para el estudio y comercialización de las vacunas se ha sustentado en que por la baja tasa de contagiosidad de este virus, tasas de vacunación relativamente bajas (60%) serían suficientes para la erradicación. Ensayos en este sentido (trabajos en fase I) para evaluar la reactogenicidad e inmunización producida por una vacuna frente a la gB concluyen que es bien tolerada y altamente inmunógena⁷⁴, aunque la inducción de anticuerpos neutralizantes para evitar la infección fetal pueda no ser suficiente.

Conclusiones

Como resumen a todo lo anterior podemos concluir, primero, que la enfermedad fetal por citomegalovirus puede producirse como consecuencia de una primoinfección materna o bien en el curso de una reactivación o reinfección por cepas heterotípicas. Segundo,

la tasa de transmisión intraútero es aproximadamente de un 40% no habiéndose demostrado una relación entre la carga viral materna con las tasas de transmisión ni con la posibilidad ni severidad de la afectación fetal. Tercero, la mayor amenaza para el feto se produce cuando la infección fetal ocurre en las primeras veinte semanas de gestación. Cuarto, se aconseja que el tiempo que debe transcurrir entre la primoinfección materna y una nueva concepción sea de al menos seis meses. Quinto, la seropositividad materna disminuye las tasas de transmisión fetal, pero se desconoce la frecuencia de afectación fetal y de enfermedad fetal severa como consecuencia de una reinfección o reactivación, manejándose en la actualidad cifras superiores a las conocidas. Sexto, hasta la fecha no se aconseja el screening de la infección materna durante el embarazo, pero parece aceptable la inclusión de esta determinación en el estudio preconcepcional. Séptimo el diagnóstico prenatal estaría indicado en los casos de sospecha de primoinfección materna y utilizaremos con este fin el cultivo viral y el análisis del DNA viral mediante PCR de muestras de líquido amniótico obtenidas por amniocentesis realizada después de la veintiuna semanas de gestación. Por último, no disponemos de tratamiento médico ni de vacuna.

Bibliografía

1. Holinka RL. Human CMV. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 7ª edición. Washington DC: ASM Press, 1999;888-99.
2. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Eng J Med* 2001;344:1366-71.
3. Britt WJ. Congenital cytomegalovirus infection. En: Hitchcock PJ, Mackay HT, Wasserheit JN (editors) Binder (editor asociado). *Sexually transmitted diseases and adverse outcomes of pregnancy*. Washington DC: ASM Press, 1999;269-81.
4. Trincado DE, Rawlinson WD. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J Paediatr Child Health* 2001;37(2):187-92.
5. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Eng J Med* 1992;326(10):663-7.
6. Farran Codina I, Sanchez MA. Grupo herpesvirus y su efecto perinatal. En: Cabero Roura L coordinador. *Infecciones de transmisión vertical durante el embarazo*. Barcelona: Ed. Mayo, 1999;47-66.

7. 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.
8. de Ory Manchon F, Sanz Moreno JC, Castañeda López R, Ramírez Fernández R, Leon Rega P, Pachon del Amo I. Seroepidemiología frente a citomegalovirus en la Comunidad de Madrid. *Rev Esp Salud Pública* 2001; 75(1):55-62.
9. de Ory F, Castañeda R, Ramírez R, Pachon I. Estudio seroepidemiológico frente a citomegalovirus en mujeres en edad fértil de la Comunidad de Madrid. *Med Clin (Barc)* 1998;111(8):290-1.
10. Gambarotto K, Ranger-Rogez S, Aubard Y, Pirer P, Duffetelle B, Delpeyroux C, et al. Primary cytomegalovirus infection and pregnant women: epidemiological study on 1100 women at Limoges. *Pathol Biol (Paris)* 1997;45(6):453-61. [Abstract]
11. Gratacap-Cavallier B, Morand P, Dutertre N, Bosson JL, Baccard-Longere M, Jouks PS, et al. Cytomegalovirus infection in pregnant women. Seoeidemiological prospective study in 1018 women in Isere. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1998;27(2):161-6. [Abstract]
12. Gouarin S, Palmer P, Cointe D, Rogez S, Vabret A, Rozenberg F. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J Clin Virol* 2001; 21:47-55.
13. Peckham CS, Chin KS, Coleman JC, Henderson K, Hurley R, Preece PM. Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. *Lancet* 1983;1:1352-5.
14. Griffiths PD, Campbell-Benzie A, Heath RB. A prospective study of primary cytomegalovirus infection in pregnant women. *Br J Obstet Gynaecol* 1980;87(4): 308-14.
15. Yow MD, Williamson DW, Leeds LJ, Thompson P, Woodward RM, Walmus BF, et al. Epidemiologic characteristics of cytomegalovirus infection in mothers and their infants. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158(5): 1189-95.
16. Kamada M, Komori A, Chiba S, Nakao T. A prospective study of congenital cytomegalovirus infection in Japan. *Scand J Infect Dis* 1983;15(3):227-32.
17. Hirota K, Muraguchi K, Watabe N, Okumura M, Kozu M, Takahashi K et al. Prospective study on maternal, intrauterine, and perinatal infections with cytomegalovirus in Japan during 1976-1990. *J Med Virol* 1992; 37(4):303-6.
18. Tantiranich S, Auwanich W, Tharavanij S. Infection rates of cytomegalovirus among Thai pregnant women. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1982; 13(4):569-600. [Abstract]
19. Odland JO, Sergejeva IV, Ivaneev MD, Jensen IP, Stray-Pedersen B. Seropositivity of cytomegalovirus, parvovirus and rubella in pregnant women and recurrent aborters in Leningrad County, Russia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80(11):1025-9.
20. Urkin J, Sarov B, Naggan L, Haikin H, Sarov I. Prevalence of CMV antibodies among women of childbearing age in different social environments in southern Israel. *J Med Virol* 1988;24(1):19-25.
21. Hoshiba T, Asamoto A, Yabuki Y. Decreasing seropositivity of cytomegalovirus of pregnant women in Japan. *Nippon Rinsho* 1998;56(1):193-6. [Abstract]
22. Walmus BF, Yow MD, Lester JW, Leeds L, Thomson PK, Woodward RM. Factors predictive of cytomegalovirus immune status in pregnant women. *J Infect Dis* 1998;157(1):172-7.
23. Marshal GS, Rabalais GP, Stewart JA, Dobbins JG. Cytomegalovirus seroprevalence in women bearing children in Jefferson County, Kentucky. *Am J Med Sci* 1993;305(5):292-6.
24. Stagno S, Cloud G, Pass RF, Britt WJ, Alford CA. Factors associated with primary cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Med Virol* 1984;13(4):347-53.
25. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal age and congenital cytomegalovirus infection: screening of two diverse newborns population, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993;168(3):552-6.
26. Numazaki K, Fujikawa T, Chiba S. Relationship between seropositivity of husbands and primary cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Infect Chemother* 2000;6(2):104-6.
27. Fowler KB, Pass RF. Sexually transmitted diseases in mothers with neonates with congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 1991;164(2):259-64.
28. Coonrod D, Collier AC, Ashley R, De-Roven T, Corey L. Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted diseases clinic: a prospective study. *J Infect Dis* 1998;177(5):1188-93.
29. Lazzarotto T, Varani S, Gabrielli L, Spezzacatena P, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Intervirolgy* 1999;42(5-6):390-7.
30. Kumar ML, Prokay SL. Experimental primary cytomegalovirus infection in pregnancy: timing and fetal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1983;145(1): 56-60.
31. Preece PM, Blount JM, Glover J, Fletcher GM, Pekham CS, Griffiths PD. The consequences of primary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Arch Dis Child* 1983; 58(12):970-5.
32. Griffiths PD, Baboonian C. A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91(4):307-15.

33. Eggers M, Radsak K, Enders G, Reschke M. Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Med Virol* 2001;63:135-42.
34. Kumar ML, Nankervis GA, Cooper AR, Gold EG. Postnatally acquired cytomegalovirus infection in infants of CMV-excreting mothers. *J Pediatr* 1984; 104(5):669-73.
35. Pass RF, Stagno S, Dworsky ME, Smith RJ, Alford CA. Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenitally infected and normal infants. *J Infect Dis* 1982;146(1):1-6.
36. Hemmings DG, Kilani R, Nykiforuk C, Preiksaitis J, Guilbert LJ. Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblast. *J Virol* 1998;72(6):4970-9.
37. Fisher S, Genvacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implication for transmission and pathogenesis. *J Virol* 2000;74(15):6808-20.
38. Lukácsi A, Taródi B, Endreffy E, Bábinszki A, Pál A, Pusztai R. Human cytomegalovirus gB genotype 1 is dominant in congenital infections in south Hungary. *T Med Virol* 2001;65:537-42.
39. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999;104:55-60.
40. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Secondary maternal cytomegalovirus infection. A significant cause of congenital disease [carta]. *Pediatrics* 2001;107: 1227-8.
41. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992;326(10):702-703.
42. Piper JM, Wen TS. Perinatal cytomegalovirus and toxoplasmosis: challenges of antepartum therapy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1999;42(1):81-5.
43. Rawlinson WD. Broadsheet Number 50: Diagnosis of human cytomegalovirus infection and disease. *Pathology* 1999;31(2):109-15.
44. Haukenes G, Finne PH, Bertnes E, Orstavik I, Tjøtta E, Haneberg B, et al. Cytomegalovirus (CMV) and rubella virus infection during pregnancy. A study of CMV and rubella virus antibodies in 2014 pregnant women and follow-up studies of infants at risk for intrauterine CMV infections. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984;63(5): 431-5.
45. Grangeot-Keros L, Cointe D. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. *J Clin Virol* 2001;21:213-21.
46. Miendje Deyi Y, Gouban P, Bodéus M. False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:557-60.
47. Genser B, Truschnig-Wilders M, Stünzer D, Landini MP, Halwachs-Baumann G. Evaluation of five commercial enzyme immunoassay for the detection of human cytomegalovirus-specific IgM antibodies in the absence of commercially available gold standar. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(1):62-70.
48. Grangeot-Keros L, Moyaux MJ, Lebon P, Freymuth F, eugene G, Striker R, et al. Value of cytomegalovirus (CMV) Ig G avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis* 1997; 175:944-6.
49. Bodéus M, Beulné D, Goubau P. Ability of three IgG-avidity assays to exclude recente cytomegalovirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20: 248-52.
50. Baccard-Lougere M, Freymuth F, Cointe D, Seigneurin JM, Grangeot-Keros L. Multicenter evaluation of a rapid and convenient method for determination of cytomegalovirus immunoglobulin G avidity. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(2):429-31.
51. Verboon-Macielek MA, Gerards LJ, Stoutenbeek P, Van Loon AM. Congenital infection: diagnostic serology of the mother not always definitive. *Ned Tijdschr Geneesk* 2001;145(4):153-6. [Abstract]
52. Rothe M, Pepperl-Klindworth S, Lang D, Vornhagen R, Hinderer W, Weise K, et al. An antigen fragment encompassing the AD2 domains of glycoprotein B from two different strains is sufficient for differentiation of primary vs recurrent human cytomegalovirus infection by ELISA. *J Med Virol* 2001;65:719-29.
53. Sipewa MJ, Goubau P, Bodéus M. Evaluation of a cytomegalovirus glycoprotein B recombinant enzyme immunoassay to discriminate between a recent and a past infection. *J Clin Microbiol* 2002;40(10):3689-93.
54. Revello MG, Zarattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection; prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* 1998; 77:1170-5.
55. Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, et al. Real time PCR quantification of cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1767-72.
56. Subdirección general de prestaciones y evaluación de tecnologías sanitarias. Dirección general de Aseguramiento y Planificación Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Consumo. Control serológico de infecciones de transmisión vertical en la mujer embarazada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994;12:204-12.
57. Grangeot-Keros L, Simon B, Audibert F, Vial M. Should we routinely screen for cytomegalovirus antibody during pregnancy? *Intervirology* 1998;41(4-5):158-62.

58. Hagay ZJ, Galya B, Ornoy A, reece EA. Congenital cytomegalovirus infection: a long-standing problem still seeking a solution. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:241-5.
59. Antsaklis AJ, Daskalakis GJ, Mesogitis SA, Koutra PT, Michalas SS. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infección. *BJOG* 2000;107:84-8.
60. Nigro G, Mazzocco M, Anceschi MM, La Torre R, Antonelli G, Cosmi EV. Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infección after primary of recurrent maternal infección. *Obstet Gynecol* 1999;94:909-14.
61. Bodéus M, Hubinont C, Goubau P. Increased risk of cytomegalovirus transmisión in utero during late gestation. *Obstet Gynecol* 1999;93:658-60.
62. Gaytant MA, Steegers EA, Semmekrot BA, Merkus HM, Galama JM. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv* 2002;57:45-56.
63. Hagay Z, Biran G, Ornoy A, Reece A. Congenital cytomegalovirus infección: a long-standing problem still seeking a solution. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:241-5.
64. Lipitz S, Yagel S, Shalev E, Achiron R, Mashiach S, Schiff E. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infección. *Obstet Gynecol* 1997;89:763-7.
65. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001;21:362-77.
66. Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infección. *J Clin Microbiol* 36:3540-4.
67. Revello MG, Baldanti F, Furione M, Sarasini E, Percivalle L. Polymerase chain reaction for prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1995;47:462-6.
68. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infección. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:476-82.
69. Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol* 2000;95:881-8.
70. Revello MG, Sarasini A, Zavattoni M, Baldanti F, Gerna G. Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection by a modified nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1998;56:99-103.
71. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol* 1999;37:3350-2.
72. Suresh B, Boppana SB, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:92-9.
73. Ville Y. The megalovirus (editorial). *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;12:151-3.
74. Mitchel DK, Holmes SJ, Burke RL, Duliege AM, ADLER sp. Immunogenicity of recombinant human cytomegalovirus gB vaccine in seronegative toddlers. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:133-8.