

Diagnóstico molecular de CMV congénito mediante la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) en muestra de hisopado oral de neonatos en Panamá.

Autores:

Lydie Nicole De Gracia Muñoz, Lourdes Cigarruista, Angel Pascual, Luis Sotillo Bent, Omar A. Espinosa D., José A. Cedeño.¹

¹. Instituto de Genética Médica y Genómica de la Caja de Seguro Social.

Correo electrónico: lynec4@gmail.com

Abstract

Background: Congenital cytomegalovirus (CMVc) infection constitutes one of the leading causes of hearing loss and neurodevelopmental delay during infancy. Identification of newborns with CMVc infection facilitates the provision of beneficial interventions. However, most neonates affected by CMVc infection present with a subclinical form of the disease and go undiagnosed. Therefore, it is increasingly recommended to perform expanded neonatal CMV testing. Saliva is presented as an attractive specimen type for newborn CMV testing, since it is easier to collect than urine and presents higher sensitivity for CMV detection than dried blood samples. **Methods:** We evaluated the Alethia CMV assay, an isothermal loop-mediated isothermal amplification method that is rapid and easy to use for the qualitative detection of CMV DNA in samples from neonatal saliva. Neonates less than one month old were tested using the Alethia assay according to the manufacturer's guidelines. Blood samples from the patients who tested positive in the qPCR test were also studied retrospectively. **Result:** a total of 200 prospectively collected saliva swabs, 40 (20%) patients tested positive in the Alethia assay, and only 14 could be tested confirmatory real-time PCR, where 9 of the 40 patients tested positive in both the Alethia assay and qPCR. Overall, the Alethia assay showed 99% positive and negative concordance, respectively, for the saliva sample. **Conclusion:** The Alethia CMV assay is an accurate method to identify neonates with CMVc infection and, given its simplicity, seems suitable for CMV testing.

Key words: Congenital cytomegalovirus infection (CMVc), CMV, neonates, saliva and qPCR.

Resumen

Antecedentes: La infección congénita por citomegalovirus (CMVc) constituye una de las principales causas de pérdida auditiva y de retraso en el desarrollo neurológico durante la infancia. La identificación de recién nacidos con infección por CMVc facilita la provisión de intervenciones beneficiosas. No obstante, la mayoría de los neonatos afectados por la infección por CMVc presentan una forma subclínica de la enfermedad y no son diagnosticados. Por consiguiente, se recomienda cada vez más llevar a cabo pruebas de detección ampliada de CMV en neonatos. La saliva se presenta como un tipo de muestra atractivo para las pruebas de CMV en recién nacidos, dado que es más fácil de recolectar que la orina y presenta mayor sensibilidad para la detección de CMV que las muestras de sangre seca. **Métodos:** Evaluamos el ensayo Alethia CMV, un método de amplificación isotérmica mediada por asa, que es rápido y fácil de usar para la detección cualitativa del ADN de CMV en muestras de saliva neonatal. Se analizaron neonatos menores de un mes utilizando el ensayo Alethia de acuerdo con las directrices del fabricante. Se estudiaron retrospectivamente las muestras de sangre de los pacientes que resultaron positivos en la prueba de qPCR. **Resultado:** un total de 200 hisopos de saliva recolectados de manera prospectiva, 40 (20%) pacientes resultaron positivos en el ensayo Alethia, y solo a 14 se les pudo realizar una prueba confirmatoria de PCR en tiempo real, donde 9 de los 40 pacientes resultaron positivos tanto en el ensayo Alethia como en la qPCR. En términos generales, el ensayo Alethia mostró un 99% de concordancia positiva y negativa, para la muestra de saliva. **Conclusión:** El ensayo Alethia CMV es un método preciso para identificar a neonatos con infección por CMVc y, dada su simplicidad, parece adecuado para la prueba de CMV.

Palabras claves: Infección congénita por citomegalovirus (CMVc), CMV, neonatos, saliva y qPCR.

Introducción

El citomegalovirus (CMV) es un virus perteneciente a la familia del herpes (Herpesviridae). Una vez que infecta a una persona, permanece en su cuerpo de por vida y puede reactivarse. Es muy común, que la mayoría de las personas infectadas sean asintomáticas o presenten una forma leve de la enfermedad. Esto puede provocar graves problemas en algunos grupos especialmente vulnerables: los recién nacidos infectados durante el embarazo (infección congénita que puede provocar sordera y consecuencias neurológicas) y pacientes con sistemas inmunitarios debilitados (inmunosuprimidos) ⁽¹⁾. El CMV congénito (CMVc) es el resultado de la transmisión materno-fetal durante el embarazo, que puede producirse a través de diversas vías como la placenta, el líquido amniótico o el canal del parto; también puede ocurrir por reactivación de una infección previa latente o por una reinfección (cepa viral distinta) en mujeres previamente inmunes ⁽²⁾.

Aproximadamente entre un 10-15 % de los recién nacidos con infección por CMV congénito presentan síntomas al nacer ⁽³⁾. Además, hasta un 15 % de los neonatos que inicialmente no presentan síntomas pueden mostrar efectos a largo plazo, como pérdida de audición neurosensorial o retrasos en el desarrollo neurológico durante la primera etapa de la infancia, como resultado del CMV congénito ⁽⁴⁾.

En relación a los datos epidemiológicos se sabe que la prevalencia poblacional es del 0.5-11.5 % y 0.5-13.8 % en América Latina y Asia respectivamente ⁽⁵⁾. En Estados Unidos, la incidencia de la infección congénita por CMV es de aproximadamente 20,000 a 30,000 neonatos infectados con CMVc cada año ⁽⁶⁾.

Específicamente en Panamá, la evidencia disponible refleja una seroprevalencia materna de 84% y una prevalencia de infección congénita sintomática de 0.8% según un estudio de 2007 ⁽⁷⁾. Posteriormente, una investigación del 2016 reportó una prevalencia de 5% en una cohorte de 256 neonatos, aunque se trataba de casos mayormente asintomáticos ⁽⁸⁾.

Debido a que la mayoría de los recién nacidos con infección por CMV son asintomáticos o tienen hallazgos leves e inespecíficos y que la infección por CMV puede causar daños importantes en el hígado o el cerebro, pérdida de audición y discapacidad intelectual este estudio tiene como objetivo determinar la prevalencia de CMV congénito en muestras de hisopado bucal de neonatos seleccionados bajo criterio médico en el Hospital de la ciudad de Panamá.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal en neonatos seleccionados por criterio clínico en el complejo hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Panamá, que cumplieron con los criterios de inclusión.

El estudio fue evaluado, aprobado y registrado por el Comité de Bioética en Investigación de The Panamá Clinic. El número de exención de la revisión ética fue el CA-CBI-TPC-037 y el código de estudio de aprobación de DENADOI fue DENADOI-SIBI-001-2023.

Pacientes

Se incluyeron neonatos nacidos en el Hospital Irma De Lourdes Tzanetatos con sospecha de CMV congénito y pacientes con consentimiento informado para realizar la prueba de CMV.

Se excluyeron pacientes mayores de un mes de edad al momento en que se le tomaba la muestra y aquellos con expedientes incompletos que impedían el análisis de las variables requeridas, y de neonatos asintomáticos sin evidencia de sospecha de infección por CMV.

Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

La detección de ADN de CMV en saliva se realizó mediante la prueba Alethia CMV (Meridian Bioscience), basada en amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), siguiendo las instrucciones del fabricante (Alethia CMV Product Insert, Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA) ⁽⁹⁾. Cada conjunto de muestras fue procesado utilizando controles externos conforme a las directrices del fabricante. ⁽⁹⁾.

Aislamiento de ADN y detección del CMV en PCR en tiempo real (qPCR).

El ADN fue extraído de sangre total anticoagulada con EDTA utilizando el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit automatizado en el sistema QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemania), según el protocolo del fabricante. Posteriormente, se realizó la detección del CMV mediante PCR en tiempo real utilizando el kit artus CMV RG PCR Kit (Qiagen) en el sistema Rotor-Gene Q (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante ⁽¹⁰⁾. Este ensayo amplifica una región de 105 pb del gen MIE del CMV e incluye un control interno. Presenta una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 84,8 %, con un límite de detección de 57,1 copias/ml. ⁽¹⁰⁾.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo. Se calcularon la media o mediana con su medida de dispersión para las variables cuantitativas, y las frecuencias absolutas y relativas para las variables cuantitativas.

Para determinar la relación entre la procedencia y el diagnóstico positivo en la prueba ALETHIA, se utilizó la prueba exacta de Fisher. El tamaño del efecto se evaluó con la V de Cramer, que es una medida del tamaño del efecto para pruebas de independencia. La correlación se analizó en el programa R.

Resultados

El estudio examinó 200 muestras de neonatos mediante el ensayo ALETHIA CMV, de las cuales 85 eran del sexo femenino (42.5 %) ($p=0.7206$). Todos fueron seleccionados según criterios clínicos médicos establecidos para la detección de CMVc. De las 200 muestras estudiadas 40 (20 %) resultaron positivas para CMV por el método ALETHIA CMV; solo 14 casos, 9 (56.3 %), fueron positivos tanto en Alethia como en la qPCR.

Características según semanas de edad gestacional.

Se categorizaron las semanas de gestación según su pretérmino: pretérmino extremo de 23-27 semanas, prematuros de 29-32 semanas, pretérmino tardío de 33-37 semanas y neonatos a término de 38-41 semanas. Observándose la proporción de casos positivos para CMVc en el grupo de nacidos a término, con 28/40 pacientes ($p=0.0473$).

Características según distribución demográfica.

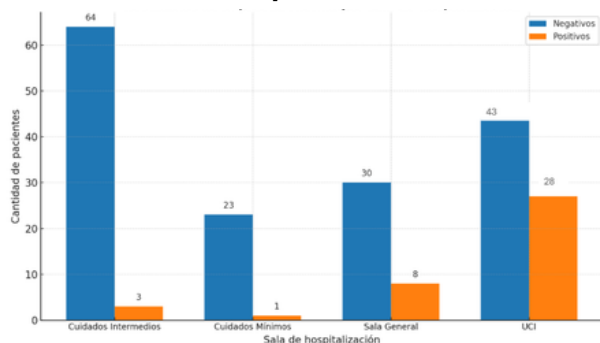
La mayoría de los casos positivos se registraron en pacientes provenientes de la provincia de Panamá ($n = 32$; 80 %), seguida por los distritos de San Miguelito y Arraiján, con 3 casos cada uno (7.5 %), y finalmente La Chorrera y la provincia de Coclé, con un caso cada una (2.5 %). Esta distribución geográfica está en concordancia con la ubicación del Hospital Irma de Lourdes Tzanetatos, entro donde se llevó a cabo el estudio, situado en la ciudad de Panamá.

Clasificación según sala de procedencia

El análisis según sala de procedencia neonatal evidenció que una alta proporción de los pacientes estudiados fueron de UCI, correspondiendo al 71/200 neonatos (35.5 %) de los cuales 28 resultaron positivo a través de la prueba ALETHIA CMV ($p < 0.0001$) (V de Cramer= 0.377, $p=0.001$), los pacientes en UCI tienen una probabilidad del 67,5 % de dar positivo en la prueba ALETHIA. **Ver figura N°1.**

Figura N°1. Salas de procedencia de los neonatos según resultados positivos y negativos para la prueba de ALETHIA CMV.

Resultados de la prueba Alethia para la sala de Hospitalización.



Valores expresados como n (%) y $*p < 0.01$.

Discusión

En este estudio, se encontró una prevalencia de infección por CMV congénito del 20 % (40/200) en un cohorte de neonatos seleccionados bajo criterios clínicos médicos definidos, evaluados mediante la prueba Alethia CMV a partir de muestras de saliva. Esta cifra supera ampliamente la prevalencia previa reportada en Colombia, donde se registró un 5% (13/256 neonatos).

Otros estudios en Colombia muestran que la prevalencia de CMV congénito (CMVc) varió entre 1.6% en las ciudades de Valle y Barranquilla, basada en análisis de orina realizados en 657 neonatos durante sus primeras tres semanas de vida ^(8,11). En un estudio realizado en México, la prevalencia reportada fue del 0.68% ⁽¹²⁾.

Por otra parte, en Ecuador, la incidencia de infección por CMVc alcanza el 37.2%, y se estima una seroprevalencia en mujeres gestantes que oscila entre 5 y 20 casos por cada 1000 nacimientos ⁽¹³⁾.

Del total de 40 casos positivos en saliva por Alethia, solo 14 pudieron ser analizados mediante la técnica confirmatoria de qPCR en muestras de sangre. Es importante señalar que, aunque la sangre es frecuentemente utilizada para la detección de CMV, su sensibilidad es menor que la de saliva y orina en casos asintomáticos o leves debido a la baja carga viral, como ha sido documentado por ⁽¹⁴⁾, quienes encontraron que solo el 15 % de los casos positivos en saliva tenían carga detectable en sangre. Cabe aclarar que no se realizó confirmación en orina mediante qPCR, a pesar de que orina es considerada muestra (gold standard) para el diagnóstico de CMVc en neonatos. Esto se debió a las dificultades prácticas para la recolección de orina en recién nacidos, que requieren estrictas condiciones de higiene y manipulación para evitar contaminación. En ese sentido, un estudio reciente que evaluó el desempeño del ensayo Alethia CMV en 1480 recién nacidos menores de 21 días mostró una concordancia del 100 % con un método de referencia compuesto (CRM, dos ensayos de PCR validados y secuenciación de amplicones) para muestras positivas, y una concordancia del 99.8 % para muestras negativas. Además, los 34 hisopos archivados de casos conocidos con CMVc fueron todos positivos por Alethia y por CRM ⁽¹⁸⁾.

En nuestro estudio, la proporción más significativa de casos positivos para CMVc se encontró en neonatos a término (28/40), sugiriendo que la transmisión podría haber ocurrido predominantemente en etapas tardías de la gestación es coherente con literatura previa que señala una mayor transmisión del CMV en el tercer trimestre del embarazo ^(15,16).

Sin embargo, se reconoce que la transmisión puede ocurrir en cualquier etapa de la gestación, y que la infección primaria durante el embarazo conlleva un riesgo de transmisión vertical de hasta el 30–35 % ⁽¹⁶⁾. La alta proporción de pacientes positivos provenientes de la UCI (67.5 %) de los positivos refuerza la necesidad de fortalecer estrategias de detección en poblaciones neonatales vulnerables. Estos pacientes tienen mayor riesgo de complicaciones graves asociadas a CMVc, como hipoacusia, retraso del desarrollo o alteraciones neurológicas ⁽¹⁷⁾.

Sin embargo, en nuestro estudio no fue posible realizar un análisis más amplio para detectar posibles falsos negativos ni calcular sensibilidad o especificidad, ya que no se aplicó la prueba confirmatoria en toda la cohorte. Las limitaciones logísticas para localizar a los neonatos y el procesamiento molecular impidieron obtener confirmación para la mayoría de los casos positivos por Alethia, así como también para los casos negativos clínicamente sospechosos. Esta ausencia de confirmación general limita la capacidad de comparación directa entre las dos metodologías. A pesar de estas limitaciones, los hallazgos sugieren que la prueba Alethia logró identificar casos positivos entre neonatos con sospecha clínica en los neonatos nacidos en la ciudad de Panamá. Se recomienda en estudios futuros garantizar la recolección de muestras de orina o saliva para qPCR, lo cual permitiría una validación más robusta frente al estándar de oro y una mejor comparación entre métodos.

Conclusión

La prevalencia de CMVc en la ciudad de Panamá es de un 20%. Según la tecnología LAMP de Alethia y la aplicación de criterios médicos se ha revelado una prevalencia mucho mayor de CMVc en comparación a otras regiones reportadas.

Agradecimientos

Agradecimiento a Servilab S.A., por el aporte de los kits de la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) Alethia. También se agradece al laboratorio al Instituto de Genética y Genómica y la Caja de Seguro Social por su apoyo técnico en las mediciones de las pruebas realizadas.

Contribuciones de los autores

Lydier De Gracia, Estandarización de la prueba, Conceptualización, análisis de datos, redacción del manuscrito, corrección y escritura de manuscrito. Lourdes Cigarruista, Conceptualización y construcción del protocolo de investigación, análisis de datos, redacción de manuscrito. Ángel Pascual, Conceptualización y construcción del protocolo de investigación, análisis de datos, redacción del manuscrito. Luis Sotillo, Revisión y corrección del protocolo. Omar Espinosa, revisión, corrección y escritura de manuscrito. José Cedeño, revisión, corrección y escritura de manuscrito.

Conflicto de intereses/ Reconocimiento

Los autores declaran haber participado en el diseño, ejecución y análisis del artículo y han aprobado la versión final del manuscrito. No existen conflictos de intereses en relación con este artículo, y el material descrito no está bajo publicación ni consideración para publicación en ningún otro lugar.

El trabajo de investigación se presentó como parte de los requisitos para optar por la Licenciatura de Tecnología Médica de la Universidad de Panamá 2024.

Disponibilidad de datos

Todos los datos que respaldan los hallazgos de este estudio están disponibles en el artículo. Información adicional puede ser solicitada al autor correspondiente mediante una solicitud razonable.

Referencias

- 1.Kaye, K. M. (2021). Infección por citomegalovirus (CMV). MSD Manual. <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-por-el-virusdel-herpes/infeccionC3%B3n-por-citomegalovirus-cmv>
- 2.Revello, M. G., & Gerna, G. (2002). Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 680–715. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.680-715.2002>
- 3.Thigpen, J. (2020). Congenital cytomegalovirus—History, current practice, and future opportunities. *Neonatal Network*, 39(5), 293–297. <https://doi.org/10.1891/0730-0832.39.5.293>
- 4.Alba de Juan Gallach, M. A. (2020). Secuelas neurológicas en pacientes con infección congénita por citomegalovirus. *Anales de Pediatría*, 93(2), 111–117.
- 5.Barton, M. A., & Canadian Paediatric Society Infectious Diseases and Immunization Committee. (2020). Update on congenital cytomegalovirus infection: Prenatal prevention, newborn diagnosis, and management. *Paediatrics & Child Health*, 25(6), 395–402. <https://doi.org/10.1093/pch/pxaa083>
- 6.Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022). Bebés nacidos con citomegalovirus (CMV) congénito. Sin embargo, se reconoce que la transmisión puede ocurrir en cualquier etapa de la gestación, y que la infección primaria durante el embarazo conlleva un riesgo de transmisión vertical de hasta el 30–35 % ⁽¹⁶⁾.
- 7.Estripeaut, D., Moyo-Lorenzo, Y., Rodríguez, D., & De la Guardia, D. (2007). Seroprevalencia de la infección por citomegalovirus en púerperas y su impacto neonatal. *Anales de Pediatría*, 66(2), 135–139. <https://doi.org/10.1157/13098930>
- 8.Vergara, Y. (2016). Prevalencia de la infección congénita por citomegalovirus en recién nacidos del Servicio de Neonatología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo A. Madrid [Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá].
- 9.Meridian Bioscience. (2019). Alethia CMV: Soporte y documentos. Sin embargo, se reconoce que la transmisión puede ocurrir en cualquier etapa de la gestación, y que la infección primaria durante el embarazo conlleva un riesgo de transmisión vertical de hasta el 30–35 % ⁽¹⁶⁾.
- 10.Harishankar, A., Chandy, M., & Bhattacharya, S. (2015). How to develop an in-house real-time quantitative cytomegalovirus polymerase chain reaction: Insights from a cancer centre in eastern India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(4), 482–490.
- 11.Tong, V. T.-D., Romero, R., Vega, C. C., López, C. M., & Zarante, I. (2019). Prevalence of congenital CMV infection in Colombia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 221(6), 685–686.
- 12.Noyola, D. E., Sánchez-Vargas, P. G., & González-Serrano, M. E. (2011). Infección congénita por citomegalovirus en recién nacidos del estado de San Luis Potosí, México. *Salud Pública de México*, 53(2), 125–130
- 13.Merchán, A., & Paredes Guaranda, J. A. (2023). Infección por citomegalovirus en el embarazo: Factores de riesgo, diagnóstico y prevención. Universidad Estatal del Sur de Manabí. <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/4872/1/Alejandro%20Merch.pdf>
- 14.Fuentes, T., & Martínez, E. S. (2016). Tamizaje de citomegalovirus mediante la técnica de PCR en tiempo real en muestras de saliva de neonatos nacidos en el Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid. Sección de Genética, Área de Laboratorio Clínico, Caja de Seguro Social. *Boletín Científico*, 4(6).
- 15.Bustamante-Amador, J. M., Sánchez-García, L., Fernández-Cruz, C., Pérez-García, G., & Gutiérrez-Rodríguez, J. (2022). La infección congénita por citomegalovirus, ¿es más prevalente en nuestro medio en neonatos expuestos al VIH? *Revista Española de Quimioterapia*, 35(5), 482–488.
- 16.Figueras Aloy, J., & Botet Mussons, F. (2012). Infecciones por citomegalovirus en el periodo neonatal. *Anales de Pediatría Continuada*, 10(6), 305–312.
- 17.Vos, B. N., Flynn, R., De Clercq, C., Dhooge, I., & Govaerts, P. J. (2021). Cytomegalovirus—A risk factor for childhood hearing loss: A systematic review. *Ear and Hearing*, 42(6), 1447–1461. <https://doi.org/10.1097/aud.0000000000001055>
- 18.Gantt, S., González, D., & Sánchez, P. J. (2020). Performance of the Alethia CMV assay for detection of cytomegalovirus by use of neonatal saliva swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(7), e00329-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00329-20>