



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

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

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

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

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

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

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de junio de 2013
Aceptado el 27 de septiembre de 2013
On-line el xxx

Palabras clave:

Enfermedades y anomalías congénitas, hereditarias y neonatales
Infección por citomegalovirus
Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
ADN viral
Gota de sangre seca
Cribado neonatal

Keywords:

Congenital, hereditary, and neonatal diseases and abnormalities
Cytomegalovirus infection
Real-time polymerase chain reaction
Viral DNA
Dried blood spot testing
Neonatal screening

R E S U M E N

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

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

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

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

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

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

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

A B S T R A C T

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

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

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

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

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

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

* Autora para correspondencia.

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

Introducción

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

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

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

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

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

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

Métodos

Pacientes

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

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

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

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

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

Muestras y procedimientos

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

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

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

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

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

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

Estudio estadístico

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

Tabla 1
Características demográficas y epidemiológicas de los pacientes

| Paciente | Sexo | Seroconversión materna durante la gestación | Motivo de realización del cribado | Edad al diagnóstico (días) | Síntomas al nacimiento | CMV en orina | Carga viral CMV sangre (copias/ml) | Alteraciones durante el seguimiento | PCR en la muestra del talón |
|----------|-----------|---|-----------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | Femenino | ND | RCIU | 5 | RCIU | Pos | 499 | No | Negativa |
| 2 | Masculino | 1. ^{er} trimestre | Seroconversión materna | 1 | No | Pos | Neg | No | Negativa |
| 3 | Masculino | 3. ^{er} trimestre | Seroconversión materna | 6 | No | Pos | 3.006 | No | Negativa |
| 4 | Masculino | 3. ^{er} trimestre | Seroconversión materna | 1 | No | Pos | 760 | No | Negativa |
| 5 | Masculino | ND | RCIU | 5 | RCIU | Pos | Neg | No | Negativa |
| 6 | Masculino | ND | Hijo de madre infectada por VIH | 1 | No | Pos | Neg | No | Negativa |
| 7 | Femenino | ND | RCIU | 3 | RCIU | Pos | Neg | Hipoacusia | Negativa |
| 8 | Femenino | 2. ^o trimestre | Seroconversión materna | 2 | No | Pos | 2.017 | No | Positiva |
| 9 | Masculino | 2-3. ^{er} trimestre | Seroconversión materna | 1 | No | Pos | 500 | No | Positiva |
| 10 | Masculino | 1. ^{er} trimestre | Seroconversión materna | 1 | No | Pos | 20.500 | Hipoacusia | Positiva |
| 11 | Masculino | ND | Hijo de madre infectada por VIH | 4 | No | Pos | 6.390 | No | Positiva |
| 12 | Masculino | ND | Prematuridad | 9 | No | Pos | 11.420 | No | Positiva |
| 13 | Masculino | ND | Oligoamnios | 4 | No | Pos | 42.500 | Hipoacusia | Positiva |
| 14 | Femenino | ND | RCIU | 8 | RCIU | Pos | 1.800 | Hipoacusia | Positiva |

ND: no disponible; Neg: negativo; Pos: positivo; RCIU: retraso de crecimiento intrauterino; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Fisher, útil en muestras pequeñas. La significación estadística se ha considerado para $p < 0,05$.

Valoración por el Comité Ético de Investigación

Se obtuvo la aprobación del Comité Ético del Hospital, con resolución favorable del 29/06/2012.

Resultados

Entre enero de 2007 y septiembre de 2012 se registraron en nuestro centro un total de 21.922 nacimientos y se diagnosticaron 16 casos de infección congénita por CMV, de los cuales 5 habían nacido en otros centros. En 2 de ellos no se pudo recuperar la muestra del talón por lo que finalmente se procesaron y estudiaron 14 muestras. De los 14 casos, 8 eran de sexo masculino. La mediana de edad de los pacientes estudiados es, en el momento de realizar este estudio, de 2,8 años. La mediana de edad gestacional se sitúa en las 37 semanas. En el momento del nacimiento, 4 de los pacientes se encontraban sintomáticos, siendo la única sintomatología en todos ellos retraso de crecimiento intrauterino. A lo largo de la evolución 4 pacientes han desarrollado hipoacusia neurosensorial. Ninguno presenta deterioro grave del neurodesarrollo. Las características demográficas y epidemiológicas de los pacientes estudiados se recogen en la *tabla 1*.

El diagnóstico molecular en la prueba del talón detectó presencia de CMV en 7 de las 14 muestras, lo cual supone una sensibilidad del test en dicho tipo de muestra del 50%.

La *tabla 2* recoge la relación del resultado de la PCR en la prueba del talón con las variables clínicas estudiadas. Tan solo se halló una relación estadísticamente significativa entre la negatividad de la prueba y cargas virales más bajas al nacimiento.

Discusión

A pesar de considerarse la infección congénita más frecuente en los países desarrollados, en España no se realiza cribado serológico

Tabla 2

Análisis de las variables clínicas potencialmente asociadas con el resultado de la prueba

| Variable | p |
|---|--------------|
| Años transcurridos entre el nacimiento y la realización de la PCR | 0,318 |
| Edad gestacional | 1 |
| Síntomas al nacimiento | 0,559 |
| Desarrollo de hipoacusia | 0,559 |
| Carga viral | 0,005 |

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

En negrita, la variable estadísticamente significativa.

en la embarazada por lo que es relativamente frecuente que se obvie el diagnóstico de CMV especialmente en el neonato asintomático, ya que a menudo las secuelas aparecen a largo plazo. Cuando se sospecha una infección congénita por CMV en un paciente que supera los 15 días de edad puede resultar difícil la conclusión diagnóstica, por lo que el análisis por PCR de la muestra de sangre seca excedente del Programa de Cribado Neonatal puede ser de extrema utilidad. Si la detección de ADN viral para CMV en esa muestra es negativa, en la actualidad deducimos que la adquisición del virus es posnatal, asumiendo una elevada sensibilidad de la técnica. A pesar de que varios trabajos europeos^{5,6} hablan de sensibilidades entre el 71 y el 100%, en nuestro trabajo únicamente obtuvimos resultado positivo en 7 de los 14 pacientes, sensibilidad claramente inferior (50%) al resto y tan solo comparable al estudio de Boppana et al. en 2010⁸ que muestra una sensibilidad del 34%. Este estudio compara la sensibilidad de 2 técnicas de PCR en sangre seca en pacientes con CMV confirmado con la sensibilidad de la detección de antígeno en una muestra de saliva, y demuestra que la sensibilidad de la PCR en sangre seca era significativamente menor.

De todos estos trabajos puede intuirse que los resultados dependen del tipo de técnica utilizada¹⁹ y de su posibilidad de detección de diferentes umbrales de viremia, y debe conocerse cuál es la sensibilidad de la técnica propia para valorar adecuadamente los resultados obtenidos.

Además de la técnica utilizada, otra posible explicación a la negatividad de la PCR en sangre seca, como se refiere de nuevo en el trabajo de Boppana et al.⁸, es el volumen de la muestra analizada. En nuestro laboratorio se han usado 110 µl de suero para la realización de la carga viral en sangre fresca. Al usar 2 círculos del cartón de la prueba del talón estamos usando 25 µl de suero, que es una cantidad claramente inferior. Es lógico pensar, por tanto, que cargas virales más bajas en sangre sean detectadas con la PCR en sangre fresca y no con la PCR en sangre seca del talón.

En nuestro caso, 4 de los 7 pacientes en los cuales la PCR en sangre seca es negativa presentaban cargas virales negativas al nacimiento.

En un estudio de Limaye et al.²⁰ publicado en 2013 se muestra una aceptable correlación entre las cargas virales en sangre fresca y en sangre seca en papel absorbente en una población de pacientes trasplantados. Pese a ser una población muy distinta a la de nuestro trabajo, sus resultados pueden ayudar a entender los falsos negativos de nuestro estudio. En su trabajo, 26 de los 106 pares de muestras (sangre fresca/sangre seca) eran negativos en la PCR en sangre seca pero positivos en la sangre fresca (23,6% de falsos negativos). La viremia en estos pacientes era menor en esos casos, con una media de 320 copias/ml frente a la media de todas las muestras, que fue 4.060 copias/ml. Se establece un punto de corte de viremia en 2.700 copias/ml en plasma, a partir del cual la sensibilidad de la prueba en sangre seca es superior al 95%.

Estos 2 últimos puntos son de especial importancia, ya que la carga viral es un parámetro dinámico y no se correlaciona con la gravedad de las manifestaciones clínicas. Por tanto, pacientes con carga viral baja y que en nuestra prueba resultarían negativos, pueden desarrollar sordera neurosensorial progresiva. Así, en un paciente con sordera neurosensorial progresiva y PCR en la prueba del talón negativa no podemos descartar de forma definitiva que se trate de una infección congénita por CMV y deberemos valorar individualmente la indicación del tratamiento antiviral.

En nuestro estudio se ha descartado la posibilidad de que el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y la realización de la PCR desempeñe un papel en la falsa negatividad del resultado por lo que, en principio, se puede utilizar a cualquier edad del paciente. Como se ha comentado, no hemos hallado otros factores clínicos relacionados con estos falsos negativos de la prueba.

Como conclusión, parece que la determinación de presencia viral en la sangre seca de la prueba del talón es una prueba que, si resulta positiva, nos puede ayudar a diagnosticar retrospectivamente a pacientes con CMV, pero no es concluyente si es negativa, por lo que muchas veces el diagnóstico de CMV no se podrá confirmar.

Por ello, parece necesario disponer de una técnica validada y sensible para uso en los laboratorios de nuestro país, y el conocimiento de los clínicos que solicitan la prueba de la sensibilidad de la misma para interpretar correctamente los resultados.

De confirmarse estos resultados en un estudio que incluyera un número significativamente mayor de pacientes, la utilización de la muestra de sangre seca debería considerarse subóptima para realizar cribados poblacionales mediante las técnicas actuales.

Por todo ello, este trabajo abre las puertas a realizar otros estudios similares multicéntricos para la adecuada interpretación de la PCR a tiempo real en la sangre seca del talón en nuestra población.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Baquero-Artigao Y, Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71:535-47.
2. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol*. 2007;17:353-63.
3. Rosenthal LS, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF, Schmid DS, et al. Cytomegalovirus shedding and delayed sensorineural hearing loss: Results from longitudinal follow-up of children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:515-20.
4. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels AG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med*. 2011;364:2111-8.
5. Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. *Rev Med Virol*. 2006;16:385-92.
6. Lereuz-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, Parat S, Castel C, Avettand-Fenoel V, et al. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect Dis*. 2011;52:575-81.
7. Kharrazi M, Hyde T, Young S, Amin MM, Cannon MJ, Dollard SC. Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2010;157:191-7.
8. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan Jr RW, Palmer AL, et al. National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CMV and Hearing Multicenter Screening (CHIMES) Study. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA*. 2010;303:1375-82.
9. Choi KY, Schimmenti LA, Jurek AM, Sharon B, Daly K, Khan C, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in dried blood spots of Minnesota infants who do not pass newborn hearing screening. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:1095-8.
10. De Vries JJ, Claas EC, Kroes AC, Vossen AC. Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2009;46:S37-42.
11. Boudewyns A, Declau F, Smets K, Ursi D, Eyskens F, van den Ende J, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: Role in the diagnostic work-up of childhood hearing loss. *Otol Neurotol*. 2009;30:943-9.
12. Atkinson C, Walter S, Sharland M, Tookey P, Luck S, Peckham C, et al. Use of stored dried blood spots for retrospective diagnosis of congenital CMV. *J Med Virol*. 2009;81:1394-8.
13. Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, Dubreuil P, de Saeger B, Grangeot-Keros L, et al. Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46:943-6.
14. Barbi M, MacKay WG, Binda S, van Loon AM. External quality assessment of cytomegalovirus DNA detection on dried blood spots. *BMC Microbiol*. 2008;8:2.
15. Vauloup-Fellous C, Ducroux A, Couloigner V, Marlin S, Picone O, Galimand J, et al. Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: Retrospective study of CMV congenital infection. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3804-6.
16. Yamagishi Y, Miyagawa H, Wada K, Matsumoto S, Arahori H, Tamura A, et al. CMV DNA detection in dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection in Japan. *J Med Virol*. 2006;78:923-5.
17. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V, Didò P, Guidotti P, et al. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: Study on dried blood spots of congenitally infected babies. *J Clin Virol*. 2001;21:75-9.
18. Snijdewind IJ, van Kampen JJ, Fraaij PL, van der Ende ME, Osterhaus AD, Gruters RA. Current future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Res*. 2012;93:309-21.
19. Göhring K, Dietz K, Hartleif S, Jahn G, Hamprecht K. Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards. *J Clin Virol*. 2010;48:278-81.
20. Limaye AP, Santo Hayes TK, Huang ML, Magaret A, Boeckh M, Jerome KR. Quantitation of cytomegalovirus DNA load in dried blood spots correlates well with plasma viral load. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2360-4.