

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Papel de la Respuesta Celular T Materna y Neonatal en la
Infección Congénita por Citomegalovirus e impacto de otros
marcadores pronósticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Soriano Ramos

DIRIGIDA POR

Daniel Blázquez Gamero

Madrid

© María Soriano Ramos, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA RESPUESTA CELULAR T MATERNA Y NEONATAL EN LA
INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS E IMPACTO DE
OTROS MARCADORES PRONÓSTICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR

María Soriano Ramos

DIRECTOR

Daniel Blázquez Gamero

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA RESPUESTA CELULAR T MATERNA Y NEONATAL EN LA
INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS E IMPACTO DE
OTROS MARCADORES PRONÓSTICOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR**

María Soriano Ramos

DIRECTOR

Daniel Blázquez Gamero

Agradecimientos

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas las personas que de algún modo han hecho posible que esta Tesis Doctoral vea la luz, y que me han ayudado en alguno de los múltiples pasos que hemos tenido que dar hasta poder finalizarla, pues es el fruto de muchos años de esfuerzo y dedicación.

En primer lugar, gracias al Dr. Daniel Blázquez Gamero, director de esta Tesis Doctoral, por confiar en mí desde el principio para implicarme en el estudio de la infección congénita por citomegalovirus, por proponerme hacer la tesis y por darme ánimos y apoyo en todos los momentos. Gracias por compartir tu inmensa sabiduría, experiencia clínica y tu carácter docente, y por todo el esfuerzo y tiempo invertidos.

Al Dr. Andrés Bodas Pinedo por estar siempre presente como tutor durante los años de realización de esta Tesis Doctoral y por su colaboración y apoyo.

A todos los investigadores que son parte del Registro Estatal de Infección Congénita por Citomegalovirus (REDICCMV), por toda su labor, su participación altruista y su implicación. Gracias a los coautores de las publicaciones incluidas en esta Tesis Doctoral, por vuestro trabajo impecable, por compartir vuestros conocimientos y enseñarme lo bonito que puede ser trabajar en equipo.

A Roberto Pedrero, Estrella Esquivel y Sara Domínguez, que han trabajado intensamente en el análisis estadístico de los resultados de los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral, gracias por todas las dudas resueltas y por estar siempre disponibles para ayudar.

A Jesús Rodríguez y Noelia Ureta, por ser compañeros de Doctorado durante estos años, gracias por vuestra ayuda, amistad e inmenso cariño.

A todas las gestantes y a los niños que han participado en los estudios incluidos y a sus padres, por facilitarnos la oportunidad de hacer ciencia y seguir aprendiendo cada día.

A mis padres, Antonio y M^a Carmen, por regalarme la vida, por quererme siempre y por vuestro cariño infinito. Gracias por guiarme, acompañarme y apoyarme en todos los momentos de la vida. Por estar siempre ahí. Por enseñarme a luchar por mis sueños y mostrarme el valor del esfuerzo, porque “con nosotros no pueden”. A mi hermano David, por tu bondad innata, tu paciencia y serenidad, y por ser el mejor tío y el mejor místico. Porque sin ti no habríamos conseguido nada de lo que hoy tenemos y vivimos.

Y finalmente, gracias a Marcos, por quererme tal y como soy, con mis virtudes y mis defectos, por apoyarme siempre y enamorarme cada día de tu alegría y tu sentido del humor. Y por supuesto a mi princesa, Diana, que llenas de luz y felicidad cada segundo de nuestras vidas.

Dedicatoria

A mis padres y a David

A Marcos y a Diana

Indice

Índice

Agradecimientos	1
Índice	7
Listado de publicaciones	13
Abreviaturas.....	17
Índice de figuras y tablas.....	23
Figuras	25
Tablas	25
Resumen	27
I. Introducción	37
1. Agente causal	38
2. Epidemiología.....	41
3. Patogenia e inmunología de la infección congénita	45
3.1. Patogenia.....	45
3.1.1. Sistema nervioso central	45
3.1.2. Oído	46
3.1.3. Placenta.....	47
3.1.4. Otros órganos.....	47
3.2. Inmunología	48
3.2.1 Inmunidad innata	48
3.2.2 Inmunidad adaptativa	50
4. Infección por CMV en la gestante y en el feto	54
4.1. Diagnóstico de la infección en la gestante	54
4.2. Diagnóstico de la infección fetal	55
4.3. Tratamiento prenatal	58
4.3.1. Prevención primaria	58
4.3.2. Prevención secundaria	59
5. Infección por CMV en el recién nacido	61
5.1. Definición y diagnóstico	61
5.2. Clínica	62
5.2.1. Cribado CMVc.....	62
5.2.2. Hipoacusia neurosensorial y disfunción vestibular asociada a CMVc.....	62
5.2.3. Definición de CMVc sintomático y asintomático	63
5.3. Neuroimagen.....	65

5.4. Tratamiento.....	67
6. Factores pronósticos de secuelas.....	69
6.1. Edad gestacional en el momento de la infección.....	69
6.2. Clínica al nacimiento	70
6.3. Otros marcadores pronósticos.....	72
6.3.1. Pruebas de neuroimagen	72
6.3.2. Carga viral.....	73
6.3.3. Tratamiento antiviral.....	73
II. Justificación.....	75
III. Hipótesis y objetivos.....	77
1. Hipótesis.....	79
2. Objetivos	81
2.1. Objetivo primario	81
2.2. Objetivos secundarios	81
IV. Material, métodos y resultados.....	83
1. Artículo primero. The role of the T-cell mediated immune response to Cytomegalovirus infection in intrauterine transmission. Soriano-Ramos M, Esquivel-De la Fuente E, Albert Vicent E, de la Calle M, Baquero-Artigao F, Domínguez-Rodríguez S, et al; and CYTRIC Study Group. PLoS One. 2023;18(2):e0281341.....	85
2. Artículo segundo. T-Cell Immune Responses in Newborns and Long-Term Sequelae in Congenital Cytomegalovirus Infection (CYTRIC Study). Soriano-Ramos M, Pedrero-Tomé R, Giménez-Quiles E, Albert E, Baquero-Artigao F, Rodríguez-Molino P, et al; and CYTRIC Study Group. J Pediatr. 2024;272:114084.	103
3. Artículo tercero. Role of Magnetic Resonance Imaging and Cranial Ultrasonography in Congenital Cytomegalovirus Infection. Blázquez-Gamero D*, Soriano-Ramos M*, Martínez de Aragón A, Baquero-Artigao F, Frick MA, Noguera-Julian A, et al; Spanish Registry of Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection (REDICCMV) Study Group. Pediatr Infect Dis J. 2019;38(11):1131-1137.	115
V. Discusión integradora.....	125
1. Papel de la respuesta celular T en la infección gestacional por citomegalovirus y su relación con la transmisión intrauterina	127
1.1. Importancia de la respuesta celular en el control de la infección por CMV.	127
1.2. Edad gestacional y carga viral en sangre, orina y líquido amniótico como marcadores pronósticos.....	130
1.2.1. Edad gestacional.....	130
1.2.2. Carga viral en sangre y orina	130
1.2.3. Carga viral en líquido amniótico.....	131
1.2.4. Otros factores pronósticos.....	134

2. Correlación de la respuesta inmune celular T con las secuelas a largo plazo en la infección congénita por citomegalovirus.....	135
2.1. Particularidades de la respuesta celular contra CMV en el niño.	135
2.2. Factores pronósticos de secuelas a largo plazo.	138
2.2.1. CMVc sintomático	138
2.2.2. CMVc asintomático y la importancia del cribado neonatal de CMVc.....	139
2.2.3. Carga viral en sangre y orina	142
3. Papel de la resonancia magnética y ecografía cerebral en la infección congénita por citomegalovirus. Factores pronósticos de secuelas.....	143
3.1. Definición de CMVc sintomático vs asintomático.....	143
3.2. Importancia y papel de la RM	147
3.3. Valor pronóstico de la vasculopatía lenticuloestriada	148
VI. Conclusiones	151
VII. Bibliografía.....	155
VIII. Anexos	179
Anexo 1: Otros artículos publicados relacionados con la temática de esta tesis doctoral en los que ha colaborado la autora.....	181
1. Artículo: Prevalence and clinical manifestations of congenital cytomegalovirus infection in a screening program in Madrid (PICCSA Study). Blázquez-Gamero D, Soriano-Ramos M, Vicente M, Pallás-Alonso CR, Pérez-Rivilla A, García-Álvarez M, et al; PICCSA Study Group. <i>Pediatr Infect Dis J.</i> 2020;39(11):1050-6.	183
2. Artículo: Prevention and treatment of fetal cytomegalovirus infection with cytomegalovirus hyperimmune globulin: a multicenter study in Madrid. Blázquez-Gamero D, Galindo Izquierdo A, Del Rosal T, Baquero-Artigao F, Izquierdo Méndez N, Soriano-Ramos M, et al. <i>J Matern Fetal Neonatal Med.</i> 2019;32(4):617-25.	193
Anexo 2: Informe del Comité Ético de Investigación Clínica del proyecto de investigación en salud FIS PI16/00807 de Hospital 12 de Octubre.....	205
Anexo 3: Consentimiento informado del proyecto de investigación en salud FIS PI16/00807.	209

Listado de publicaciones

Listado de publicaciones

Esta tesis doctoral se presenta como un compendio de las siguientes publicaciones:

- I. Soriano-Ramos M, Esquivel-De la Fuente E, Albert Vicent E, De la Calle M, Baquero-Artigao F, Domínguez-Rodríguez S, Cabanes M, Gómez-Montes E, Goncé A, Valdés-Bango M, Viñuela-Benéitez MC, Muñoz-Chápuli Gutiérrez M, Saavedra-Lozano J, Cuadrado Pérez I, Encinas B, Castells Vilella L, De la Serna Martínez M, Tagarro A, Rodríguez-Molino P, Giménez Quiles E, García Alcázar D, García Burguillo A, Folgueira MD, Navarro D, Blázquez-Gamero D, and the CYTRIC Study Group. **The role of the T-cell mediated immune response to Cytomegalovirus infection in intrauterine transmission.** PLoS One. 2023: 18(2):e0281341. doi: 10.1371/journal.pone.0281341.
- II. Soriano-Ramos M, Pedrero-Tomé R, Giménez Quiles E, Albert Vicent E, Baquero-Artigao F, Rodríguez-Molino P, del Rosal T, Noguera-Julian A, Fortuny C, Ríos-Barnés M, Saavedra-Lozano J, Dueñas E, Sánchez Mateos M, Castells Vilella L, de la Serna M, Frick MA, de Vergas J, Núñez Enamorado N, Moral-Pumarega MT, Folgueira MD, Navarro D, Blázquez-Gamero D and CYTRIC Study Group. **Correlation of T-Cell Immune Response with Long-Term Sequelae in Congenital Cytomegalovirus Infection (CYTRIC Study).** J Pediatr. 2024:114084. doi: 10.1016/j.jpeds.2024.114084. Epub ahead of print.
- III. Blázquez-Gamero D*, Soriano-Ramos M*, Martínez de Aragón A, Baquero-Artigao F, Frick MA; Noguera-Julian A, Alonso-Ojembarrena A, Moliner Calderón E, Rives Ferreiro MT, Filgueira Posse A, Garrote Llanos E, Sota Busselo I, Santos M, Tagarro García A, Bustamante J, Soler-Palacín P, Fortuny Guasch C, Rojo Conejo P; and the Spanish Registry of Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection (REDICCMV). **Role of Magnetic Resonance Imaging and Cranial Ultrasonography in Congenital Cytomegalovirus Infection.** Pediatr Infect Dis J. 2019;38(11):1131-1137. doi: 10.1097/INF.0000000000002455.

* Both authors contributed equally.

Otras publicaciones recientes del doctorando relacionadas con la materia:

- i. Blázquez-Gamero D, Soriano-Ramos M, Vicente M, Pallás-Alonso C, Pérez-Rivilla A, García-Álvarez M, Pinilla T, Freire X, De Vergas J, Martínez De Aragón A, Zamora B, Epalza C, Moraleda C, Rojo P, Prieto L, Fernández-Cooke E, Ruíz-Contreras J, Delgado R, Folgueira M.D and PICCSA Study group. **Prevalence and clinical manifestations of congenital cytomegalovirus infection in a screening program in Madrid (PICCSA Study).** *Pediatr Infect Dis J.* 2020;39(11):1050-1056. doi: 10.1097/INF.0000000000002808.

- ii. Blázquez-Gamero D, Galindo Izquierdo A, Del Rosal T, Baquero-Artigao F, Izquierdo Méndez N, Soriano-Ramos M, Rojo Conejo P, González-Tomé MI, García-Burguillo A, Pérez Pérez N, Sánchez V, Ramos-Amador JT, De la Calle M. **Prevention and treatment of fetal cytomegalovirus infection with cytomegalovirus hyperimmune globulin: a multicenter study in Madrid.** *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019;32(4):617-625. doi: 10.1080/14767058.2017.1387890.

Abreviaturas

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ALT	alanina aminotransferasa
AST	aspartato aminotransferasa
AUC	área bajo la curva
CI	cociente intelectual
CIR	restricción del crecimiento intrauterino
CMV	citomegalovirus
CMVc	infección congénita por citomegalovirus
CV	carga viral
DE	desviación estándar
HHV-5	virus herpes humano tipo 5
HIG	gammaglobulina hiperinmune
HNS	hipoacusia neurosensorial
IC	intervalo de confianza
IE	immediate-early
IFN- γ	interferón gamma

IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
IL	interleuquina
kb	kilobases
KIR	killer immunoglobulin-like receptor
LPR	respuesta linfoproliferativa
MMP-9	metaloproteinasa 9
NCR	receptores de citotoxicidad natural
NK	natural killer
nm	nanómetros
OR	odds ratio
ORF	open reading frames
PEATC	potenciales evocados auditivos de tronco cerebral
PEG	pequeño para la edad gestacional
PCR	reacción en cadena de polimerasa
REDICCMV	registro estatal de infección congénita por citomegalovirus
RM	resonancia magnética
RMF	resonancia magnética fetal

SNC	sistema nervioso central
SWI	susceptibility weighted imaging
TC	tomografía computerizada
TEA	trastorno del espectro autista
TGF- β	transforming growth factor beta
TLR	toll-like receptor
TNF	factor de necrosis tumoral
UL	unique long region
UI	unidades internacionales
US	unique short region
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VLE	vasculopatía lenticuloestriada

Indice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1: Representación esquemática del virión de citomegalovirus humano. En: Remington and Klein's Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 9th Edition. 640–687 (Elsevier, 2024). Figura 25.1 (A), con permiso.

Figura 2: Seroprevalencia de infección por citomegalovirus a nivel mundial, en función de la edad. En: Remington and Klein's Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 9th Edition. 640–687 (Elsevier, 2024). Figura 25.2, con permiso.

Tablas

Tabla 1: Clasificación de los herpesvirus humanos. En: Crough T, et al. Clin Microbiol Rev. 2009;22(1):76-98.

Tabla 2: Criterios diagnósticos de infección CMVc sintomática y asintomática. En: Luck SE, et al. Pediatr Infect Dis J. 2017;36(12):1205-13.

Tabla 3: Secuelas durante el seguimiento, en función de la edad gestacional en el momento de la infección materna primaria por CMV. En: Faure-Bardon V, et al. Clin Infect Dis. 2019;69(9):1526-32.

Tabla 4: Resultados auditivos en CMVc sintomático y asintomático. En: Kabani N, et al. J Infect Dis. 2020;221(Suppl 1):S9-S14.

Tabla 5. Signos y síntomas posibles en niños con CMVc. En: Luck SE, et al. Pediatr Infect Dis J. 2017;36(12):1205-13.

Resumen

Resumen

Introducción

El citomegalovirus (CMV) es reconocido como la infección congénita más frecuente en el mundo desarrollado, con una prevalencia de infección congénita del 0,14-0,7%. La mayoría de recién nacidos con infección congénita por CMV (CMVc) son asintomáticos durante el período neonatal, pero entre un 10-15% presentan síntomas al nacer y asocian un alto riesgo de secuelas a largo plazo, principalmente hipoacusia neurosensorial y alteraciones neurológicas. Además, entre el 10-20% de los niños con CMVc asintomático también pueden desarrollar secuelas. A pesar de la importancia del problema, muchos aspectos de su patogénesis, tratamiento y pronóstico siguen siendo inciertos.

Se sabe que la transmisión intrauterina del CMV depende de múltiples factores, siendo el momento de la infección fetal un factor predictor clave del desarrollo de secuelas, principalmente cuando la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo. El riesgo de infección fetal durante el embarazo es mayor después de una infección primaria que tras una infección no primaria, lo que indica que tener una respuesta inmune preexistente puede proporcionar cierta protección contra la transmisión. Así, la respuesta celular T materna podría tener un papel importante en prevenir la infección fetal. Por otro lado, existen diferencias en la respuesta celular de niños con CMVc en comparación con adultos. Sin embargo, la evidencia disponible sobre la importancia pronóstica de esta respuesta celular y su papel en el desarrollo de secuelas a largo plazo es escasa.

Además, las pruebas de neuroimagen son el mejor marcador pronóstico en la infección CMVc y el indicador más fiable de afectación del sistema nervioso central. No obstante, los datos disponibles sobre la relación entre los hallazgos neonatales de ecografía y resonancia magnética (RM) y el desarrollo de secuelas a largo plazo en niños con CMVc no está bien establecida.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es estudiar el papel de la respuesta celular T materna y neonatal en la infección CMVc. Los objetivos secundarios incluyen:

- 1) Estudiar el papel de la respuesta celular T materna en el riesgo de infección fetal por CMV.
- 2) Estudiar el papel de la respuesta celular T en el neonato con CMVc y su asociación con el desarrollo de secuelas a largo plazo, principalmente hipoacusia neurosensorial y alteraciones neurológicas.
- 3) Establecer el papel de la RM cerebral en el pronóstico a largo plazo de niños con CMVc.

Material y métodos

Estudio prospectivo multicéntrico en 8 hospitales españoles (2017-2020). Se recogieron muestras de sangre de gestantes al diagnóstico de infección primaria por CMV y de los recién nacidos diagnosticados de CMVc durante el primer mes de vida. Se cuantificó el recuento de linfocitos T CD8+ y T CD4+ específicos frente a CMV productores de IFN- γ mediante citometría de flujo. En las gestantes, se evaluó la posible asociación entre la presencia de una respuesta celular CD8+ o CD4+ específica frente a CMV y el riesgo de transmisión fetal. En los recién nacidos con CMVc se evaluó esta asociación con el riesgo de desarrollo de secuelas a largo plazo. Para el estudio sobre pruebas de neuroimagen en CMVc, se analizaron datos de la cohorte prospectiva longitudinal del Registro Estatal de Infección Congénita por CMV (REDICCMV) (2011-2017). Se incluyeron los niños con CMVc en los que se había realizado ecografía cerebral y RM craneal en los primeros 3 meses de vida.

Resultados

La cohorte de gestantes incluyó 135 mujeres con infección gestacional por CMV, 60 de las cuales presentaron infección primaria. De ellas, 24 fueron transmisoras y 36 no transmisoras. No se encontró asociación entre la presencia de respuestas específicas CD4+ o CD8+ contra el CMV al diagnóstico de la infección materna y el riesgo de

transmisión fetal. No hubo transmisión en aquellas gestantes con carga viral de CMV indetectable en sangre al diagnóstico.

La segunda cohorte incluyó 64 recién nacidos, de los cuales 42 (65,6%) tuvieron CMVc sintomático. Dieciocho tuvieron secuelas a largo plazo (28,1%), principalmente hipoacusia (20,3%) y alteraciones neurológicas (15,6%). No se observó relación entre el recuento de linfocitos CD8+ o CD4+ específicos productores de IFN- γ y el desarrollo de secuelas. El análisis multivariante mostró una asociación entre un menor recuento total de linfocitos y secuelas a largo plazo.

El estudio sobre neuroimagen incluyó 107 niños con CMVc de REDICCMV. Más de dos tercios (72%) fueron sintomáticos. La primera ecografía cerebral fue anormal en 60 pacientes (56,1%) y la RM mostró alteraciones en 68 niños (63,6%). De los 47 niños con ecografía cerebral normal al nacimiento, 13(27,7%) presentaron alteraciones en la RM. Seis de esos 13 pacientes (46,2%) presentaron una exploración física inicial anormal y 4/13 (30,8%) hipoacusia. En cuanto al seguimiento, 37/71 (52%) presentó secuelas a los 12 meses. Los niños que tenían ecografía cerebral normal al nacimiento sin otros síntomas relacionados con CMVc al nacer (n =15) no presentaron secuelas a largo plazo. En el análisis de regresión logística multivariante, no pasar el cribado auditivo y las alteraciones en la RM fueron factores de riesgo independientes de secuelas a los 12 meses.

Conclusiones

En la cohorte de gestantes con infección primaria por CMV, no se encontró asociación entre la presencia de una respuesta celular T específica en el momento de la infección y el riesgo de transmisión intrauterina. Una carga viral detectable de CMV en sangre materna al diagnóstico de la infección primaria podría representar un biomarcador relevante asociado con el riesgo de transmisión fetal.

En la cohorte de recién nacidos con CMVc, la respuesta celular T específica no fue predictiva del riesgo de secuelas a largo plazo. Un menor recuento total de linfocitos podría indicar un mayor riesgo de secuelas a largo plazo.

Las alteraciones en la RM y no pasar el cribado auditivo fueron factores de riesgo independientes para el desarrollo de secuelas a largo plazo en niños con CMVc. La RM proporciona información adicional útil, en comparación con la ecografía, por lo que se recomienda realizar en todos los niños con CMVc y cualquier síntoma relacionado con CMVc al nacer.

Abstract

Background

Cytomegalovirus (CMV) is recognized as the most common congenital infection in the developed world, with a prevalence of congenital infection of 0.14-0.7%. Most newborns with congenital CMV infection (cCMV) are asymptomatic during the neonatal period, but 10-15% show symptoms at birth and present a high risk of long-term sequelae, mainly sensorineural hearing loss and neurological abnormalities. Furthermore, 10-20% of children with asymptomatic cCMV may also develop sequelae. Despite the importance of the problem, many aspects of its pathogenesis, management and prognosis remain uncertain.

Intrauterine transmission of CMV depends on multiple factors, and the time of fetal infection is a key predictor of the development of sequelae, particularly when the infection occurs in the first trimester of pregnancy. The risk of fetal infection during pregnancy is higher after a primary infection than after a non-primary infection; this fact indicates that preexisting immune response may provide with protection against transmission. Thus, maternal T cell response could play an important role in preventing fetal infection. Furthermore, there are relevant differences in the cellular response of children with cCMV compared to adults. However, the available evidence regarding the prognostic value of this cellular response and its role in the development of long-term sequelae is scarce.

Besides, neuroimaging findings are the best prognostic factor in cCMV and the most reliable predictor of central nervous system involvement. However, scarce data are available on the relationship between neonatal cranial ultrasound (cUS) and magnetic resonance imaging (MRI) findings and long-term sequelae in patients with cCMV.

Objectives

The main outcome of this doctoral thesis is to study the role of maternal and neonatal T-cell response in congenital CMV infection. Secondary outcomes include:

- 1) To study the role of maternal T-cell response in the risk of fetal CMV infection.
- 2) To study the role of neonatal T-cell response in newborns with cCMV and its association with the development of long-term sequelae (sensorineural hearing loss and neurological disorders).
- 3) To establish the role of cranial MRI in the long-term prognosis of children with cCMV.

Methods

Prospective multicenter study in 8 Spanish hospitals (2017-2020). Blood samples were collected from pregnant women at the time of diagnosis of primary CMV infection, and from newborns with cCMV during the first month of life. Quantitative analysis of IFN- γ -producing specific CMV-CD8⁺/CD4⁺ cells was performed by intracellular cytokine flow cytometry. In pregnant women, the association between the presence of specific CD8⁺/CD4⁺ cellular response against CMV and the risk of fetal transmission was evaluated. In newborns with cCMV, the development of sequelae was assessed. In the study regarding neuroimaging tests in cCMV, data from the prospective cohort of the Spanish Registry of Infants with Congenital CMV Infection (REDICCMV) (2011-2017) were analyzed. Children with cCMV in which cUS and MRI had been performed in the first 3 months of life were included.

Results

The cohort of pregnant women included 135 women with gestational CMV infection, 60 of whom had primary infection. Twenty-four of them were transmitters, and 36 were non-transmitters. No association was found between specific CD4 or CD8 responses against CMV when maternal infection was diagnosed and the risk of fetal transmission. There was no transmission among women with an undetectable CMV viral load in blood at diagnosis.

The second cohort included 64 newborns, of whom 42 (65.6%) had symptomatic cCMV. Eighteen had long-term sequelae (28.1%), mainly hearing loss (20.3%) and neurological abnormalities (15.6%). No relationship was found between the specific T-cell response

and the development of sequelae. Multivariate analysis showed an association between a lower total lymphocyte count and long-term sequelae.

The study regarding neuroimaging in cCMV included 107 children with cCMV from REDICCMV cohort. More than two-thirds (72%) were symptomatic. The first cUS was abnormal in 60 (56.1%), and MRI showed abnormalities in 68 children (63.6%). Among the 47 children with a normal cUS at birth, 13 (27.7%) presented abnormalities on MRI. Six of these 13 patients (46.2%) had an abnormal initial physical exam, and 4/13 (30.8%) presented hearing loss. During follow-up, 37/71 (52%) presented sequelae at 12 months of age. Children who had a normal cUS without any other cCMV-related symptoms at birth (n =15) had no long-term sequelae. In the multivariate logistic regression analysis, failure to pass the hearing screening test and MRI abnormalities were independent risk factors for sequelae at 12 months.

Conclusions

In the cohort of pregnant women with a primary CMV infection, no association was found between CMV T-cell responses at the time of maternal infection and the risk of intrauterine transmission. A detectable CMV viral load in maternal blood at diagnosis of the primary maternal infection may represent a relevant biomarker associated with fetal transmission.

In the cohort of newborns with cCMV, the specific T-cell response was not predictive of the risk of long-term sequelae. A lower total lymphocyte count could predict a higher risk of long-term sequelae.

MRI abnormalities and a failure in the hearing screening test were independent risk factors for long-term sequelae in children with cCMV. MRI provides additional helpful information, compared with cUS, and thus it should be performed in all children with cCMV and any other cCMV-related symptoms at birth.

I. Introducción

La infección congénita por citomegalovirus (CMV) humano es la infección congénita más frecuente a nivel mundial, la principal causa de hipoacusia neurosensorial (HNS) no genética en la infancia, y una importante causa de discapacidad neurológica^{1,2}. De hecho, el CMV produce más casos de enfermedad congénita que la combinación de las 29 enfermedades cribadas en la mayoría de estados americanos, es más frecuente que muchos trastornos incluidos en los programas de cribado neonatal en los países europeos³ y sigue generando anualmente más casos de niños con discapacidad en los Estados Unidos que la trisomía 21, el síndrome alcohólico fetal o la espina bífida⁴. Además, el CMV es una causa importante de enfermedad potencialmente grave en receptores de trasplante y pacientes inmunodeprimidos⁵.

En 1904 Ribbert describió unas “células similares a protozoos” en los órganos de un bebé que murió de una supuesta sífilis congénita. En 1921, Goodpasture y Talbot plantearon la hipótesis de que estas células gigantes con una gran inclusión nuclear, o "citomegalia" (de ahí su nombre), eran células huésped que habían sido infectadas por un virus. Debido a que estas células se observaban con frecuencia en las glándulas salivales de animales y humanos, al CMV originalmente se le llamó “virus de las glándulas salivales”⁶. El primer aislamiento del CMV en un paciente vivo se logró en 1955. El paciente era un lactante de 3 meses, con microcefalia, ictericia, hepatoesplenomegalia, calcificaciones cerebrales y coriorretinitis, en el que se sospechó inicialmente una toxoplasmosis congénita. Sin embargo, la biopsia hepática mostró las características inclusiones intranucleares del CMV “en ojo de búho”, confirmando así que era el CMV el responsable del cuadro clínico de esta infección congénita⁷.

1. Agente causal

El CMV humano, también conocido como herpesvirus humano 5 (HHV-5), es un miembro del grupo β -herpesvirus de la familia de los virus herpes. Es el herpesvirus de mayor tamaño, alcanzando los viriones maduros un diámetro de 200 a 300 nm (Tabla 1). El virión está formado por un núcleo de ADN lineal bicatenario de 235 kb dentro de una nucleocápside icosaédrica de 162 capsómeros, envuelto por una matriz proteica (el tegumento). Estos componentes están envueltos a su vez por una bicapa lipídica que contiene varias glicoproteínas virales^{5,8} (Figura 1).

Los distintos genes virales y ORFs (*Open Reading Frames*) se designan en función de su localización en la zona UL (*Unique long region*), la zona US (*Unique short region*) o las zonas internas o terminales. Los genes se denominan por el elemento que codifican: p para proteínas, gp para glicoproteínas y pp para fosfoproteínas, seguido de la región (UL o US) y la posición que ocupan⁹.

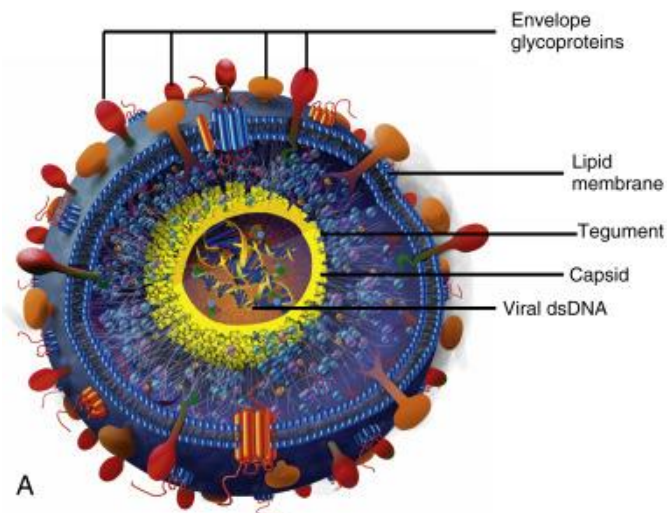


Figura 1. Representación esquemática del virión de CMV humano. En: Remington and Klein's Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 9th Edition. 640–687 (Elsevier, 2024). Figura 25.1 (A)⁹. El ADN viral bicatenario se muestra encapsulado en la cápside proteica, que está rodeada por una capa amorfa llamada tegumento. Estas estructuras quedan envueltas por una bicapa lipídica en la que se encuentran las glicoproteínas.

El tegumento contiene la mayor parte de proteínas del virión, siendo la más abundante la fosfoproteína 65 de la matriz inferior (pp65), también denominada UL83, que es la que se detecta al realizar la prueba de la antigenemia. Los estudios han demostrado que entre el 2-5% de los linfocitos T CD8+ de sangre periférica de individuos infectados por CMV son específicos para esta proteína⁹. Las proteínas del tegumento tienen una función principalmente estructural, facilitando el ensamblaje de viriones y la entrada del virus en las células infectadas, pero también tienen un papel en la regulación de la respuesta inmune del huésped a la infección. La envoltura de bicapa lipídica contiene al menos 20 glicoproteínas que están involucrados en la unión y penetración celular, donde se incluyen la glicoproteína B o gB (gpUL55), gH (gpUL75), gL (gpUL115), gM (gpUL100), gN (gpUL73), y gO (gpUL74)^{8,9}.

Estas glicoproteínas inducen una respuesta humoral en el huésped que desencadena la producción de anticuerpos neutralizantes. La secuenciación del genoma del CMV mostró que hay regiones altamente variables. La secuenciación de estos loci ha demostrado que un individuo puede infectarse por múltiples genotipos de CMV y que incluso las personas seropositivas pueden reinfectarse por nuevos genotipos de CMV. La replicación viral se inicia cuando el CMV se adhiere a la superficie celular y se fusiona con la membrana de la célula huésped, lo que desencadena una cascada de respuesta celular mediada por diferentes vías de señalización. Una vez que el ADN viral se adentra en el núcleo celular, se expresan los genes *immediate-early* (IE) del virus⁵. El ADN viral replicado sale del núcleo en la cápside viral y en el citoplasma tiene lugar el ensamblaje de la partícula viral madura. Las proteínas estructurales virales se transportan al compartimento de ensamblaje, finalmente se libera de la célula mediante lisis celular⁵.

Herpesvirus	Tamaño (kb)
<i>Alphaherpesvirinae</i>	
<i>Simplexvirus</i>	
Virus Herpes Simple tipo 1	152
Virus Herpes Simple tipo 2	155
<i>Varicellovirus</i>	
Virus Varicella-zoster	125
<i>Betaherpesvirinae</i>	
<i>Cytomegalovirus</i>	
Citomegalovirus	227-236
<i>Roseolovirus</i>	
Herpesvirus Humano tipo 6	159-162
Herpesvirus Humano tipo 7	144-153
<i>Gammaherpesvirinae</i>	
<i>Lymphocryptovirus</i>	
Virus de Epstein-Barr	172-173
<i>Rhadinovirus</i>	
Herpesvirus humano tipo 8	134-138

Tabla 1. Clasificación de los herpesvirus humanos⁸.

2. Epidemiología

La infección por CMV es endémica y su seroprevalencia aumenta con la edad, aunque los porcentajes varían ampliamente entre poblaciones en función de factores geográficos, étnicos y socioeconómicos. En Estados Unidos la seroprevalencia de CMV es de un 58,9% (estudio NHANES III; *Third National Health and Nutrition Examination Survey*)¹⁰. En general, la prevalencia de la infección por CMV es mayor en los países de renta baja y en personas de menor nivel socioeconómico. Estas diferencias son particularmente llamativas durante la infancia. Por ejemplo, en África subsahariana, América del Sur y Asia, la tasa de seropositividad entre niños en edad preescolar es de un 95-100%, mientras que en el Reino Unido y en Estados Unidos la seroprevalencia es de menos de un 20% en los niños de edades similares. Probablemente la lactancia materna y la exposición a niños pequeños en guarderías sean los factores que más contribuyan a la adquisición temprana del CMV⁹.

El nivel de inmunidad en mujeres en edad fértil también varía ampliamente. Las tasas de seropositividad en mujeres jóvenes de Estados Unidos y Europa occidental oscilan entre el 50% y el 85%¹¹ (Figura 2). Por el contrario, en África subsahariana, América Central y del Sur y el sur de Asia, la tasa de seropositividad en mujeres es superior al 90%. Estudios prospectivos en gestantes de Estados Unidos mostraron que la tasa de adquisición del CMV en mujeres en edad fértil de nivel socioeconómico medio-alto fue del 2% anual, frente al 6% entre mujeres de nivel socioeconómico más bajo⁹. Se cree que estas diferencias podrían estar asociadas a determinantes sociales de la salud (mayor densidad de individuos por vivienda, peor acceso a atención prenatal y educación prenatal)¹².

La infección congénita por CMV (CMVc) se produce por transmisión transplacentaria del virus. Esta puede ocurrir en gestantes sin inmunidad previa que han adquirido la infección por CMV por primera vez durante el embarazo (infección primaria), o en mujeres con anticuerpos preexistentes frente al CMV, ya sea por reactivación de una infección materna previa o por reinfección por una cepa distinta (infección no primaria). La transmisión también puede ocurrir por una infección por CMV adquirida en las semanas previas a la concepción (infección periconcepcional)¹¹. La

prevalencia de infección primaria por CMV durante el embarazo es del 1-2% en Estados Unidos, mientras que las infecciones no primarias pueden ocurrir hasta en el 10% de las gestaciones^{11,13}. Las infecciones primarias por CMV tienen el mayor riesgo de transmisión intrauterina del virus (30-35%), mientras que en las infecciones no primarias la tasa de transmisión es significativamente menor (1,1-1,7%)^{14,15}. El porcentaje de CMVc que se producen por una infección no primaria oscila entre el 50% en países de alta renta y hasta el 90% en países del baja renta^{16,17}.

La tasa de transmisión vertical es mayor conforme aumenta la edad gestacional en el momento de la infección; sin embargo, el mayor riesgo de afectación fetal y, en consecuencia, de secuelas a largo plazo, se da en el primer trimestre del embarazo (antes de las 14 semanas de gestación^{11,18}).

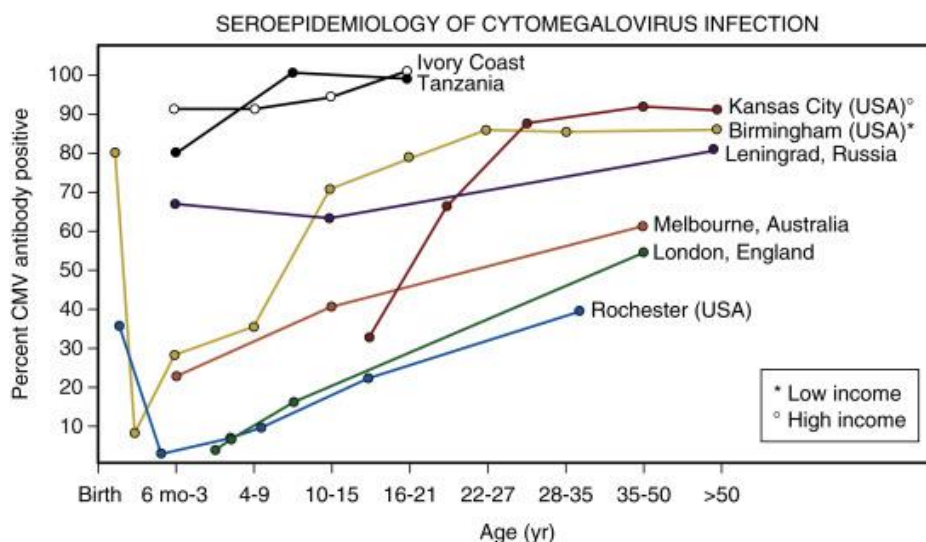


Figura 2: Seroprevalencia de infección por citomegalovirus a nivel mundial, en función de la edad. En: Remington and Klein’s Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 9th Edition. 640–687 (Elsevier, 2024). Figura 25.2⁹.

La incidencia del CMVc es de 0,2 al 2,4% de recién nacidos^{3,19}. Esto supone que cada año nazcan unos 60.000 niños con CMVc en Estados Unidos y Europa en conjunto^{3,20}, con una mortalidad global del 0,5% y una tasa de secuelas del 17-20%²¹. El 85-90% de los niños infectados nacen sin síntomas aparentes, mientras que el 10-15% presentará signos clínicos de enfermedad al nacimiento (infección sintomática)²⁰. Alrededor del 50% de los sintomáticos y el 10-15% de los asintomáticos desarrollarán

secuelas a largo plazo, principalmente HNS y alteraciones neurológicas. Representa hasta el 10% de todos los casos de parálisis cerebral²² y entre el 8-21% de todas las HNS congénitas²³, porcentaje que aumenta al 25% a la edad de 4 años debido a la hipoacusia de inicio tardío¹¹. De ahí que el CMVc se considere hoy la primera causa de HNS no genética en la infancia y la principal causa infecciosa de retraso en el neurodesarrollo, con una alta proporción de niños sintomáticos que padecen algún grado de discapacidad cognitiva, psicomotora o visual^{14,20}. En aproximadamente el 50% de los niños con CMVc la HNS se inicia de forma tardía o presenta un deterioro progresivo durante la infancia^{12,24,25}.

En España el primer estudio publicado de prevalencia de CMVc realizado mediante *screening* neonatal (estudio PICCSA) mostró una prevalencia de CMVc del 0,47% (15/3190, IC 95%: 0,29%–0,77%), es decir, aproximadamente 1 niño infectado por cada 200 recién nacidos¹⁹. Esta prevalencia es varias veces mayor que la de otras enfermedades de las que se realiza cribado neonatal sistemático: por ejemplo, es 10 veces más frecuente que el hipotiroidismo congénito y 100 veces más frecuente que la hiperplasia suprarrenal congénita en España²⁶. Incluso teniendo en cuenta sólo el número estimado de niños con secuelas a largo plazo asociadas al CMVc, la incidencia sería más alta que en otras enfermedades detectadas en España mediante sangre seca de talón al nacer^{26,27}.

La prevalencia de CMVc en niños prematuros también ha sido estudiada en España. En un estudio realizado en Barcelona en menores de 32 semanas y peso al nacimiento ≤ 1500 g se detectó una prevalencia de CMVc del 2,3%²⁸. En Estados Unidos, Turner *et al* encontraron que la prevalencia de CMVc en prematuros menores de 1500g fue de un 0,39% (IC 95%: 0,25%–0,62%) y que además el grupo de niños infectados presentaban en un elevado porcentaje de casos hipoacusia, alteraciones en las pruebas de neuroimagen o alteraciones en el desarrollo motor²⁹. Por último, un estudio realizado en España en recién nacidos mayores de 34 semanas asintomáticos con bajo peso al nacimiento mostró una prevalencia de CMVc de 0,54%³⁰. Un estudio realizado en Brasil encontró una prevalencia de CMVc entre 75 prematuros (≥ 28 semanas y peso al nacimiento ≥ 1000 g) del 9% (7/75), aunque el diagnóstico de CMVc fue realizado mediante PCR-CMV en sangre periférica y no en orina. Los autores atribuyen esta

elevada prevalencia, mayor que la descrita en la literatura^{31,32}, al bajo nivel socioeconómico de la población de Brasil y la elevada seroprevalencia de CMV (97%)³³.

El impacto económico asociado al CMVc es muy elevado. En Estados Unidos y Reino Unido el coste anual estimado asciende a los 1,86 billones y 495-972 millones de dólares, respectivamente^{11,34,35}, por lo que el desarrollo de una vacuna frente al CMV es actualmente una de las prioridades en Salud Pública²⁴.

3. Patogenia e inmunología de la infección congénita

3.1. Patogenia

El CMV tiene un amplio tropismo celular con capacidad de infectar células endoteliales, epiteliales, fibroblastos, neuronas, monocitos/macrófagos, granulocitos y células del músculo liso. Este amplio tropismo celular permite el establecimiento de una infección persistente, que comienza cuando un individuo entra en contacto con fluidos corporales como lágrimas, saliva, orina, semen o leche materna, de un individuo infectado. La infección de las células epiteliales en riñones y glándulas salivales durante la viremia explica la eliminación del virus a través de orina y saliva^{5,36}. La detección del CMV en los fluidos corporales puede prolongarse durante meses o años tras la infección primaria⁸. Los monocitos pueden viajar directamente hasta la médula ósea e infectar las células madre hematopoyéticas CD34+, estableciendo una infección latente de por vida⁵. Con la infección inicial, la entrada del CMV en la célula desencadena la activación de varias vías del sistema inmune innato y una respuesta humoral y celular de linfocitos T CD4+ y CD8+^{5,6}. Aunque el riesgo de transmisión intrauterina del CMV es mayor en gestantes con infección primaria, se sabe que la infección congénita sintomática y las secuelas a largo plazo pueden ocurrir en niños cuyas madres eran seroinmunes al CMV antes del embarazo³⁷. Los niños con CMVc sintomático tienen manifestaciones de la enfermedad similares a las de los adultos inmunodeprimidos, como hepatitis o esplenomegalia. Sin embargo, la afectación del sistema nervioso central (SNC) y la hipoacusia son exclusivas de la infección congénita por CMV.

3.1.1. Sistema nervioso central

Los estudios de neuroimagen en niños con CMVc demuestran una serie de alteraciones estructurales del cerebro, como calcificaciones periventriculares, ventriculomegalia, alteraciones de sustancia blanca e hipoplasia cerebelosa, que son fuertes predictores de una evolución desfavorable. Los modelos experimentales sugieren que las células progenitoras neuronales del feto en desarrollo son las más

susceptibles a los efectos líticos del CMV. Debido a que estas células se diferencian tanto en neuronas como en células gliales, el impacto de su destrucción o daño resultará en pérdida de masa cerebral y alteraciones de la migración neuronal¹¹. Los estudios histológicos de tejidos de fetos y niños con CMVc letal respaldan estos hallazgos y muestran una infección viral directa debido a encefalitis focal, con daño histológico en el córtex, la sustancia blanca, la matriz germinal, la sustancia gris, las células endodimarias y las leptomeninges. La resolución de la encefalitis aguda conduce a gliosis y calcificaciones que aunque típicamente se han descrito de localización periventricular, pueden localizarse en cualquier parte del cerebro. Estos estudios histológicos también demuestran una infiltración prominente de células T CD8+ fetales activadas y células apoptóticas, lo que sugiere un daño mediado por el sistema inmunológico. Modelos murinos recientes demuestran que el factor de necrosis tumoral (TNF) desempeña un papel clave en la inflamación cerebral, incluido el reclutamiento de células mononucleares inflamatorias. Estos hallazgos en conjunto respaldan la teoría de que la lesión cerebral en el CMVc es el resultado tanto de una replicación viral descontrolada como de un daño mediado por el sistema inmunológico del huésped^{5,9}.

3.1.2. Oído

La hipoacusia es la secuela más frecuente del CMVc, pero su patogenia no es bien conocida. El grado de hipoacusia es variable, desde una pérdida leve unilateral hasta una pérdida profunda bilateral, incluyendo la HNS de aparición tardía. Al igual que con el daño del SNC inducido por CMV, el examen histológico de los huesos temporales de fetos y niños infectados por CMV demuestra la presencia de antígenos virales o inclusiones en la cóclea y/o el aparato vestibular. Se han encontrado células CMV positivas en la estría vascular y la membrana de Reissner de la cóclea, que son estructuras importantes para la formación del potencial endococlear y la homeostasis de los iones. Se demuestran infiltrados inflamatorios en estas estructuras del oído interno mediante tinción histológica muy cerca de las células positivas para CMV, lo que sugiere una citopatología mediada por el sistema inmune. Los modelos animales de infección congénita por CMV, aunque limitados porque no imitan completamente la

enfermedad humana, han demostrado hallazgos compatibles con los de fetos y recién nacidos infectados, mostrando que el daño viral directo y la inflamación contribuyen a la patología del oído interno. Curiosamente, en estos estudios animales, el uso de agentes antivirales, anticuerpos neutralizantes del virus e inmunosupresores limitan el desarrollo de patología en el oído interno. En conjunto, estos hallazgos muestran que tanto el daño mediado por el CMV como la respuesta inflamatoria del huésped a la infección contribuyen a la patogenia de la HNS producida por CMV^{5,11}.

3.1.3. Placenta

A nivel de la placenta, el CMV se replica en el citotrofoblasto ocasionando la liberación de factores que alteran el desarrollo normal placentario y la diferenciación celular³⁸. Se produce un descenso de la expresión de integrinas $\alpha 1\beta 1$ y de metaloproteinasa 9 (MMP-9), necesarias para la invasión placentaria. Esta alteración de la invasión placentaria aumenta el riesgo de presentar un aborto espontáneo. Se produce también un aumento del depósito de colágeno en las células endoteliales infectadas mediante la activación del *transforming growth factor beta* (TGF- β), reduciendo el flujo en los vasos útero-placentarios³⁹. La situación prolongada de hipoxia por la infección, la inflamación y la fibrosis a nivel placentario aumenta la proliferación de las vellosidades coriales. Como consecuencia, al comparar la placenta de gestantes con infección primaria por CMV frente a gestantes no infectadas, se encuentra un marcado engrosamiento placentario, similar al que se encuentra en gestantes fumadoras o en gestaciones en gran altitud³⁸. Se cree que gran parte del daño fetal producido por el CMV se ocasiona por estas alteraciones placentarias.

3.1.4. Otros órganos

El CMV puede causar una enfermedad multisistémica y afectar a la mayoría de los órganos. A nivel hepático se produce una colangitis leve, colestasis intralobulillar y colestasis obstructiva secundaria a hematopoyesis extramedular. En el bazo la infección genera una esplenomegalia congestiva que genera trombocitopenia y anemia por atrapamiento. Desde el punto de vista histológico en la esplenomegalia se pueden

observar congestión, hematopoyesis extramedular y disminución del tamaño de los folículos linfoides. En los riñones se observan células portadoras de inclusiones a nivel de túbulos contorneados distales y conductos colectores, y ocasionalmente en cápsulas de Bowman y túbulos proximales. Puede haber infiltración de células mononucleares en las zonas peritubulares del riñón. Otros órganos que pueden verse afectados son páncreas, glándulas salivares, pulmones, médula ósea y corazón⁹.

3.2. Inmunología

La protección inmune contra la infección congénita por CMV es compleja y requiere considerar las respuestas inmunes en la madre, el feto y la placenta⁴⁰. Las primeras células inmunes fetales aparecen en el saco vitelino embrionario alrededor de la tercera o cuarta semana de gestación, en forma de precursores de granulocitos y macrófagos y de precursores eritroides pluripotentes. Las células inmunes migran desde el saco vitelino al hígado, que se convierte en el principal lugar de hematopoyesis en la sexta semana. En el hígado, los precursores se diferencian a macrófagos, granulocitos y a linfocitos pre-T y pre-B. El bazo se desarrolla en torno a la semana decimoctava de gestación y las primeras células T y B maduras aparecen en la circulación fetal en la semana decimosexta⁴¹.

3.2.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata desarrolla un papel fundamental en la prevención de la infección congénita por CMV, e incluye las células *natural killer* (NK), los toll-like receptors (TLRs), los fagocitos y las citoquinas.

Células NK

Las células NK, caracterizadas por el marcador CD3-CD56+, van a destruir las células infectadas por CMV mediante varios mecanismos: la muerte celular mediada por perforinas, la apoptosis mediada por Fas ligando y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos⁴⁰. Estas células producen citoquinas y regulan la respuesta inmune a través

de su interacción con las células dendríticas. Durante la gestación se desarrolla un estado de inmunotolerancia para evitar el rechazo del embrión; durante el primer trimestre, en el tejido endometrial se encuentran unas células denominadas “*uterine NK cells* o uNK” que son la principal célula inmunitaria endometrial en ese momento de la gestación y presentan una menor capacidad citotóxica que las otras células NK, precisamente para favorecer ese estado de inmunotolerancia en el microambiente uterino.

En algunos estudios, la presencia de CMVc se ha relacionado con una respuesta NK alterada. Existen una serie de receptores de NK que transmiten señales de activación o inhibición tras reconocer moléculas de las células con las que interactúa. En humanos, se han identificado varios grupos de receptores de NK: los KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*), los receptores de citotoxicidad natural (NCR) y las moléculas de la familia NKG2. Se ha descrito que el inmunofenotipo NKG2 está aumentado en los niños con CMVc y en aquellos con infección sintomática^{40,42}.

Células fagocíticas

Aunque no se conoce correctamente el papel que tienen los fagocitos (neutrófilos, macrófagos) en la prevención de la infección fetal, se ha comprobado mediante el estudio de las placentas que se acumulan granulocitos en las vellosidades coriales de los fetos infectados, lo que sugiere que estos granulocitos son una primera línea de defensa frente a la transmisión vertical del CMV⁴⁰.

Toll-like receptors

Existen diez TLRs descritos en humanos⁴³. Los polimorfismos en TLR2 se han asociado a una mayor gravedad de la infección por CMV en receptores de trasplante hepático⁴⁴, aunque este hecho no ha podido comprobarse en la infección congénita. En modelos celulares se ha visto que TLR2 participa en el proceso inflamatorio que se produce a nivel placentario en presencia del virus⁴⁵. TLR3 interacciona con el CMV mediante la unión de las moléculas de ARN virales durante la replicación⁴⁰. Los pacientes con la variante L412F del TLR3 presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones por CMV, debido a una disminución de la producción de interferón gamma (IFN- γ) y TNF α , aunque esta hipótesis no se ha demostrado en la infección congénita⁴⁶. TLR7 está

implicado en la respuesta a la infección por CMV, aunque su papel en la transmisión intrauterina del CMV tiene que ser estudiado⁴⁰.

Citoquinas, quimiocinas y defensinas

Durante la gestación, se produce un aumento de varias citoquinas. La interleuquina 10 (IL-10) es antiinflamatoria y su producción aumentada durante el embarazo se ha relacionado con un aumento de susceptibilidad a la infección fetal por CMV⁴⁷. Otras citoquinas que tienen un papel importante en la transmisión vertical de las infecciones virales son IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, IL-1 β y TNF- α ⁴⁰. Las quimiocinas CCL2, CCL4 y CXCL10 están aumentadas en el líquido amniótico de fetos infectados por CMV⁴⁸.

3.2.2 Inmunidad adaptativa

El estudio de la respuesta celular sugiere que existe un deterioro funcional de diversos aspectos de la inmunidad mediada por células en niños con CMVc y sus madres que puede tener un papel importante en la transmisión y progresión de la enfermedad⁴⁰. Los estudios han demostrado que existe una disminución de la citotoxicidad mediada por linfocitos en niños con CMVc y sus madres, en comparación con los controles, así como una disminución en la producción de IFN⁴⁹. La pérdida de esta respuesta celular T específica frente al CMV se asocia con una replicación viral descontrolada y enfermedad letal en modelos animales. En humanos, la importancia de la inmunidad celular para controlar la infección por CMV se ha demostrado en estudios con pacientes inmunodeprimidos, trasplantados, y con VIH^{5,6}.

Linfocitos T CD4

Se ha encontrado que las madres que transmiten la infección al feto tienen una respuesta linfoproliferativa (LPR) CD4 peor que las no transmisoras. Lilleri *et al* evaluaron la LPR específica y la producción de IFN- γ e IL-2 durante el primer año tras una infección primaria por CMV en 49 gestantes. Sus resultados mostraron que las madres transmisoras presentaban un retraso significativo en el desarrollo de la LPR CD4,

en comparación con las no transmisoras⁵⁰. Además, encontraron que el nivel de células T memoria específicas frente a CMV durante los primeros meses tras la infección fue significativamente menor en las madres transmisoras⁵¹. De manera similar, Revello *et al* analizaron la LPR de células T CD4+ específicas en 74 gestantes con infección primaria por CMV y hallaron que la LPR estaba significativamente disminuida o retrasada en las madres transmisoras⁵².

Además, la respuesta CD4 del feto y recién nacido en el contexto de la transmisión vertical también juega un papel en predecir la evolución de la infección congénita. Se sabe que la respuesta CD4 frente al CMV en niños está notablemente disminuida en comparación con los adultos⁴⁰. Los niños tienen una deficiencia selectiva y duradera en la respuesta inmune de células T CD4+ caracterizada por una disminución de la producción de IFN- γ e IL-2. Se ha postulado que esta respuesta CD4 subóptima podría ser responsable de la excreción tan prolongada de CMV observada en niños que adquieren la infección por CMV⁵³. El estudio de Lidehäll *et al* mostró que en comparación con los adultos, las respuestas de CD4 específicas frente a CMV en niños menores de 2 años fueron bajas o indetectables, concluyendo que esta respuesta CD4 inadecuada es el principal factor responsable de la falta de control inmunológico en las infecciones por CMV en niños⁵⁴.

Se ha evaluado el papel que tiene la respuesta inmune fetal mediada por CD4 en la transmisión de la infección y la sintomatología del niño. Aunque no parece tener un papel relevante en la transmisión viral al feto, si podría relacionarse con la gravedad de los síntomas fetales⁴⁰.

Linfocitos T CD8

La infección primaria por CMV produce una activación y diferenciación de las células T CD8+ “naive”, que se convierten en células efectoras o de memoria, capaces de secretar IFN- γ y de lisar las células infectadas⁵⁵. Los estudios que han evaluado las dianas específicas de las células T CD8+ han demostrado que existe un repertorio amplio y diverso de respuestas a muchos péptidos virales, siendo las de mayor importancia las proteínas pp65 (ppUL83) e IE-1.

Durante la primoinfección materna, se produce una respuesta CD8 en la gestante, similar a la que se produce en otros adultos sanos⁴⁰. La LPR a CMV en las madres que transmiten la infección al feto parece estar disminuida o retrasada, como se ha comentado anteriormente⁵². Sin embargo, otros estudios han mostrado justo lo contrario, es decir, que una mayor respuesta celular a CMV se asociaba con un mayor riesgo de transmisión de la infección al feto, en gestantes con infección primaria⁵⁶. De forma análoga, otro estudio mostró que una menor producción de IFN- γ se asociaba con una menor probabilidad de transmisión del CMV en una cohorte de gestantes con infección primaria⁵⁷. Los autores plantearon la hipótesis de que una mayor respuesta celular podría estar correlacionada con una viremia más larga e intensa, lo que lleva a un ambiente proinflamatorio a nivel placentario que facilitaría la entrada del virus^{56,58}.

Los niños con CMVc presentan con menor frecuencia linfocitos T CD8+ específicos capaces de realizar funciones citotóxicas, quimiotaxis y otras funciones concurrentes⁵⁹. Además, otros estudios sugieren una capacidad disminuida para la producción de citoquinas por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+, en contraste con los linfocitos T de adultos infectados⁶⁰. Capretti *et al* mostraron que la presencia de una respuesta CD8 específica frente a CMV al nacimiento se correlacionaba con un menor riesgo de síntomas neonatales y un control más eficaz de la viremia por CMV⁶¹. El feto presenta respuesta CD8 desde la semana 22 de gestación^{40,62}. Los fetos infectados por CMV muestran un aumento muy importante en los recuentos de células T CD8+ activadas, comparado con controles; sin embargo, estos autores destacan que esta inmunidad celular fetal frente al CMV parece no ser completamente funcional⁶².

Anticuerpos

La protección que generan los anticuerpos frente a la infección por CMV es importante pero incompleta, ya que es posible la reinfección de personas previamente seropositivas frente a CMV. La presencia de anticuerpos preexistentes frente a CMV puede reducir la frecuencia de transmisión pero no previene la infección por una nueva cepa³⁶. De hecho, no se ha descrito una mayor incidencia de CMVc en pacientes con inmunodeficiencias de tipo humoral, y se sabe que las tasas de CMVc son más altas en poblaciones en las que las mujeres en edad fértil tienen seroprevalencias más elevadas, lo que sugiere que los anticuerpos no son imprescindibles para el control de la infección

por CMV^{36,40}. Los anticuerpos desempeñan un papel relevante en evitar la infección fetal, mediante la neutralización directa del virus y también tienen un papel protector a nivel placentario, mediante diversos mecanismos. Cuando la avidéz de los anticuerpos maternos es baja o la actividad neutralizante de los mismos es pobre, el riesgo de infección fetal es mayor^{38,40,63}. Las dianas principales de los anticuerpos son las glucoproteínas virales expresadas en la superficie del virus, sobre todo la gB y el complejo pentamérico gH/gL/pUL (128-131A)³⁶.

4. Infección por CMV en la gestante y en el feto

La prevalencia de la infección primaria por CMV en la gestación es de alrededor del 1-2% en Europa occidental y Estados Unidos, con una tasa de transmisión transplacentaria de alrededor del 32%^{11,64}. El riesgo anual de infección primaria durante el embarazo en mujeres seronegativas en su anterior embarazo fue del 5,9% en Estados Unidos⁶⁵. En un estudio francés reciente que incluyó mujeres seronegativas en su primer embarazo que tenían una nueva gestación en los 2 años siguientes, se vio que el riesgo de CMVc y secuelas relacionadas (alteraciones neurológicas y/o HNS) fue, respectivamente, 24 y 6 veces mayor que el de la población general de gestantes⁶⁶. La prevalencia de infección no primaria no está bien definida y en un estudio realizado en Estados Unidos fue del 10% anual en mujeres jóvenes en un periodo de tres años⁶⁷.

4.1. Diagnóstico de la infección en la gestante

La infección por CMV en la gestante es asintomática en la mayor parte de los casos. Solo presentan síntomas en la gestación un tercio de las infecciones maternas y habitualmente son inespecíficos (fiebre o febrícula, astenia, mialgias y síndrome gripal). Sin embargo, puede haber alteraciones de laboratorio hasta en un 50%, principalmente linfocitosis e hipertransaminasemia⁶⁸.

El diagnóstico de infección primaria se basa en la serología. El hallazgo de seroconversión identifica y define la infección primaria. Cuando no se puede demostrar una seroconversión, el diagnóstico se basa en la presencia de la combinación de la inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulina M (IgM) positivas. Sin embargo, la presencia de IgM positiva no es específica de una infección primaria reciente, ya que la IgM puede persistir durante meses o estar relacionado con reactividad cruzada. Por ello, se recomienda solicitar la avidéz de la IgG en los casos con IgM positiva para excluir o confirmar una infección primaria reciente¹¹. Los tests de avidéz sirven para realizar una estimación aproximada del momento de la infección. La avidéz de un anticuerpo se define como la fuerza de unión entre la molécula de inmunoglobulina y un antígeno multivalente. Se cuantifica mediante el porcentaje de la IgG que permanece unida al antígeno tras aplicar productos desnaturizantes como la urea⁶⁹. Durante los primeros

meses (3-6 meses) tras una infección por CMV se presentan anticuerpos IgG de baja avidéz ($\leq 30\%$)⁷⁰. Con el tiempo se van produciendo anticuerpos de mayor avidéz. La presencia de anticuerpos de alta avidéz ($> 65\%$) en el primer trimestre de gestación es indicativo de una infección previa a la gestación. Una avidéz intermedia (30-65%) de la IgG en el primer trimestre de gestación no descarta que haya existido una primoinfección en etapas tempranas del embarazo o en el periodo periconcepcional. En esos casos, la no detección de ADN viral en sangre materna basándose en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) excluye una infección primaria en el mes previo con una sensibilidad mayor del 80%⁷¹. Por el contrario, una PCR positiva no siempre indica infección primaria reciente, pues la viremia puede persistir durante semanas o meses y en un estudio solo el 33% de las gestantes con infección primaria presentaban PCR positiva en sangre en el momento de la infección⁷².

El diagnóstico de la infección materna no primaria se basa en la presencia de una PCR-CMV positiva en sangre, orina y/o saliva en una mujer seropositiva antes del embarazo. La serología tiene poca utilidad para el diagnóstico de la infección no primaria ya que en muchos casos la IgM no es detectable en suero, y solo en ocasiones se observa un incremento significativo de los niveles de IgG en el primer o segundo trimestre^{11,16,73,74}.

4.2. Diagnóstico de la infección fetal

La detección de ADN de CMV en líquido amniótico es el *gold standard* para el diagnóstico de la infección fetal por CMV, ya que los fetos infectados excretan el virus a través de la orina. La mayoría de las guías recomiendan realizar la amniocentesis al menos 6 semanas después de la fecha hipotética de la primoinfección y a partir de las 20-21 semanas de gestación, con una sensibilidad del 85-95%^{64,75,76}. Sin embargo, un estudio reciente en el que se realizó PCR-CMV en 2.706 casos mostró que la PCR en líquido amniótico es un método fiable para diagnosticar la infección fetal a partir de las 17 semanas de gestación, siempre que la amniocentesis se realice al menos 8 semanas después de la infección primaria, pues solo un intervalo inferior a 8 semanas produjo más resultados falsos negativos^{77,78}. En este último caso, la especificidad de la PCR para CMV en líquido amniótico es cercana al 100% y la sensibilidad ronda el 87-95%. Además,

la determinación de la carga viral en líquido amniótico mediante PCR cuantitativa permite diagnosticar la infección en el feto y puede ayudar a predecir su grado de afectación. Se ha visto que los niños asintomáticos presentan habitualmente cargas virales por debajo de 10^3 copias/ml⁷⁹⁻⁸¹. Por el contrario, la presencia de más de 10^5 copias/ml tiene una alta especificidad en el diagnóstico de la infección congénita sintomática⁶⁸.

En un 5-15% de casos puede darse un resultado falso negativo de la PCR en líquido amniótico debido al paso transplacentario tardío del virus; sin embargo, se ha visto que estos niños con CMVc nacidos después de una amniocentesis negativa rara vez presentan síntomas clínicos o alteraciones en las pruebas de neuroimagen al nacer y tienen buen pronóstico a largo plazo. En el estudio de Bilavsky *et al* solo el 2,2% de los niños del grupo con PCR negativa en líquido amniótico presentaron algún grado de hipoacusia (2,2% vs 17,4%; $p=0,012$), y ninguno desarrolló secuelas neurológicas a largo plazo, en comparación con un 14,1% en el grupo con amniocentesis positiva⁸². En un reciente metaanálisis de siete estudios observacionales, la tasa de falsos negativos de la amniocentesis fue del 8%; ninguno de estos niños presentaron secuelas (hipoacusia grave y/o alteraciones neurológicas) a los 2-3 años de seguimiento⁸³. Estos hallazgos apoyan la teoría de una transmisión vertical retrasada seguida de una infección fetal tardía (después del primer trimestre y posterior al momento de la amniocentesis), sin tener por tanto consecuencias clínicamente relevantes.

Otra técnica para evaluar el pronóstico fetal es el estudio de sangre fetal obtenida mediante cordocentesis. La presencia de anemia, trombocitopenia o elevación de enzimas hepáticas indica una alta probabilidad de infección sintomática⁷⁶. Sin embargo, es una prueba invasiva con más riesgo para el feto, por lo que actualmente solo se realiza en casos seleccionados.

En aquellas gestantes con infección fetal confirmada se debe realizar una evaluación mediante ecografía fetal seriada y dirigida, así como programar una resonancia magnética (RM) fetal (RMF) en el tercer trimestre, pues aporta información complementaria relevante para el pronóstico⁸⁴. Sólo una tercera parte de los niños con infección sintomática al nacer presenta hallazgos en la ecografía fetal durante el embarazo⁸⁵. El valor predictivo negativo de la normalidad de una ecografía y RM

normales para el desarrollo de secuelas moderadas a graves es del 100%, con un 17% de riesgo residual de HNS unilateral^{84,86}. Las anomalías cerebrales graves se asocian con un mal pronóstico y el hallazgo de alteraciones extracerebrales aisladas conlleva un riesgo del 30% de secuelas. Los hallazgos ecográficos se pueden clasificar según su localización en extracerebrales y cerebrales. Se describen a continuación:

- Hallazgos extracerebrales: El feto se infecta por CMV cuando la barrera placentaria no logra contener la replicación viral dentro de los 2-3 meses posteriores a la infección materna. La placentitis muestra una gruesa (>40 mm) y heterogénea placenta⁸⁷. La viremia fetal conduce a la invasión preferencial de los riñones produciendo nefritis que puede causar un oligoamnios transitorio. La hepatoesplenomegalia puede comprimir la burbuja gástrica o desplazar el estómago, generando una compresión gástrica que puede provocar un leve polihidramnios. La afectación directa del intestino delgado por CMV puede evidenciarse ecográficamente como un intestino hiperecogénico, que puede asociarse a íleo meconial transitorio o peritonitis meconial con ascitis leve^{11,88}. El retraso en el crecimiento fetal puede desarrollarse en cualquier trimestre, generalmente mostrando un feto pequeño para la edad gestacional con Doppler normal. Las calcificaciones finas miliares pueden verse en cualquier tejido fetal, incluido el miocardio. La cardiomegalia puede ser reflejo de anemia fetal leve, miocardiopatía fetal o ambas, a menudo con enfermedad pericárdica y derrame pleural, en ocasiones como parte de un hidrops fetal. Estos hallazgos extracerebrales se pueden encontrar tanto en casos de infección materna primaria como no primaria, y en cualquier trimestre del embarazo; no obstante, cuando se deben a una primoinfección materna antes de las 14 semanas de gestación, se asocian con un alto riesgo de desarrollar HNS y lesiones cerebrales que conlleven alteraciones en el neurodesarrollo^{11,18}.
- Lesiones cerebrales: únicamente se desarrollan tras una infección materna primaria en el primer trimestre del embarazo^{18,86}. Los hallazgos incluyen uno o varios de los siguientes: ventriculomegalia leve-moderada <15 mm, quistes subependimarios, calcificación de los vasos lenticuloestriados, calcificaciones parenquimatosas y septación del asta posterior de un ventrículo lateral. Cuando cualquiera de los

anteriores aparece de forma aislada, el pronóstico sigue siendo el de un recién nacido asintomático que puede presentar o desarrollar una hipoacusia. La gravedad de las lesiones cerebrales puede anticiparse cuando en la ecografía del segundo trimestre se observa una progresión marcada de la ventriculomegalia (>20 mm), hiperecogenicidades periventriculares y los bordes ventriculares engrosados e irregulares, lo que define la ventriculitis. La hiperecogenicidad cerebelosa podría deberse a inflamación o hemorragia. En el tercer trimestre, el aumento de los espacios pericerebrales, especialmente en un feto pequeño para la edad gestacional, sugiere microcefalia. Las alteraciones de la migración neuronal son un desafío para la ecografía prenatal, aunque el examen transvaginal puede mostrar asimetría y alteraciones en las circunvoluciones, particularmente a nivel de la cisura de Silvio. Las heterotopias y la polimicrogiria, sin embargo, son visibles en la RM. Además de estos hallazgos típicos, la ventriculomegalia grave, leucomalacia periventricular, porencefalia, esquizefalia y microcefalia por debajo de 5 desviaciones estándar (DE) pueden verse generalmente en el tercer trimestre¹¹.

Los hallazgos de las lesiones cerebrales asociadas al CMV detectadas mediante RM fetal se han clasificado en diversas categorías de gravedad creciente⁸⁹. La RM funcional muestra un signo precoz ominoso de encefalitis a través de la hiperseñal de la sustancia blanca en T2, especialmente si esto involucra los lóbulos temporales^{86,90}. La realización de RM fetal aumenta la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico ecográfico⁹¹ y es especialmente útil para detectar la presencia de polimicrogiria, hipoplasia cerebelosa o alteraciones en la sustancia blanca⁹².

4.3. Tratamiento prenatal

4.3.1. Prevención primaria

En cuanto a la prevención de la infección materna, se sabe que el cuidado de niños en edad preescolar en el año anterior al parto es un factor de riesgo de infección congénita por CMV ^{16,93}. Debido a que los niños pequeños excretan el virus de forma prolongada, durante meses incluso años, son una importante fuente de infección en

mujeres seronegativas y por tanto de CMVc en su descendencia^{93,94}. Por ello, se recomienda que la gestante lleve a cabo una serie de medidas higiénicas para evitar el contacto con los fluidos corporales (saliva, lágrimas, orina, etc.) y prevenir así el contagio de cualquiera de los padres. Un estudio controlado en el que se daba información sobre estas medidas higiénicas a las 11-12 semanas de gestación, demostró el beneficio de estas medidas para disminuir la infección primaria, pues se encontró que la tasa de seroconversión en el grupo intervención fue significativamente menor que en el grupo control (1,2% vs 7,6%, respectivamente). Sin embargo, estas recomendaciones pueden llegar tarde si se hacen en la semana 12 de gestación. En dicho estudio, se demostró que el 1% de las gestantes ya tenían IgM e IgG positivas a las 12 semanas de gestación en ambos grupos, y por tanto no se podría prevenir la infección en estos casos⁹⁵.

4.3.2. Prevención secundaria

Prevención de la infección fetal con valaciclovir

En 2020 un ensayo clínico aleatorizado evaluó el efecto del valaciclovir oral (8 g/día, en 2 dosis al día) y mostró una reducción del 71% en la transmisión vertical de CMV en mujeres con infección primaria periconcepcional o en el primer trimestre del embarazo⁹⁶. Este ensayo fue seguido por dos ensayos cuasi-aleatorizados que mostraron resultados similares^{97,98}. Un metaanálisis de los estudios mencionados demostró que la administración de valaciclovir oral a una dosis de 8 g/día reducía la transmisión vertical de CMV en un 70%, en infecciones primarias adquiridas periconcepcionalmente y en el primer trimestre⁹⁹. Además, la probabilidad de transmisión vertical aumentaba con la edad gestacional al inicio del tratamiento, lo que indica que cuanto antes se comience éste, más eficaz será. Así, la recomendación actual es que se administre valaciclovir oral a dosis de 8 g/día (en 4 dosis a lo largo del día, para disminuir las complicaciones renales) en casos con infección primaria periconcepcional y del primer trimestre del embarazo, y que se inicie lo antes posible tras la infección hasta la realización de la amniocentesis. En el metaanálisis se describieron efectos secundarios leves (náuseas o cefalea) en el 21% de las gestantes, e insuficiencia renal aguda leve-moderada en tres casos (2%), que se resolvió tras suspender el tratamiento. Un estudio de casos y controles sugirió el beneficio del tratamiento con valaciclovir en

fetos infectados sintomáticos, tras la amniocentesis y hasta el nacimiento. Se describió una disminución de la proporción de recién nacidos con CMVc sintomático (66% sin tratamiento frente a 18% con tratamiento), y sin efectos secundarios maternos o fetales notables^{11,100}.

Prevención de la infección fetal con gammaglobulina hiperinmune (HIG)

Respecto al uso de la HIG en la prevención de la infección fetal, en 2005 un estudio no aleatorizado mostró que cuando se administraba HIG a gestantes con infección primaria por CMV, la tasa de transmisión vertical disminuía significativamente, del 40% al 16% ($P = 0,04$), así como el riesgo de CMVc, del 50% al 3% ($P < 0,001$)¹⁰¹. Sin embargo, recientemente dos ensayos clínicos aleatorizados concluyeron que la administración intravenosa de HIG (100 UI/kg) cada 4 semanas no fue eficaz para prevenir la transmisión vertical del CMV durante el primer y segundo trimestres^{102,103}, por lo que no se recomienda esta estrategia como medida de prevención secundaria en la actualidad⁶⁴. El ensayo realizado por Revello *et al*¹⁰² incluyó 124 gestantes con infección primaria por CMV a las que mensualmente se les administraba HIG, encontrando una tasa de transmisión vertical del 30% que fue no significativamente menor que en el grupo placebo (44%). El otro ensayo, realizado por Hughens *et al*¹⁰³, siguió los mismos criterios, pero incluyó a 712 mujeres. El ensayo tuvo que ser interrumpido precozmente al ver criterios de fertilidad en el análisis intermedio de los primeros 399 casos, ya que mostraba tasas de transmisión del 22,7% y 19,4% en el grupo HIG y en el grupo placebo, respectivamente. Por último, en el estudio observacional prospectivo realizado por Kagan *et al*, se administró HIG (200 UI/kg) cada 2 semanas en 40 gestantes con infección primaria muy reciente en el primer trimestre, encontrando una reducción del 70% en la tasa de transmisión vertical (7,5% vs 35%), comparado con el grupo control (cohorte histórica)¹⁰⁴. Por tanto, la administración lo más precoz posible de HIG a 200 UI/kg bimensual podría tener una utilidad preventiva, que debe ser confirmada en ensayos clínicos⁶⁴.

5. Infección por CMV en el recién nacido

5.1. Definición y diagnóstico

Se define la infección congénita por CMV ante la presencia de una PCR positiva para CMV en una muestra de orina o saliva en las primeras 3 semanas de vida, idealmente recogida lo antes posible tras el nacimiento⁶⁴. La muestra de saliva tiene una alta aceptabilidad entre los padres y es más fácil de recoger que la orina. La comparación de la PCR-CMV en saliva vs orina muestra una alta sensibilidad (93-100%) y valor predictivo negativo (98-99%), especificidad moderada (91-99,7%) y bajo valor predictivo positivo (49-73%), ya que pueden encontrarse resultados falsos positivos en muestras de saliva debido a contaminación por el paso a través del tracto genital o por lactancia materna^{11,64}. El estudio de Yamamoto *et al*¹⁰⁵ recogió muestras de saliva y orina en 1923 recién nacidos y demostró una tasa de falsos positivos aceptablemente baja¹⁰⁶. Obtener la muestra de saliva al menos 1 hora tras la toma de lactancia materna podría reducir el riesgo de contaminación con CMV procedente de la leche materna¹⁰⁷. Por ello, toda muestra con PCR-CMV positiva en saliva debe ser confirmada con una PCR-CMV en orina^{11,64}.

El diagnóstico retrospectivo de CMVc para casos con sospecha de CMVc que tengan más de tres semanas de vida se realiza mediante detección del ADN del virus en la sangre seca de talón, recogida durante la primera semana de vida en papel de filtro de las pruebas metabólicas (tarjeta de Guthrie). La sensibilidad de esta técnica para el diagnóstico de CMVc es un tema controvertido ya que la carga viral de CMV en sangre de los recién nacidos es significativamente más baja que en muestras de saliva u orina y puede incluso ser indetectable en hasta un 10-15% de los casos. Existe también variabilidad en las técnicas utilizadas para realizar la PCR-CMV en diferentes laboratorios⁶⁴. Boppana *et al* encontraron en un estudio realizado en más de 20.000 recién nacidos una sensibilidad del 34%¹⁰⁸. Cuando la técnica se emplea en muestras obtenidas de niños de alto riesgo (síntomas compatibles con CMVc o hijos de madres con historia de infección por CMV durante la gestación) la sensibilidad es más elevada (hasta el 95%)¹⁰⁹. Un metaanálisis mostró una sensibilidad y especificidad combinadas

del 84,4% al 99,9%¹¹⁰. Por tanto, la negatividad de PCR-CMV en sangre seca de no descarta al 100% la infección fetal.

5.2. Clínica

5.2.1. Cribado CMVc

Se debería realizar cribado de CMVc en aquellos casos con 1) evidencia de infección materna primaria durante el embarazo, ya que el riesgo de transmisión vertical es del 32%^{11,64}, 2) alteraciones compatibles en ecografía prenatal o RM fetal, y/o 3) manifestaciones clínicas al nacimiento sugestivas de CMVc. Las manifestaciones clínicas incluyen petequias, hepatoesplenomegalia, ictericia, microcefalia y trombocitopenia, así como en aquellos casos con HNS uni o bilateral detectada en el cribado neonatal¹¹¹. Sin embargo, el cribado auditivo neonatal detectará solamente el 20-60% de sorderas relacionadas con CMVc, pues se escapan a este cribado las hipoacusias de inicio tardío^{11,112}. El cribado universal para CMVc identificaría todos los niños con riesgo de sordera, un abordaje que ha mostrado ser coste-efectivo en Norteamérica¹¹³, y se debate si debe realizarse en todos los países¹¹³.

La detección de CMV sistemáticamente en casos de restricción del crecimiento intrauterino (CIR) o en recién nacidos prematuros tiene bajo rendimiento diagnóstico. Las últimas recomendaciones indican que la detección de CMV se realice en recién nacidos con CIR simétrico, donde la probabilidad de que el CMV sea la causa es mayor. El cribado de CMVc en recién nacidos muy prematuros (<32 semanas) y de muy bajo peso (<1500 g) puede ayudar a diferenciar entre infección congénita o de origen postnatal⁶⁴. La infección por CMV postnatal es frecuente en los grandes prematuros por lo que muchas unidades realizan este cribado de forma sistemática.

5.2.2. Hipoacusia neurosensorial y disfunción vestibular asociada a CMVc

La hipoacusia relacionada con CMVc se caracteriza por un mismo grado de pérdida auditiva en todas las frecuencias, es decir, una configuración plana de la pérdida auditiva¹¹⁴, aunque también se ha descrito hipoacusia limitada a las altas frecuencias⁶⁷. Esta configuración plana de la pérdida de audición demuestra que existe un daño al

conjunto de toda la cóclea, afectando igualmente a las altas y bajas frecuencias (base y ápex de la cóclea, respectivamente). Esto también ocurre en el síndrome de rubéola congénita¹¹⁵. La posibilidad de que exista una HNS de inicio tardío y la fluctuación en el umbral auditivo hace muy difícil predecir la evolución y estandarizar el seguimiento de los niños infectados. Por ello se recomienda un seguimiento al menos hasta los 4-6 años de edad^{11,64,114,116}. En el 90% de los casos la HNS de aparición tardía se desarrolla dentro de los 2-3 primeros años de vida¹¹⁶. Sólo el 5,7% de los niños con CMVc precisan rehabilitación mediante audífono o implante coclear, aunque los porcentajes varían entre el 29,3-44,4% al 1,6-3,4% en sintomáticos y asintomáticos, respectivamente^{23,116}. El implante coclear mejora la audición y el lenguaje en casos con pérdida auditiva grave-profunda, aunque en estos casos con frecuencia coexiste algún grado de discapacidad cognitiva¹¹⁷.

Por otro lado, la disfunción vestibular congénita relacionada con CMV, es más frecuente en asociación con HNS pero puede ocurrir de forma independiente^{18,118}. Se ha descrito una prevalencia del 17% en niños con CMVc, aunque publicaciones recientes sugieren que la incidencia de problemas vestibulares puede ser tan alta (o incluso mayor) que la de HNS. Los factores de riesgo de patología vestibular incluyen la infección materna primaria en el primer trimestre de gestación¹⁸ o en un momento desconocido, HNS y la presencia de quistes periventriculares en la RM^{119,120}.

5.2.3. Definición de CMVc sintomático y asintomático

A todos los niños con diagnóstico de CMVc se les debe realizar una exploración física con antropometría (peso, talla y perímetro cefálico), analítica de sangre (hemograma completo, transaminasas, bilirrubina total y conjugada), una evaluación oftalmológica y una evaluación auditiva para clasificar la infección como sintomática o asintomática. La definición de infección sintomática varía según los estudios. Algunos incluyen sólo los hallazgos del examen físico, mientras que otros también consideran las alteraciones en las pruebas de laboratorio o en las pruebas de neuroimagen^{121,122}.

De acuerdo con las recomendaciones de Luck *et al*¹²², se puede definir infección sintomática por CMV por la presencia de cualquiera de los siguientes (Tabla 2):

1. Anomalías en el examen físico: ictericia, petequias/púrpura, exantema “*bluberry muffin*”, esplenomegalia y/o hepatomegalia, hipotonía, convulsiones, paresia, letargia, succión débil, microcefalia (perímetro craneal por debajo de -2 Z-score para la edad gestacional¹²³) y pequeño para la edad gestacional (PEG, peso por debajo de -2 Z-score para la edad gestacional¹²³).

2. Coriorretinitis, hemorragia retiniana, atrofia óptica, estrabismo, cataratas.

3. Hipoacusia neurosensorial (umbral auditivo >25 dB en cualquiera de los oídos cuando se prueba mediante potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)).

4. Alteraciones de laboratorio: anemia, trombocitopenia (recuento de plaquetas <100 × 10³/μL), leucopenia, hiperbilirrubinemia conjugada y niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT, >80 UI/L).

5. Alteraciones en las pruebas de neuroimagen compatibles con CMVc en la primera ecografía cerebral o la primera RM craneal (si está disponible): alteraciones de sustancia blanca, adherencias ventriculares, calcificaciones intracraneales, ventriculomegalia, hipoplasia cerebelosa, quistes periventriculares, quistes caudotalámicos/subependimarios, hidrocefalia, atrofia cortical, lisencefalia, polimicrogiria u otras alteraciones de la migración.

Los recién nacidos que no cumplan ninguno de estos criterios tras una evaluación exhaustiva al nacer se clasificarán como *asintomáticos*.

Tabla 2: Criterios diagnósticos de infección CMVc sintomática y asintomática¹²².

Los niños con CMVc sintomático al nacer tiene más probabilidades de tener afectación del SNC, y un 40-58% desarrollará alteraciones neurológicas a largo plazo, incluyendo HNS, discapacidad intelectual, epilepsia, alteraciones visuales y parálisis cerebral^{21,64}. Los niños con CMVc asintomático al nacer pueden presentar secuelas a largo plazo en un 13,5% de los casos, principalmente niños con sordera²¹. La microcefalia en relación con el peso al nacimiento tiene una alta especificidad para indicar un mal

pronóstico neurológico. En cambio, la presencia de un CIR simétrico no necesariamente predice resultados desfavorables en un recién nacido infectado sin ningún otro síntoma.

La epilepsia ocurre en alrededor del 10% de los pacientes con CMVc sintomático. Estos pacientes, en su mayoría, tienen lesiones del SNC asociadas. Un estudio mostró que en los niños con epilepsia asociada a CMVc presentaban más frecuentemente trastornos de la migración y dilatación ventricular en las pruebas de neuroimagen¹²⁴. Diversos estudios han propuesto un incremento del riesgo del TEA en los niños con CMVc. Algunos estudios han recuperado muestras de sangre seca de talón de pacientes con TEA para el diagnóstico retrospectivos de CMVc, y se encontró esta asociación en varias poblaciones de Italia, Japón y Suecia, con una frecuencia de 5,3%, 7,4% y 3% de pacientes autistas con CMVc¹²⁵⁻¹²⁷. Un estudio italiano evaluó la presencia de TEA en pacientes con CMVc y encontró una prevalencia de 2 a 3 veces mayor en comparación con la población general¹²⁸.

5.3. Neuroimagen

Las pruebas de neuroimagen son el mejor marcador pronóstico en la infección CMVc y el indicador más fiable de afectación del SNC^{129,130}. La normalidad en estas pruebas predice un desarrollo neurológico normal o casi normal, mientras que las lesiones mayores se asocian con un mal pronóstico. Las implicaciones pronósticas de hallazgos menores en la neuroimagen, como la vasculopatía lenticuloestriada (VLE) aislada o alteraciones sutiles de sustancia blanca, no se conocen aún completamente⁹⁰.

Si bien la ecografía cerebral es la prueba de imagen de primera línea, la RM puede mostrar patología importante que a menudo se pase por alto en la ecografía, como, por ejemplo, las alteraciones de sustancia blanca y malformaciones corticales. Se recomienda realizar RM en niños que presenten manifestaciones clínicas al nacimiento, HNS, coriorretinitis o ecografía cerebral patológica. La RM también podría valorarse en casos de infección materna primaria en el primer trimestre, o cuando el momento de la infección materna se desconoce. No hay consenso sobre si la RM debe realizarse en otras situaciones⁶⁴.

La tomografía computarizada (TC) se ha utilizado ampliamente para detectar lesiones cerebrales en el CMVc^{131,132}. Sin embargo, existe gran preocupación por la exposición a la radiación en esos niños de forma tan precoz¹³³. La ecografía cerebral es muy fiable en detectar una amplia gama de alteraciones del SNC que se observan frecuentemente en pacientes con CMVc¹³³. Sin embargo, la adquisición e interpretación de imágenes tomadas mediante ecografía depende de las habilidades y experiencia del profesional y no es la mejor herramienta para identificar alteraciones corticales, de sustancia blanca o de fosa posterior. Por otro lado, la RM juega un papel crucial en el diagnóstico de trastornos del desarrollo cerebral (como las displasias corticales e hipoplasia cerebelosa) y en el diagnóstico de alteraciones de sustancia blanca^{134,135}. Sin embargo, hay escasos datos disponibles sobre la relación entre los hallazgos neonatales de ecografía y RM y las secuelas a largo plazo (principalmente HNS y alteraciones neurológicas) en pacientes con CMVc¹³⁵. Estudios previos indican que existe una buena correlación entre las alteraciones encontradas en ecografía cerebral y la predicción del pronóstico en recién nacidos con CMVc sintomático¹³⁶. Sin embargo, hubo una pequeña proporción de niños con ecografía cerebral normal al nacer que desarrollaron secuelas a largo plazo. En el estudio de Capretti *et al*¹³³, entre 34 niños con CMVc y ecografía cerebral normal, tres presentaron afectación del SNC en RM y secuelas a largo plazo. De Vries *et al*¹³⁵ realizaron otro estudio en niños sintomáticos y encontraron que la RM proporcionaba información adicional importante respecto a la ecografía cerebral y TC, especialmente en la evaluación de alteraciones de sustancia blanca, polimicrogiria, lisencefalia, displasia del hipocampo e hipoplasia cerebelosa¹³³.

Hay varios hallazgos que podrían estar presentes en RM y/o ecografía cerebral en niños con CMVc: se pueden encontrar quistes en el surco caudotalámico, matriz germinal o zona periventricular¹³⁷. Las alteraciones de sustancia blanca se presentan como zonas parcheadas bilaterales y multifocales cerca de la pared de los atrios ventriculares^{137,138}, aunque la evaluación de las alteraciones de sustancia blanca es todo un desafío, especialmente antes de la edad en que se consigue la mielinización completa, y además el pronóstico de los niños con alteraciones aisladas de sustancia blanca aún no está bien establecido^{90,138,139}. Las calcificaciones parenquimatosas se consideran un hallazgo característico de CMVc y también un factor de riesgo para el

retraso en el neurodesarrollo¹³³. La detección de calcificaciones parenquimatosas mediante RM podría ser difícil en ausencia de secuencias tipo SWI (*susceptibility weighted imaging*). Sin embargo, un examen detallado puede ser capaz de detectar focos puntiformes de baja señal en T2 o de alta señal en T1, a través de la pared periventricular, matriz germinal o ganglios basales¹³⁷.

5.4. Tratamiento

Los niños con CMVc y signos o síntomas importantes son candidatos a recibir tratamiento antiviral con ganciclovir intravenoso o, más frecuentemente, su profármaco oral valganciclovir. Dos ensayos clínicos aleatorizados con un tamaño muestral relativamente pequeño en recién nacidos sintomáticos^{140,141} mostraron beneficios modestos en términos de preservación de la audición y mejores puntuaciones de neurodesarrollo a los 24 meses de edad. La comparación de la duración de tratamiento con valganciclovir (6 semanas vs 6 meses) sugirió una mayor eficacia con períodos más prolongados de tratamiento¹⁴¹. En concreto, la duración de 6 meses no fue superior al tratamiento durante 6 semanas a los 6 meses de seguimiento, pero encontró un beneficio modesto a largo plazo (a los 12 y 24 meses) en los parámetros auditivos y escalas de neurodesarrollo¹⁴¹. En ambos ensayos los niños iniciaron tratamiento antiviral antes del mes de vida.

Todavía se desconoce si el hecho de comenzar después del mes de vida reduce la eficacia del tratamiento. Un ensayo clínico no aleatorizado que incluyó niños con HNS aislada sin ninguna otra manifestación clínica de CMVc y en los que se inició tratamiento antes de las 13 semanas de vida, mostró un menor deterioro auditivo a los 18-22 meses de edad que los niños del grupo control¹⁴². Un ensayo clínico aleatorizado que incluyó 17 niños con HNS con rango de edad desde 1 mes hasta 3 años (edad media 17,8 meses) fueron tratados con valganciclovir durante 6 semanas, sin encontrar ninguna mejoría en los umbrales auditivos 6 meses después, comparado con el grupo control¹⁴³.

En los casos de hepatitis aislada clínicamente significativa, o con trombocitopenia aislada diversas guías recomiendan un tratamiento más corto de 6

semanas⁶⁴. La coriorretinitis normalmente va asociada a otros síntomas y/o afectación del SNC, por lo que se recomienda tratamiento durante 6 meses.

Recientemente se han aprobado nuevos antivirales prometedores como letermovir y maribavir, para la prevención o el tratamiento de la infección por CMV en el contexto del paciente trasplantado. Se están planificando estudios que investiguen su uso en CMVc¹⁴⁴.

6. Factores pronósticos de secuelas

Actualmente no es posible determinar con exactitud el riesgo de desarrollo de secuelas que presenta un feto o un recién nacido con CMVc. Poder determinar de manera más precisa este riesgo es fundamental para la toma de decisiones durante la gestación y tras el nacimiento del niño, y así poder asesorar a los padres en los períodos prenatal y posnatal sobre la evolución esperada y el riesgo de secuelas a largo plazo⁶³. Los principales factores pronósticos en recién nacidos infectados son la edad gestacional en el momento de la infección materna y la presencia de signos/síntomas neonatales¹¹.

6.1. Edad gestacional en el momento de la infección

El momento de la infección fetal es un factor determinante del riesgo de desarrollo de secuelas. Fourgeaud *et al* recientemente evaluaron los factores predictores de secuelas en 227 niños infectados a los que se hizo seguimiento durante 2 años, encontrando que la infección materna primaria en el primer trimestre era el factor pronóstico más potente (odds ratio – OR = 38,34 (IC 95% 5,02-293, p<0,001). Además, realizaron un modelo predictivo que mostró que los niños que al nacimiento presentaban normalidad en las pruebas de audición, recuento de plaquetas y ecografía cerebral no tenían riesgo de secuelas neurológicas a los 2 años de edad y tenían un riesgo bajo de HNS unilateral tardía¹⁴⁵. Este modelo presentaba una especificidad del 98%, sensibilidad del 69% y área bajo la curva (AUC) de 0,89. El estudio de Faure-Bardon *et al* incluyó a 255 gestantes y sus 260 fetos/neonatos con una mediana de seguimiento de 24 meses, y encontraron que la proporción de HNS y/o secuelas neurológica fue del 32,4% (IC 95% 23,72–42,09) después de una infección materna primaria en el primer trimestre, 0 (IC 95% 0–6,49) después de una infección en el segundo trimestre, y 0 (IC 95% 0–11,95) después de una infección en el tercer trimestre (P < 0,0001) (Tabla 3). Estos resultados evidencian que el riesgo de secuelas graves parece limitarse a las infecciones del primer trimestre (< 14 semanas)¹⁸.

	Primer trimestre (<14 semanas) n=119	Segundo trimestre (≥14 y < 28 semanas) n=64	Tercer trimestre ≥ 28 semanas n= 32	p(1)	p(2)
Secuelas neurológicas	15 (12,6%) IC95% 7,23–19,64	0 IC95% 0-5,6	0 IC95% 0-10,89	,007	,041
HNS	30/108 (27,7%) IC95% 19,59–37,22	0/55 (0%) IC95% 0-6,49	0/29 (0%) IC95% 0-11,94	<,0001	,003
Cualquier secuela	35/108 (32,4%) IC95% 23,72–42,09	0/55 (0%) IC95% 0-6,49	0/29 (0%) IC95% 0-11,95	<,0001	,001

Tabla 3. Secuelas durante el seguimiento, en función de la edad gestacional en el momento de la infección materna primaria por CMV. Tomada de Faure-Bardon *et al*¹⁸. Los datos se muestran en n (%) o n/N (%) si hay datos perdidos. En p(1) se ha comparado el primer trimestre con el segundo. En p(2) se ha comparado el primer trimestre con el tercero.

6.2. Clínica al nacimiento

La presencia en el CMVc de una afectación sistémica al nacimiento se ha relacionado con un mayor riesgo de hipoacusia. Aproximadamente, uno de cada 3 niños sintomáticos al nacer presentará hipoacusia, frente a 1 de cada 10 niños asintomáticos²³. El estudio transversal realizado por Cuyper *et al*¹⁴⁶ incluyó a más de 1.000 recién nacidos con CMVc. El modelo de regresión analizado mostró tres factores de riesgo independientes para la hipoacusia congénita: petequias al nacer (OR: 6,7; IC 95 % 1,9-23,9), quistes periventriculares en imágenes obtenidas mediante RM (OR: 4,6; IC 95% 1,5-14,1) y seroconversión en el primer trimestre (OR: 3,1; IC 95% 1,1-9,3). Además, se observaron cargas virales más bajas en pacientes con audición normal en comparación con aquellos con hipoacusia congénita. Los hallazgos de este estudio transversal sugieren que los recién nacidos con CMVc y petequias al nacer, quistes

periventriculares en la RM o seroconversión en el primer trimestre tienen un mayor riesgo de hipoacusia congénita¹⁴⁶.

Pinninti *et al*¹⁴⁷ realizaron un estudio prospectivo en 160 niños con CMVc sintomático, categorizados en tres grupos: afectación del SNC, síntomas transitorios (ictericia, hepatoesplenomegalia, púrpura, trombocitopenia, aumento de ALT, sin afectación de SNC) y exantema petequeial aislado. Encontraron que había significativamente una mayor proporción de niños en el grupo del SNC con HNS (46/79, 58,2%) en comparación con aquellos con síntomas transitorios (20/53, 37,7%) o solo petequias (5/23, 21,7%; $P=0,0007$). En comparación con los niños que sólo tenían petequias, los del grupo del SNC tenían 5 veces más probabilidades y los del grupo de síntomas transitorios tenían el doble de riesgo de tener HNS. Además, significativamente más niños del grupo afectación del SNC tenían un cociente intelectual (CI) ≤ 70 (23/39, 59%) que aquellos con síntomas transitorios (8/39, 20%, $P < 0,0001$). En resumen, su estudio mostró que en niños con CMVc sintomático, aquellos con evidencia de afectación del SNC al nacer tienen un riesgo significativamente mayor de HNS y déficits cognitivos que aquellos con síntomas transitorios o un exantema petequeial, lo que sugiere una relación directa entre la gravedad de la enfermedad al nacer y el riesgo de resultados adversos¹⁴⁷. Por último, el estudio de Rivera *et al*¹⁴⁸ incluyó 180 niños con CMVc sintomático y seguimiento audiológico. Encontraron que la presencia de CIR, petequias, hepatoesplenomegalia, hepatitis, trombocitopenia y calcificaciones intracerebrales se asoció con el desarrollo de hipoacusia en el análisis univariante, concluyendo que la evidencia de infección diseminada con o sin presencia de afectación neurológica al nacer parece ser predictiva del desarrollo de hipoacusia en niños con CMVc sintomático¹⁴⁸.

Los resultados de la tesis doctoral del Dr. Blázquez Gamero¹⁴⁹ mostraron que la presencia de alteraciones en la ecografía fetal era un factor de riesgo independiente asociado a la hipoacusia y a las alteraciones neurológicas a largo plazo (OR: 9,9 (IC95%: 1,5-65,9), $p=0,017$; OR=61,5 (IC95%: 4,7-802,4), $p=0,002$, respectivamente). Además, se observó que la esplenomegalia y la hipoacusia al nacimiento eran factores de riesgo independientes asociados a la presencia de hipoacusia a los 6 meses de edad (OR: 13,7 (IC95%: 1,5-128,6), $p=0,022$; OR: 51,3 (IC95%: 15,2-173,5), $p=0,0001$, respectivamente) y que la elevación de la ALT > 80 UI/L al nacimiento y la hipoacusia al nacimiento eran

factores de riesgo independientes de desarrollo de secuelas neurológicas a los 12 meses (OR: 7,5 (IC95%: 1,0-57,2), p=0,05; OR: 6,9 (IC95%: 2,1-22,2), p=0,001, respectivamente).

6.3. Otros marcadores pronósticos

6.3.1. Pruebas de neuroimagen

Las alteraciones en la neuroimagen han mostrado ser un predictor potente de evolución adversa desde el punto de vista neurológico, incluyendo la HNS. La HNS se desarrolla en el 42,9% y en el 6,6% de recién nacidos asintomáticos con y sin anomalías en la ecografía cerebral y/o RM¹¹⁶, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de las alteraciones en la neuroimagen para HNS son del 52,9% y el 90%, respectivamente¹¹⁶. Algunos estudios de pequeño tamaño muestral que incluyeron recién nacidos con CMVc sintomático utilizaron un sistema de puntuación o escala de neuroimagen para definir mejor la gravedad de las alteraciones en la neuroimagen y sugieren que dicho sistema de puntuación conduce a una mejor predicción del pronóstico neurológico y la hipoacusia^{131,134}. El estudio realizado por Alarcón *et al* en 26 pacientes con CMVc sintomático y un seguimiento medio de 8 años, confirmó que la ecografía cerebral es comparable con la TC en la capacidad para detectar la mayoría de lesiones asociadas a CMVc^{135,150,151} y que el sistema de puntuación de Noyola, originalmente desarrollado para TC, es aplicable también a la ecografía cerebral. Alarcón *et al* compararon la escala de Noyola previamente validada¹³¹ que incluía calcificaciones, ventriculomegalia y atrofia, con una nueva escala propuesta por el grupo de Alarcón que añadía la disgenesia cerebral y las alteraciones de sustancia blanca. Los hallazgos se clasificaron de 0 a 3. Ambas escalas mostraron una asociación significativa con el resultado (evaluación del neurodesarrollo), aunque la escala de Alarcón fue más precisa para predecir muerte o discapacidad moderada-grave. Sus resultados sugieren que mientras que una ecografía cerebral estrictamente normal predice una evolución favorable, en caso de alteraciones sutiles en la ecografía, la RM es crucial para el pronóstico¹³⁴.

6.3.2. Carga viral

Los recién nacidos con CMVc que tienen una carga viral (CV) en sangre alta tienen mayor riesgo de enfermedad sintomática y secuelas, principalmente HNS. Las cargas virales son mayores en pacientes sintomáticos^{152,153}. También se ha visto que una CV en sangre baja o indetectable se asocia con un menor riesgo de secuelas a largo plazo. Sin embargo, no hay consenso sobre un punto de corte de CV en sangre que permita una estratificación^{154,155}, aunque algunos estudios han mostrado que una CV en sangre neonatal superior a 10.000 copias/mL se asocia con el desarrollo de secuelas a largo plazo (en concreto, el riesgo de HNS aumentaba con CV en sangre ≥ 17.000 copias/mL)¹⁵⁶, y que una viremia <1000 copias/mL tiene un valor predictivo negativo del 95%¹⁵². Sin embargo, Ross *et al*¹⁵⁷ encontraron un bajo nivel predictivo de la CV en sangre en relación al desarrollo de hipoacusia. Observaron que cargas virales <3.500 copias/mL se relacionaban con un bajo riesgo de hipoacusia, pero cargas virales más altas no asociaban un riesgo mayor¹⁵⁷. Se ha intentado establecer la misma relación entre la CV en orina al nacimiento y la presencia de hipoacusia. Boppana *et al*¹⁵⁴ desarrollaron un estudio prospectivo en 76 niños infectados en el que encontraron que el riesgo de desarrollo de hipoacusia era muy pequeño entre los niños con una CV baja en orina ($<5 \times 10^3$) y en sangre ($< 1,0 \times 10^4$)¹⁵⁴. En resumen, no se ha podido establecer un punto de corte claro de CV en el que el riesgo de secuelas esté claramente aumentado, aunque parece claro que cargas virales bajas en sangre y en orina se asocian a un menor riesgo de secuelas.

6.3.3. Tratamiento antiviral

Otro factor pronóstico capaz de modificar el desarrollo de secuelas es el tratamiento antiviral postnatal. El ensayo clínico aleatorizado llevado a cabo por Kimberlin *et al* demostró que el tratamiento con ganciclovir intravenoso (12 mg/kg/día, en 2 dosis) durante 6 semanas disminuía el deterioro auditivo a los 6 y 12 meses en los niños con afectación del SNC y/o hipoacusia¹⁴⁰. Además en el ensayo realizado por Oliver *et al* encontraron que los niños con CMVc sintomático con afectación del SNC que recibían tratamiento con ganciclovir intravenoso tenían menos retrasos en el desarrollo

a los 6 y 12 meses en comparación con los niños no tratados¹⁵⁸. Respecto al uso del valganciclovir oral, el ensayo clínico aleatorizado doble ciego realizado por Kimberlin *et al* comparando 6 semanas frente a 6 meses de tratamiento en niños sintomáticos, demostró unos resultados a largo plazo moderadamente mejores en cuanto a la audición y al desarrollo neurológico en el grupo tratado durante 6 meses, como se ha comentado previamente¹⁴¹.

II. Justificación

Hasta la fecha se desconocen los mecanismos concretos de la transmisión de la infección por CMV al feto. La posibilidad de determinar el riesgo de infección fetal mediante la evaluación inmunológica no invasiva de la respuesta celular T sería una herramienta fundamental en el seguimiento de las gestantes con una infección por CMV. La amniocentesis es un procedimiento invasivo con riesgos asociados y es necesario esperar más de 6-8 semanas desde la infección materna para su realización. El desarrollo de nuevos marcadores de infección fetal no invasivos tiene una gran relevancia, especialmente en el contexto de programas de cribado.

En cuanto a los niños con CMVc actualmente no existe un modelo pronóstico validado que valore el riesgo de secuelas a largo plazo. La valoración de la respuesta celular T en los niños infectados podría ayudar a calcular el riesgo de secuelas de cada individuo.

El grupo colaborador liderado por el Dr. Navarro (Servicio de Microbiología, Hospital Clínico, Valencia) tiene una amplia trayectoria en el estudio de la infección por CMV en distintos tipos de pacientes, especialmente en pacientes trasplantados e inmunodeprimidos. Este grupo ha caracterizado la respuesta T CD4 y CD8 frente al CMV en el trasplante de precursores hematopoyéticos y de órgano sólido y ha establecido los valores de corte de CD4 y CD8 específicos frente al CMV, que confieren protección frente a la enfermedad por CMV en estos pacientes. El grupo también ha desarrollado el primer ensayo clínico que evalúa la aplicación de una estrategia combinada de monitorización de la carga viral y de la respuesta T CMV- específica para guiar el tratamiento anticipado de la infección activa por el CMV en pacientes con un trasplante de progenitores hematopoyéticos.

III. Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

- I. La respuesta celular T materna juega un papel fundamental en el riesgo de transmisión fetal en la infección gestacional por citomegalovirus.
- II. Una pobre respuesta celular T en el neonato con infección congénita por citomegalovirus se asocia a un mayor riesgo de secuelas a largo plazo.
- III. Las alteraciones en resonancia magnética cerebral se asocian con el desarrollo de secuelas a largo plazo en recién nacidos con infección congénita por CMV.

2. Objetivos

2.1. Objetivo primario

Estudiar el papel de la respuesta celular T materna y neonatal en la infección congénita por citomegalovirus.

2.2. Objetivos secundarios




- Estudiar el papel de la respuesta celular T materna en el riesgo de infección fetal por citomegalovirus.
- Estudiar el papel de la respuesta celular T en el neonato con infección congénita por citomegalovirus y su asociación con el desarrollo de secuelas a largo plazo, principalmente hipoacusia neurosensorial y alteraciones neurológicas.
- Establecer el papel de la resonancia magnética cerebral en el pronóstico a largo plazo de los niños con infección congénita por citomegalovirus.

IV. Material, métodos y resultados

1. Artículo primero. The role of the T-cell mediated immune response to Cytomegalovirus infection in intrauterine transmission. Soriano-Ramos M, Esquivel-De la Fuente E, Albert Vicent E, de la Calle M, Baquero-Artigao F, Domínguez-Rodríguez S, Cabanes M, Gómez-Montes E, Goncé A, Valdés-Bango M, Viñuela-Benéitez MC, Muñoz-Chápuli Gutiérrez M, Saavedra-Lozano J, Cuadrado Pérez I, Encinas B, Castells Vilella L, de la Serna Martínez M, Tagarro A, Rodríguez-Molino P, Giménez Quiles E, García Alcázar D, García Burguillo A, Folgueira MD, Navarro D, Blázquez-Gamero D; and CYTRIC Study Group. PLoS One. 2023;18(2):e0281341.

RESEARCH ARTICLE

The role of the T-cell mediated immune response to Cytomegalovirus infection in intrauterine transmission

María Soriano-Ramos^{1,2} *, Estrella Esquivel-De la Fuente² , Eliseo Albert Vicent³, María de la Calle⁴, Fernando Baquero-Artigao⁵, Sara Domínguez-Rodríguez², María Cabanes⁶, Eney Gómez-Montes⁷, Anna Goncé⁸, Marta Valdés-Bango⁸, M^a Carmen Viñuela-Benítez⁹, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez¹⁰ , Jesús Saavedra-Lozano¹⁰, Irene Cuadrado Pérez¹¹, Begoña Encinas¹², Laura Castells Vilella¹³, María de la Serna Martínez¹⁴, Alfredo Tagarro¹⁵, Paula Rodríguez-Molino⁵, Estela Giménez Quiles³, Diana García Alcázar⁷, Antonio García Burguillo¹⁶, María Dolores Folgueira¹⁷, David Navarro³ ‡, Daniel Blázquez-Gamero^{2,18} ‡, the CYTRIC Study Group¹⁸ ¶

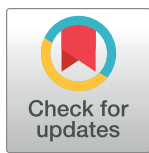
1 Department of Neonatology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **2** Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), Fundación Biomédica del Hospital Universitario 12 de Octubre (FBHU12O), Madrid, Spain, **3** Microbiology Department, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain, **4** Obstetrics Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, **5** Department of Infectious Diseases and Tropical Pediatrics, Hospital Universitario Infantil La Paz, Madrid, Spain, **6** Obstetrics Department, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain, **7** Obstetrics Department, Fetal Medicine Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **8** Fetal Medicine Research Center, BCNatal - Barcelona Center for Maternal-Fetal and Neonatal Medicine (Hospital Clínic and Hospital Sant Joan de Déu), Institut Clínic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **9** Obstetrics Department, Hospital Gregorio Marañón, Complutense University, Health Research Institute Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **10** Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Pediatric Infectious Diseases Unit, Universidad Complutense, Madrid, Spain, **11** Department of Neonatology, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain, **12** Obstetrics Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain, **13** Department of Neonatology, Hospital Universitari General de Catalunya, Grupo Quiron Salud, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain, **14** Department of Neonatology, Hospital Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain, **15** Paediatrics Department, Paediatrics Research Group, Hospital Universitario Infanta Sofía, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain, **16** Obstetrics Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **17** Microbiology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **18** Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, RITIP, Madrid, Spain

 These authors contributed equally to this work.

‡ DN and DBG are co-senior authors on this work.

¶ Membership of the CYTRIC Study Group is provided in the Acknowledgments section.

* sorianoramosmaria@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Soriano-Ramos M, Esquivel-De la Fuente E, Albert Vicent E, de la Calle M, Baquero-Artigao F, Domínguez-Rodríguez S, et al. (2023) The role of the T-cell mediated immune response to Cytomegalovirus infection in intrauterine transmission. PLoS ONE 18(2): e0281341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341>

Editor: Tobias Kaeser, North Carolina State University College of Veterinary Medicine, UNITED STATES

Received: February 13, 2022

Accepted: January 23, 2023

Published: February 6, 2023

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341>

Copyright: © 2023 Soriano-Ramos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data is not publicly available because is protected by European GDPR.

Abstract

Introduction

Prognostic markers for fetal transmission of Cytomegalovirus (CMV) infection during pregnancy are poorly understood. Maternal CMV-specific T-cell responses may help prevent fetal transmission and thus, we set out to assess whether this may be the case in pregnant women who develop a primary CMV infection.

Methods

A multicenter prospective study was carried out at 8 hospitals in Spain, from January 2017 to April 2020. Blood samples were collected from pregnant women at the time the primary

However, can be formally shared under a formal application and research proposal after institutional acceptance. Please send your proposal to the secretary of the 12 de Octubre Hospital Ethics Committee: María Ugalde; e-mail: mugalde.imas12@h12o.es.

Funding: Founders (Spanish Ministry of Science and Innovation Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund) did not play any role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. No commercial company funded the study or played any role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. Grants: 1. Grant PI 16/00807, to DBG, from Spanish Ministry of Science and Innovation Instituto de Salud Carlos III and co-funded by the European Regional Development Fund. 2. Grant 19/01333, to DBG, from Spanish Ministry of Science and Innovation Instituto de Salud Carlos III and co-funded by the European Regional Development Fund. 3. Grant INT20/00086 from Spanish Ministry of Science and Innovation Instituto de Salud Carlos III and co-funded by the European Regional Development Fund. 4. There is no additional external funding received for this study. 5. DBG received received fees from MSD as speaker in educational activities not related to the present study. 6. MSD is not a founder of the study. Sponsors websites: www.isciii.es https://ec.europa.eu/regional_policy/en/funding/erdf.

Competing interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: DBG received fees from MSD as speaker in educational activities. None of the remaining authors have any conflict of interests to declare. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

CMV infection was diagnosed to assess the T-cell response. Quantitative analysis of interferon producing specific CMV-CD8⁺/CD4⁺ cells was performed by intracellular cytokine flow cytometry.

Results

In this study, 135 pregnant women with a suspected CMV infection were evaluated, 60 of whom had a primary CMV infection and samples available. Of these, 24 mothers transmitted the infection to the fetus and 36 did not. No association was found between the presence of specific CD4 or CD8 responses against CMV at the time maternal infection was diagnosed and the risk of fetal transmission. There was no transmission among women with an undetectable CMV viral load in blood at diagnosis.

Conclusions

In this cohort of pregnant women with a primary CMV infection, no association was found between the presence of a CMV T-cell response at the time of maternal infection and the risk of intrauterine transmission. A detectable CMV viral load in the maternal blood at diagnosis of the primary maternal infection may represent a relevant biomarker associated with fetal transmission.

Introduction

In high-income countries, around 50% of women of childbearing age are seronegative for Cytomegalovirus (CMV) [1]. However, 1–7% of these women will be infected by CMV every year, resulting in a prevalence of congenital infection of 0.14–0.7% [1, 2]. Despite the impact of CMV infection, and although it is considered the most common cause of congenital neurodevelopmental delay, several issues remain unclear. Transmission is thought to be dependent on multiple factors, such as maternal and fetal immune systems, placental factors, maternal viral load and viral strain and the time of maternal infection [3, 4]. Timing of fetal infection is a key predictive factor for long term outcomes in children with congenital CMV, and severe sequelae are associated with fetal infection in the embryonic or early fetal period, mainly first trimester of pregnancy [5]. Risk of fetal infection during pregnancy is higher after a primary infection (32–40%) than a non-primary infection (1.4%) [4, 6] and pre-existing immune response does appear to provide some protection from fetal transmission. Nevertheless, it is still not possible to accurately predict if maternal infection will be transmitted to the fetus, and biomarkers currently available including IgG avidity index, have limited prognostic value.

Studies on transplant recipients have also documented the importance of the CMV-specific T-cell response for the control of viral infection [7]. CMV-specific memory T-cells stimulated with peptide pools of CMV proteins IE-1, IE-2, and pp65 in a cultured enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay after maternal primary infection were evaluated by Fornara et al. They found that a higher cultured ELISPOT response was associated with a lower risk of transmission to the fetus [7].

Lillery et al. investigated the specific lymphoproliferative response (LPR) and intracellular cytokine (interferon[IFN]- γ and interleukin [IL]-2) production during the first year after primary CMV infection in 49 pregnant women, finding that transmitter mothers presented a significantly delayed development of the CD4⁺ T-cell LPR, compared with those who did not [8].

Also, they found that the level of CMV-specific memory T-cells during the first months after infection was significantly lower in mothers who were transmitters [9].

Similarly, Revello et al. analyzed specific CD4⁺ T-cells by cytokine flow cytometry and LPR among 74 pregnant women with primary CMV infection. This study showed that LPR to CMV was significantly lowered or delayed in transmitter mothers [10]. However, other studies have shown different results compared to the studies mentioned above. Eldar-Yedidia investigated IFN- γ secretion upon whole blood stimulation from 76 primary CMV-infected pregnant women, with either CMV-peptides or phytohemagglutinin (PHA)-mitogen. The main finding was that low IFN- γ relative response (<1.8%) strongly correlated with absence of transmission [3]. Saldan et al. studied CMV ELISPOT assays in 57 pregnant women with a primary infection, finding that an increase in CMV ELISPOT levels was associated with a higher risk of fetal transmission [11].

Hence, this study aimed to untangle the role of the maternal T-cell response upon diagnosis of a primary maternal infection on the risk of fetal CMV transmission.

Methods

Study design

A multicenter prospective study was carried out at 8 hospitals in Spain, from January 2017 to April 2020. Blood samples were collected from pregnant women when they were diagnosed with a primary CMV infection, and CMV-specific CD8⁺ T lymphocytes (directed against the CMV proteins pp65 and IE-1) that produce IFN- γ (CMV-CD8⁺IFN- γ) were quantified by intracellular cytokine flow cytometry.

All pregnant women with a primary CMV infection were included in the study and although CMV screening during pregnancy is currently not mandatory in Spain [12], some centers perform it on a routine basis (e.g., Hospital La Paz), usually in the first trimester (or at the time of referral). Women with clinical symptoms consistent with CMV infection, with CMV seroconversion or a positive IgM during pregnancy, or with abnormal findings in fetal ultrasound (US), were referred to tertiary centers for further assessment and follow-up. Women with any kind of immunodeficiency or those receiving immunosuppressive therapy were excluded from this study. The study data were collected and managed using the REDCap (Research Electronic Data Capture) application hosted at Instituto de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre (Imas12: Madrid, Spain), a secure, web-based application designed to support data capture for research studies [13].

Sample collection and T cell quantification

Blood samples (5 mL) were obtained in sodium heparin tubes from all the pregnant women recruited onto this study as close to the time of infection as possible. Each sample was sent to Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia, Spain), where they were processed within 24 hours. T-cells were quantified using an intracellular cytokine flow cytometry procedure commercialized by Beckton Dickinson (BD Fastimmune, BDBiosciences, San Jose, CA). Heparinized whole blood (0.5 ml) was simultaneously stimulated for 6 h with two sets of 15-mer overlapping peptides (11-mer overlap) encompassing Cytomegalovirus IE-1 and pp-65 proteins (JPT peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany)) at a concentration of 1 μ g/ml per peptide, in the presence of 1 μ g/ml of costimulatory monoclonal antibodies (mAbs) to CD28 and CD49d. Appropriate positive (phytohemagglutinin) and negative controls were used. Samples mock-stimulated with phosphate-buffered saline (PBS)/dimethyl sulfoxide and costimulatory antibodies were run in parallel. Brefeldin A (10 μ g/ml) was added for the last 4 h of incubation. Blood was then lysed (BD FACS lysing solution) and frozen at -80°C until

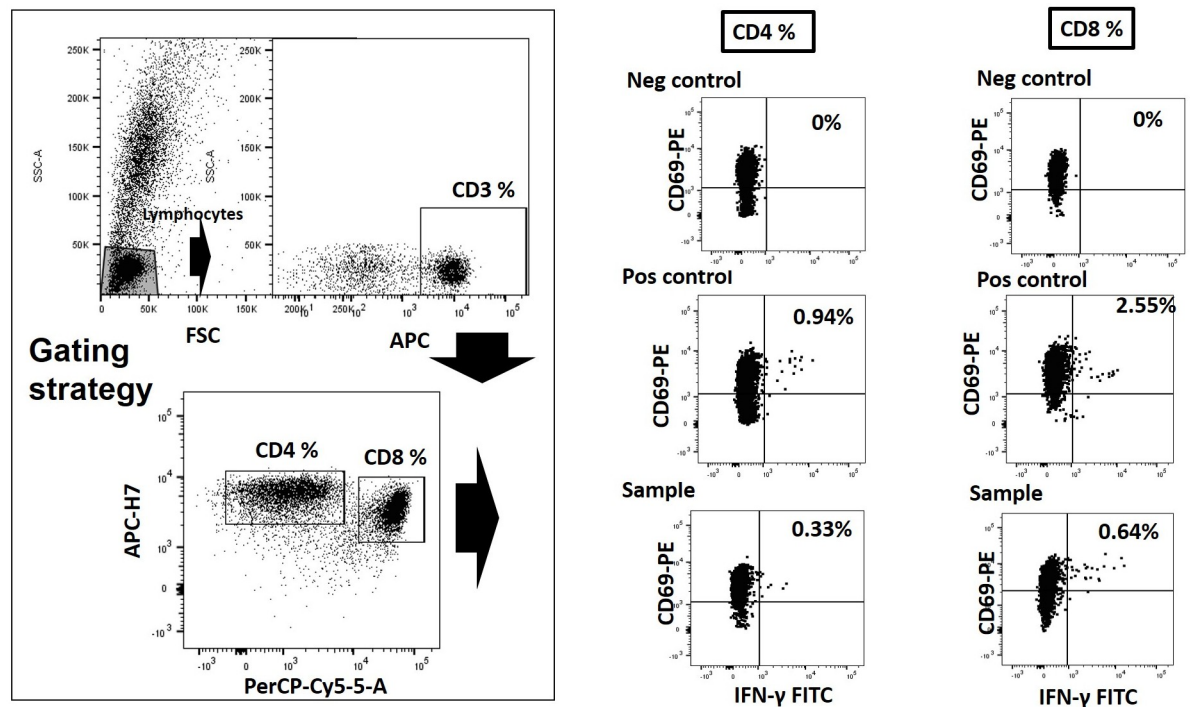


Fig 1. Gating strategy for the enumeration of CMV-specific IFN- γ producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells by Intracellular Cytokine Staining (ICS). Total Lymphocyte/CD3⁺/CD8⁺ or Lymphocyte/CD3⁺/CD4⁺ events were gated and then analyzed for CD69+/IFN- γ production. Positive (Phytohemagglutinin) and negative controls (DMSO) were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.g001>

tested. On the day of testing, stimulated blood was thawed at 37°C, washed, permeabilized (BD permeabilizing solution) and stained with a combination of labeled mAbs (anti-IFN γ -FITC, anti-CD4-APC-H7, anti-CD8-PerCP-Cy5.5, and anti-CD3-APC) for 1 h at room temperature. Cells were then washed, resuspended in 200 μ L of 1% paraformaldehyde in PBS, and analyzed within 2 h on an FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA) using FlowJo software. CD3⁺/CD8⁺ or CD3⁺/CD4⁺ events were gated and then analyzed for CD69+/IFN- γ production. All data were corrected for background CD69+/IFN- γ production and expressed as the percentage of cells producing CD69+/IFN- γ by the total CD8⁺ or CD4⁺ T cells (Fig 1).

Only those samples with more than 1,000 events through the CD69/IFN γ window were considered valid. The total number of CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes producing IFN- γ was calculated based on the positive events, and the absolute CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte count. Specific CD8 and CD4 responses against CMV were defined as >0.1%.

Definitions

Primary CMV infection. Was defined as the presence of CMV seroconversion during pregnancy, or positive IgM and IgG detection with a low avidity index (<50%) [14].

Intrauterine fetal infection was. Diagnosed by detection of viral DNA by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR), either in amniotic fluid (AF) or the newborn's urine (first 14 days of life). If the woman had not yet delivered, she was considered a non-transmitter if the real time-PCR in AF was negative.

Fetal infection by CMV. Was diagnosed by positive CMV-PCR detection in AF or fetal blood obtained by cordocentesis.

Congenital CMV infection. (cCMV) was considered if the infant presented a positive CMV-PCR in urine within the first 14 days of life.

The limit of blood VL detection. Differed among participating hospitals: 12 de Octubre (120 IU/mL), La Paz (1000 IU/mL), Clínic Barcelona (20 IU/mL), Gregorio Marañón (100 IU/mL), Puerta de Hierro (35 IU/mL), Getafe (120 IU/mL), Infanta Sofía (500 IU/mL), General de Catalunya (150 IU/mL). To assess the IgG avidity index, a chemiluminescence based Abbott Alinity diagnostic platform was used.

Symptomatic fetal infection. [15] was defined as the presence of abnormalities compatible with CMV infection detected by US and/or fetal magnetic resonance image (MRI), and/or abnormalities in fetal blood obtained by cordocentesis (thrombocytopenia and/or anemia).

Symptomatic infection at birth. Was defined as the presence of abnormal physical features (jaundice, petechiae/purpura, splenomegaly and/or hepatomegaly, hypotonia, seizures, paresis, or weak sucking), chorioretinitis, sensorineural hearing loss (SNHL), small for gestational age (SGA), thrombocytopenia (platelet count $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$), elevated alanine aminotransferase levels (>80 IU/L), hyperbilirubinemia (direct bilirubin >2 mg/dL), microcephaly or neuroimaging abnormalities compatible with cCMV in cranial US/MRI. Newborns who did not fulfil any of the aforementioned criteria after a complete evaluation at birth were considered asymptomatic cCMV. SGA was defined as a birth weight below a standard deviation (SD) of -2 for gestational age (GA) [16]. Microcephaly was defined as a head circumference below -2 SD for GA [16]. SNHL was defined as a hearing threshold >25 dB when tested by Auditory Brainstem Response in either ear, and it was evaluated at birth and 12 months of age.

Statistical analysis

The descriptive statistics of the patient's characteristics were presented as frequencies (n) and percentages (%) in the case of categorical variables, and the median and interquartile range (IQR) for continuous variables. A χ^2 test or Fisher's exact test (if the expected number in any cell was <5) was applied to assess the differences between groups of categorical variables, and a Mann-Whitney U test for continuous variables. A logistic regression analysis was used to assess the association between a positive response of CD8 and CD4 lymphocytes in IFN- γ production on intrauterine CMV transmission. The continuous variable, the percentage of CD8 and CD4 lymphocyte IFN- γ production, was converted into categorical data based on a cut-off point of 0.1%, as used elsewhere [17], considering values above 0.1% as the presence of specific CD8 and CD4 responses against CMV. The time of maternal infection was estimated from the relative avidity in a linear regression analysis calculated based on the technical data provided by the supplier of the avidity assay (Abbott, Architect CMV IgG Avidity). The multivariate models were adjusted based on any preventive treatment with hyperimmune globulin (HIG) and valacyclovir, and the time from maternal infection to CD4 and CD8 sampling. Backward stepwise elimination was applied to reach the final multivariate model and Akaike information criteria (AIC) were used to identify the best-fitting model. As a result, the odds ratio (OR) and associated 95% confidence interval (CI) were obtained for each adjusted univariate and multivariate model. A p-value <0.05 was considered statistically significant and R software (R Core Team, 2015) was used for analysis.

Ethics

The study was approved by the Institutional Review Board at the Hospital 12 de Octubre (IRB number: 17/007). Written informed consent was requested from all women included for clinical data collecting (about their pregnancies and their newborns) and blood sampling.

All the procedures were in accordance with the Helsinki Declaration (1964, recently amended in 2008) of the World Medical Association.

Results

Blood samples were collected from 135 pregnant women with suspected CMV infection (Fig 2), of which 23 (17%) were excluded because the blood sample ($n = 9$) or the total lymphocyte count was not available ($n = 2$), the sample could not be analyzed because the conditions were inappropriate ($n = 11$) or the fetal transmission status was unknown at the time of the analysis ($n = 1$). Of the remaining 112 women, 60 experienced a primary CMV infection (53.6%), 5 a non-primary infection (4.5%) and in 3 cases it was periconceptual (2.7%). Serological data were not available for the remaining 44 pregnant women (38.9%) and hence, they could not be classified as primary or non-primary infections.

Data from the group of 60 pregnant women with a primary CMV infection was analyzed (Table 1). Twenty-four of them were transmitters, while 36 were non-transmitters. The median GA at maternal infection was 10 weeks (IQR 5–15.5) and it was higher in transmitter mothers (12.5[8.75–19.0] vs. 8[3.50–13.0], $p = 0.013$). There were four terminations of pregnancy (6.7%), most due to CMV-related fetal abnormalities evident by US (3/4) but one due to confirmed fetal infection without detecting US abnormalities at that time. Most pregnancies reached full term (91%, 51/56) and the median GA at delivery was 39.0 weeks (IQR = 38.0–40.0). The lowest GA was 32⁺⁴ weeks, which was a threatened preterm labour secondary to premature rupture of membranes at 31 weeks. Interestingly, the presence of other children in the family attending day-care was more frequent in the transmitter group (56.5% vs 20%, $p = 0.01$).

The CMV-VL in blood was available for 29 women (29/60, 48.3%) and CMV was detected in 6 of them (6/29, 20.7%), all transmitters ($p = 0.004$). None of the women with an undetectable VL in blood transmitted the infection to the fetus. In non-transmitter mothers the blood VL was determined earlier in pregnancy (16.6[14.1–26.4] vs. 28.4[24.6–29.4] weeks).

Amniocentesis was performed on 55 women (Fig 2), and the AF of 19 (34.6%) returned a positive CMV-PCR. Congenital infection was confirmed at birth in all but one of these cases (18/19, 94.7%). In this unconfirmed case, the VL in AF was very low (63.5 IU/mL) and this mother was treated with a single dose of HIG after the procedure at 23 weeks' gestation. Among the 36 mothers from whom the AF gave a negative CMV-PCR (36/55, 65.5%), most

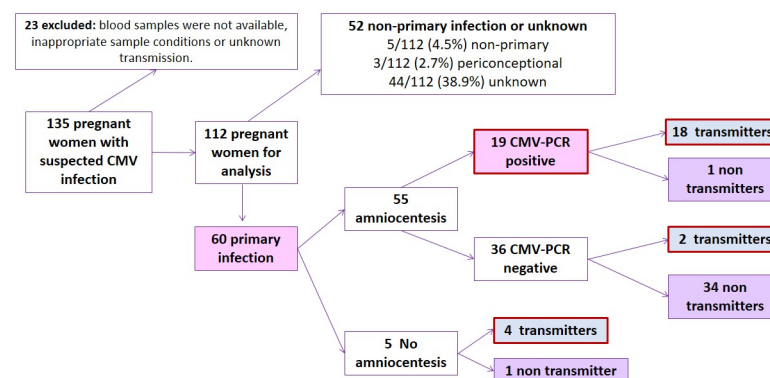


Fig 2. Patient flowchart. Flowchart showing outcome of 135 pregnant women with suspected Cytomegalovirus infection. CMV indicates Cytomegalovirus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.g002>

Table 1. Demographic data of the 60 women with a primary CMV infection during pregnancy studied here.

	All women included (n = 60)	Non-transmitter (n = 36)	Transmitter (n = 24)	p-value	
		n (%)			
Age at diagnosis	34.0 [31.4;36.5]	33.4 [30.2;36.5]	34.8 [32.0;36.6]	0.355	
Reason for diagnosis				0.292	
Maternal seroconversion	19 (32.2)	8 (22.9)	11 (45.8)		
Positive IgM and IgG with low avidity index	20 (33.9)	14 (40.0)	6 (25.0)		
Antenatal fetal US/MIR abnormalities	2 (3.4)	1 (2.9)	1 (4.2)		
Maternal symptomatic infection	10 (16.9)	6 (17.1)	4 (16.7)		
Contact with CMV infected person	1 (1.7)	1 (2.9)	0 (0)		
Screening during pregnancy (serology)	6 (10.2)	5 (14.3)	1 (4.2)		
Children under 3 years	39 (66.1)	23 (65.7)	16 (66.7)	1.000	
Mother works with children	4 (7.1)	2 (5.9)	2 (9.1)	1.000	
Children in day-care	20 (34.5)	7 (20.0)	13 (56.5)	0.010	
Symptomatic infection	29 (48.3)	18 (50.0)	11 (45.8)	0.958	
Lymphadenitis	1 (1.7)	1 (2.8)	0 (0)	1.000	
Infectious hepatitis	6 (10.0)	3 (8.3)	3 (12.5)	0.675	
Mononucleosis	7 (11.7)	5 (13.9)	2 (8.3)	0.691	
Fever	14 (23.3)	10 (27.8)	4 (16.7)	0.493	
Other	11 (18.3)	5 (13.9)	6 (25.0)	0.321	
Time of primary infection (first part of the interval)	11.5	10	12.0	0.032	
Time of primary infection (second part of the interval)	20.0	15.0	21.0	0.056	
Gestational age at infection	10.0 [5.0;15.5]	8.00 [3.5;13.0]	12.5 [8.8;19.0]	0.013	
Type of delivery				0.202	
	Vaginal	40 (75.5)	25 (75.8)	15 (75.0)	
	Cesarean-section	9 (17.0)	4 (12.1)	5 (25.0)	
	Instrumental	4 (7.6)	4 (12.1)	0 (0)	
Gestational age at delivery	39.0 [38.0;40.0]	39.0 [38.0;40.0]	39.0 [38.0;40.0]	0.362	
Avidity	23.6 [18.2;31.7]	24.0 [18.0;32.3]	22.0 [20.0;28.0]	0.546	
Low avidity index (< 50%)	44 (80.0)	26 (78.8)	18 (81.8)	1.000	
Positive IgM	57 (96.6)	34 (97.1)	23 (95.8)	1.000	
Blood viral load (IU/ml) Median (IQR)	0.0 [0.0;0.0]	0.0 [0.0;0.0]	0.0 [0.0;159]	0.003	
Blood viral load (IU/ml) Mean (SD)	414 (1821)	0.00 (0.00)	955 (2730)	0.231	
Detectable viral load in blood (n = 29)	6/29 (20.7)	0/16 (0)	6/13 (46.2)	0.004	
Gestational age at blood viral load (n = 30)	22.6 [16.2;29.1]	16.6 [14.1;26.4]	28.4 [24.6;29.4]	0.005	
Urine viral load (IU/ml)	432 [139;3357]	218 [0.0;424]	2020 [484;6150]	0.064	
Detectable viral load in urine (n = 16)	12/16 (75.0)	5/8 (62.5)	7/8 (87.5)	0.569	
Amniocentesis	55 (91.7)	35 (97.2)	20 (83.3)	0.147	
Positive PCR in amniotic fluid	19 (34.5)	1 (2.9)	18 (90.0)	< 0.001	
Gestational age at amniocentesis	21.0 [20.0;26.0]	21.0 [20.0;26.0]	22.5 [20.0;28.0]	0.650	
Fetal US 3rd trimester				0.057	
Normal	46 (80.7)	31 (91.2)	15 (65.2)		
CNS abnormalities	2 (3.5)	0 (0)	2 (8.7)		
Non-CNS abnormalities	6 (10.5)	2 (5.9)	4 (17.4)		
CNS and non-CNS abnormalities	3 (5.3)	1 (2.9)	2 (8.7)		
Fetal MRI				0.389	
Normal	11 (61.1)	0 (0)	11 (64.7)		
CNS abnormalities	5 (27.8)	1 (100)	4 (23.5)		

(Continued)

Table 1. (Continued)

	All women included (n = 60)	Non-transmitter (n = 36)	Transmitter (n = 24)	p-value
Non-CNS abnormalities	2 (11.1)	0 (0)	2 (11.8)	
Hyperimmune globulin	20 (33.3)	6 (16.7)	14 (58.3)	0.002
Preventive	6 (30.0)	5 (83.3)	1 (7.1)	0.002
Treatment in infected fetuses	14 (70.0)	1 (16.7)	13 (92.9)	0.002
Gestational age at HIG	23.5 [21.0,28.2]	18.5 [13.2;22.2]	24.8 [22.2;29.8]	0.008
Valacyclovir	10 (16.7)	1 (2.8)	9 (37.5)	0.001
Preventive	2 (3.3)	1 (2.8)	1 (4.2)	0.200
Treatment in infected fetuses	8 (80)	0 (0.00)	8 (88.9)	0.200
Gestational age at valacyclovir	24.5 [22.5;26.5]	10.0 [10.0;10.0]	25.0 [24.0;27.0]	0.115
Newborn				
CMV congenitally infected	20 (37.0)	0 (0)	20 (100)	< 0.001
Abnormal physical exam	2 (3.6)	0 (0)	2 (10.0)	0.128
Symptomatic at birth	11 (57.9)	0 (0)	11 (57.9)	NA

Qualitative variables are expressed as the median and IQR (interquartile range): US, Ultrasound; MRI, Magnetic Resonance Imaging; CNS, Central nervous system; PCR, Polymerase Chain Reaction; HIG, Hyperimmune globulin; NA, Not applicable; SD: Standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.t001>

were non-transmitters but 2 of the neonates had cCMV (2/36, 5.6%). Of 5 mothers on whom amniocentesis was not performed, four were transmitters (80%).

There were 20 women (33.3%) treated with CMV-HIG (200 IU/kg intravenous), 14 transmitters (14/24, 58.3%) and 6 non-transmitters (6/36, 16.7%). HIG was given after maternal infection in 6 cases (preventive treatment) and after confirmed fetal infection in 14 cases, all with positive AF PCR. Two pregnant women were treated with valacyclovir (2 g/6 hours/po) before amniocentesis (preventive treatment) and 8 women received valacyclovir if CMV-PCR in AF was positive. Finally, 20 newborns were congenitally infected by CMV (20/56, 36%), 11 of whom were symptomatic at birth (55%).

There was a broad dispersion of the CMV-CD8+IFN- γ and CMV-CD4+IFN- γ lymphocyte counts (Fig 3), and in the univariate analysis there were no significant differences among the transmitter and non-transmitter women in terms of the CMV-CD4+IFN- γ and CMV-CD8+IFN- γ counts and percentages (Table 2). Two multivariate logistic regression models were built for CD4 and CD8 responses, with other relevant clinical variables like preventive treatment with HIG/valacyclovir, and the time from maternal infection to the T-cell response included in models 1 and 2 (Table 3). Neither of these models found an association between intrauterine transmission and specific CD4 or CD8 responses (Figs 4 and 5, respectively). Nevertheless, it should be noted that in model 2 (Table 3), an interaction was found between the CD8-specific response and the time between infection to blood sampling. This model showed that the effect of the time from maternal infection to blood sample collection on IFN- γ production by CMV-CD8+IFN- γ lymphocytes decreased 15.1% on each passing week. Thus, the longer the time interval from infection to blood sampling, the weaker the effect of CMV-CD8+IFN- γ on intrauterine CMV transmission (Fig 5).

Discussion

In this cohort of pregnant women with a primary CMV infection, we were unable to find an association between the specific CD4 and CD8 responses against CMV at the time primary infection was diagnosed and the risk of fetal transmission. Many studies have demonstrated

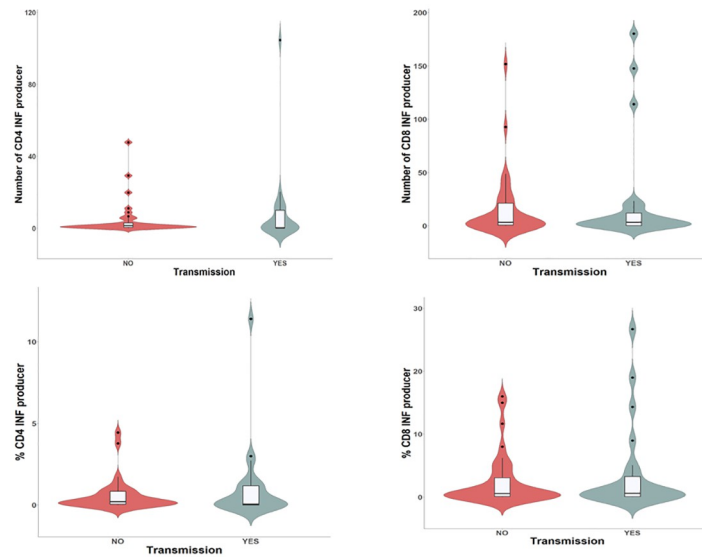


Fig 3. T-cell mediated immune response. Violin plot showing the lymphocyte count and the association of CMV-CD8⁺IFN- γ , and CMV-CD4⁺IFN- γ with transmission.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.g003>

the essential role of T-cell immunity in controlling CMV infection. Indeed, in a cohort of pregnant women with primary CMV infection the LPR to CMV was seen to be significantly dampened or delayed in transmitter mothers [10]. Similarly, a significant delay in the development of the CD4⁺T-cell LPR was detected in transmitter mothers [8, 18, 19]. However, contrasting findings have also been reported, for example in a study showing that strong cellular responses to CMV in the presence of low IgG avidity was correlated with CMV transmission during primary maternal infection [11]. Also, a low IFN- γ relative response was associated with a reduction in the probability of CMV transmission in a cohort of pregnant women with a primary infection [3]. Authors hypothesized that a stronger cellular response might be correlated with longer and more intense viremia, leading to a proinflammatory environment at the placenta that facilitates virus passage [11, 20].

In some of the aforementioned studies [3, 8, 10], blood samples were collected sequentially, which may provide additional information about the temporal changes to the specific maternal T-cell response. By contrast, here we collected a single blood sample at the time of maternal infection and a distinct evolution of T-cell responses may have existed between groups that went undetected. However, if maternal specific T-cell response is to be used as a biomarker of fetal infection to help clinicians in the management of these patients, it should be an early predictive tool of fetal infection.

Also, we found that GA at maternal infection was significantly higher in transmitter than in non-transmitter mothers, in accordance with previous studies [21–23]. Risk of fetal infection increases with gestational age at maternal infection [24]. In accordance with this finding, transmitter group had a higher gestational age at maternal infection and blood viral load was evaluated later in pregnancy in this group.

Although transmission rates increased with GA, severe long-term sequelae appear to be limited to maternal infections acquired before 14 weeks' gestation [5, 25]. In primary infections during pregnancy the average rate of fetal transmission is 32% [24], similar to the rate observed in this study (40%).

CMV was detected in blood VL in 6 out of 29 women, all transmitters, finding no significant differences in urine VL between groups. When the presence of CMV-DNA in urine and

Table 2. Results of the bivariate analysis of the T-cell immune response in women with a primary CMV infection.

	All women included (n = 60)	Non-transmitter (n = 36)	Transmitter (n = 24)	OR (CI 95%)	p-value
	Median (IQR)				
Gestational age at blood sample collection	26.0 [21.0;31.2]	25.5 [21.0;28.2]	26.5 [22.8;32.2]	NA	0.290
Total lymphocyte count	2300 [1955;2620]	2305 [2062;2665]	2195 [1822;2502]		0.236
% CD3-CD8 ⁺ T cells	24.6 [17.3;33.1]	27.0 [21.1;34.1]	23.9 [13.7;32.6]		0.330
Total count CD3-CD8 ⁺ T cells	579 [376;775]	579 [407;908]	574 [291;684]		0.381
% CMV-specific CD8 ⁺ IFN γ T cells	0.58 [0.10;3.07]	0.54 [0.11;3.07]	0.58 [0.08;3.25]	1.039 (0.943–1.153)	0.988
Total count CMV-specific CD8 ⁺ IFN γ T cells	3.31 [0.63;18.7]	3.31 [0.76;21.3]	3.33 [0.24;12.1]	1.005 (0.991–1.02)	0.868
% CD3-CD4 ⁺ T cells	36.8 [23.1;43.0]	37.5 [28.3;42.9]	36.8 [16.9;44.9]	NA	0.639
Total count of CD3-CD4 ⁺ T cells	778 [427;1020]	836 [583;1030]	701 [364;945]		0.196
% CMV-specific CD4 ⁺ IFN γ T cells	0.15 [0.02;0.88]	0.20 [0.05;0.84]	0.04 [0.00;1.18]	1.171 (0.848–1.843)	0.251
Total count CMV-specific CD4 ⁺ IFN γ T cells	0.96 [0.14;5.19]	1.44 [0.57;2.99]	0.23 [0.00;10.0]	1.014 (0.979–1.064)	0.195
Positive CD8 response (>0.1% IFN γ)	43 (71.7%)	27 (75.0%)	16 (66.7%)	0.667 (0.212–2.104)	0.682
Positive CD4 response (>0.1% IFN γ)	30 (52.6%)	19 (57.6%)	11 (45.8%)	0.623 (0.213–1.791)	0.543

Total count and percentages of CD3-CD8⁺ and CD3-CD4⁺ T lymphocytes are shown, as well as the total counts and percentages of CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes producing IFN- γ : IQR, Interquartile range; OR, Odds ratio; CI, Confidence Interval; NA, Not applicable (univariate analysis was not performed).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.t002>

blood was studied in pregnant women with a primary infection, an association was seen between the presence of CMV-DNA in maternal blood or urine, fetal transmission [26] and congenital infection [27, 28]. Our data support the hypothesis that a detectable CMV-VL in maternal blood upon diagnosis of a primary infection could represent a relevant biomarker of intrauterine transmission. However, it should be noted that the threshold defining “detectable”/“undetectable” blood VL differs widely among participating hospitals, which may represent a limitation to the use of this parameter.

Another relevant finding was the higher proportion of children attending day-care in families of transmitter mothers. Prolonged and close contact with children <3 years of age has been associated with a higher risk of maternal infection [1]. Here, two-thirds of the cohort lived with at least one child <3 years, although the proportion of children attending day-care

Table 3. Multivariate models of T-cell immune response.

Multivariate models	CD4 dichotomous analysis		
Model 1		Adjusted OR (CI 95%)	p-value
	CD4 Response	0.529 (0.17–1.581)	0.259
	Preventive HIG	0.208 (0.009–2.034)	0.216
	Time from infection (avidity)	0.939 (0.866–1.01)	0.1
	CD4 Response by time (avidity)	0.893 (0.734–1.056)	0.211
Model 2	CD8 dichotomous analysis		
		Adjusted OR (CI 95%)	p-value
	CD8 Response	6.411 (0.475–108.898)	0.173
	Preventive HIG	0.177 (0.008–1.715)	0.171
	Time from infection (avidity)	1.019 (0.902–1.155)	0.761
	CD8 Response by time (avidity)	0.849 (0.702–1.005)	0.068

Results of the immune T-cells in adjusted multivariate analysis on women with a primary CMV infection for CD4 and CD8 dichotomous analysis according to the CD4 and CD8 response (positive if > 0.1%): HIG, Hyperimmune globulin; OR, Odds ratio; CI, Confidence Interval.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.t003>

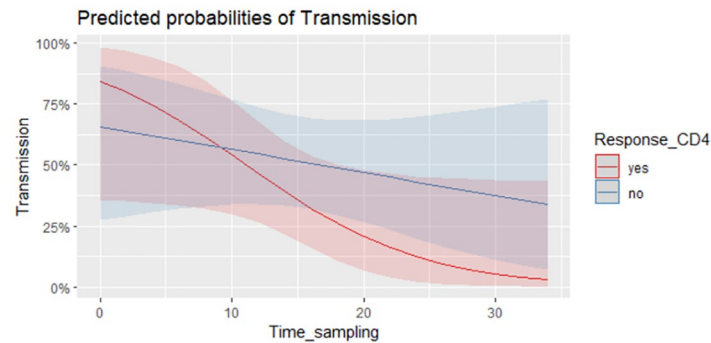


Fig 4. CMV-CD4+IFN- γ lymphocytes relation with time between infection to blood sampling. Model showing the time interval from infection to blood sampling against the predicted probability of CMV intrauterine transmission in women presenting a positive CD4 response (% of CD8-g-IFN producers above 0.1 in red) or not (in blue).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.g004>

was significantly higher among transmitter mothers. Children attending day-care were previously seen to more often shed CMV (69%) than those cared for at home (10%) and in that study, the risk of seroconversion in parents from children shedding CMV was higher in the day-care group [29]. Thus, women with children attending day-care seem to be at a higher risk of CMV infection and of transmitting this to their fetus, although we do not have a biological explanation for this phenomenon.

In addition, it should be noted that the studies related to this work present methodological differences, since each one examines a particular area of the CMV-specific cellular response and in a different way. In recent years, the simple tools Quantiferon and ELISPOT assay have been largely used to detect antigen-specific T-cell responses. Using Quantiferon, Eldar-Yedidia et al. [3] demonstrated an association between high IFN- γ relative response to CMV and high risk of fetal transmission by measuring secretion of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-6. In addition, a higher response detected by the ELISPOT assay was shown to be associated with an increased risk of congenital infection [11]. Also, Fornara et al. investigated peptide pools of CMV proteins IE-1, IE-2, and pp65 in a cultured ELISPOT assay, the determination of which, in association with avidity index and DNAemia was found to be useful to assess the risk of fetal transmission [7]. Other studies, such as the one by Lillery and colleagues [8] was based on the CMV-specific LPR and the measurement of IFN- γ and IL-2 production by CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. The same author in another publication investigated the membrane phenotype (CCR7

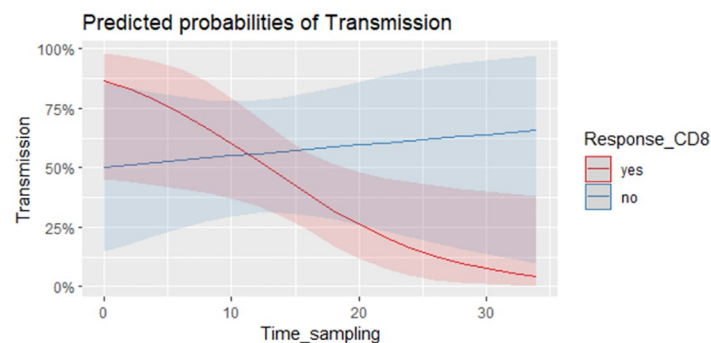


Fig 5. Interaction time-effect of CMV-CD8+IFN- γ lymphocytes. Model showing the time interval from infection to blood sampling against the predicted probability of CMV intrauterine transmission in women presenting a positive CD8 response (% of CD8-g-IFN producers above 0.1 in red) or not (in blue).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281341.g005>

and CD45RA expression) of and intracellular cytokine (IFN- γ and IL-2) production by CMV-specific T-cells (stimulated with CMV-infected dendritic cells) [9]. Other authors have focused on cytotoxicity or TNF production, such as Revello et al. [10] who examined for CMV-specific CD4⁺ T-cells by cytokine flow cytometry and LPR analysis frequencies of CD4⁺, CD69⁺, and TNF- α ⁺ T-cells. Thus, the wide variety of antigens, peptides and methods may justify the enormous complexity and the large magnitude that encompasses the specific T-cell response to CMV.

This study presents some limitations. First of all, sample size is limited. In order to include more patients we have performed a multicentric and prospective study in 8 hospitals. However, CMV screening during pregnancy is not mandatory in Spain and even in multicentric studies is difficult to recruit patients. Second, the time at which blood samples were collected for analysis differed among patients. Ideally, samples were obtained at the time of diagnosis of maternal infection, yet many women were referred from another center where the patient's sample was collected. Therefore, there might have been a delay between the moment in which maternal infection was suspected and blood samples were collected. For this reason, and because the exact date of maternal infection was very challenging to establish, we have adjusted the multivariate analysis from the estimated time of maternal infection (according to the avidity test) to blood sample collection. Third, maternal blood VL was only available in a subset of women and it was therefore not included in the final multivariate model. Another limitation is that a small proportion of women were treated with HIG (n = 6) and/or valacyclovir (n = 2) prior to amniocentesis. Different treatment protocols at centers may have modified maternal viremia and they may have some influence on the risk of fetal infection, as indicated previously [30, 31]. Therefore, we decided to adjust the models based on the preventive treatment during pregnancy (HIG and/or antiviral). Finally, functional specificities of CMV-specific T-cells other than IFN- γ production (i.e cytotoxicity or TNF-alpha production) were not assessed.

In conclusion, in this cohort of pregnant women with primary CMV infection, we did not find an association between the presence of specific CD4 and CD8 responses against CMV at the time of maternal infection and the risk of fetal transmission. The detection of CMV in maternal blood at diagnosis may be considered a promising predictor of intrauterine transmission. However, further studies will be needed to better understand the role of CD4 and CD8 responses against CMV in the risk of fetal infection, and to find useful biomarkers that help us to better predict the risk of transmission during pregnancy.

Acknowledgments

We would like to thank all the participants in this study for their kind support as well as the collaborators of the CYTRIC Study Group: Judith Hernández, Raquel Pinillos Pisón, Marie Antoinette Frick, Eneritz Velasco Arnaiz, Antoni Noguera Julian, Claudia Fortuny Guasch, María Ríos Barnés, Pablo Rojo, Cristina Epalza, Cinta Moraleda, Elisa Fernández Cooke, Luis Prieto, Jaime Carrasco, Berta Zamora, Joaquín de Vergas, Ana Martínez de Aragón, Noemí Núñez Enamorado, Rogelio Simon, Ana Camacho, Serena Villaverde, Fátima Machín, María Luz Romero, Miquel Serna, Marta Martín, Eva Dueñas, Miguel Sánchez Mateos. Also, we would like to thank Jose María Aguado for his contribution to the work and to Dr. Mark Sef-ton for his help in correcting the English.

Author Contributions

Conceptualization: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Enery Gómez-Montes, Anna Goncé, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-

Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Data curation: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncé, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Formal analysis: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncé, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Funding acquisition: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Sara Domínguez-Rodríguez, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Investigation: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncé, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Methodology: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Anna Goncé, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Project administration: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncé, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Antonio García Burguillo, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Resources: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, Eney Gómez-Montes, Anna Goncé, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez,

Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Software: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Sara Domínguez-Rodríguez, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Supervision: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncá, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Validation: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncá, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Visualization: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncá, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Writing – original draft: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncá, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

Writing – review & editing: María Soriano-Ramos, Estrella Esquivel-De la Fuente, Eliseo Albert Vicent, María de la Calle, Fernando Baquero-Artigao, Sara Domínguez-Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncá, Marta Valdés-Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Jesús Saavedra-Lozano, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Laura Castells Vilella, María de la Serna Martínez, Alfredo Tagarro, Paula Rodríguez-Molino, Estela Giménez Quiles, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, María Dolores Folgueira, David Navarro, Daniel Blázquez-Gamero.

References

1. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(1):86–102. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-12> PMID: 23297260
2. Blázquez-Gamero D, Soriano-Ramos M, Vicente M, Pallás-Alonso CR, Pérez-Rivilla A, García-Álvarez M, et al. Prevalence and Clinical Manifestations of Congenital Cytomegalovirus Infection in a Screening

- Program in Madrid (PICCSA Study). *Pediatr Infect Dis J*. 2020; 39(11):1050–1056. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002808> PMID: 32773658
3. Eldar-Yedidia Y, Bar-Meir M, Hillel M, Abitbol G, Broide E, Falk R, et al. Low Interferon Relative-Response to Cytomegalovirus Is Associated with Low Likelihood of Intrauterine Transmission of the Virus. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0147883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147883> PMID: 26881863
 4. Fowler KB. Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(7):1035–1037. <https://doi.org/10.1086/382533> PMID: 15034839
 5. Faure-Bardon V, Magny JF, Parodi M, Couderc S, Garcia P, Maillotte AM, et al. Sequelae of Congenital Cytomegalovirus Following Maternal Primary Infections Are Limited to Those Acquired in the First Trimester of Pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2019; 69(9):1526–1532. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1128> PMID: 30596974
 6. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol*. 2007; 17(4):253–276. <https://doi.org/10.1002/rmv.535> PMID: 17579921
 7. Fornara C, Cassaniti I, Zavattoni M, Furione M, Adzasehoun KMG, De Silvestri A, et al. Human cytomegalovirus-specific memory CD4+ T-cell response and its correlation with virus transmission to the fetus in pregnant women with primary infection. *Clin Infect Dis*. 2017; 65(10):1659–1665. <https://doi.org/10.1093/cid/cix622> PMID: 29020188
 8. Lilleri D, Fornara C, Furione M, Zavattoni M, Revello MG, Gerna G. Development of human cytomegalovirus-specific T cell immunity during primary infection of pregnant women and its correlation with virus transmission to the fetus. *J Infect Dis*. 2007; 195(7):1062–1070. <https://doi.org/10.1086/512245> PMID: 17330798
 9. Lilleri D, Fornara C, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific memory CD8+ and CD4+ T cell differentiation after primary infection. *J Infect Dis*. 2008; 198(4):536–543. <https://doi.org/10.1086/590118> PMID: 18590456
 10. Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Genini E, Comolli G, et al. Lymphoproliferative response in primary human cytomegalovirus (HCMV) infection is delayed in HCMV transmitter mothers. *J Infect Dis*. 2006; 193:269–276. <https://doi.org/10.1086/498872> PMID: 16362891
 11. Saldan A, Forner G, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Strong Cell-Mediated Immune Response to Human Cytomegalovirus Is Associated With Increased Risk of Fetal Infection in Primarily Infected Pregnant Women. *Clin Infect Dis*. 2015; 61(8):1228–1234. <https://doi.org/10.1093/cid/civ561> PMID: 26175520
 12. Baquero-Artigao F. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por Citomegalovirus. [Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection]. *An Pediatr*. 2009; 71(6):535–547. PMID: 19815469
 13. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inf*. 2009; 42:377–381. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2008.08.010> PMID: 18929686
 14. Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21(10):1377–1384. <https://doi.org/10.1128/CVI.00487-14> PMID: 25165026
 15. Leruez-Ville M, Stirnemann J, Sellier Y, Guilleminot T, Dejean A, Magny JF, et al. Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 215(3):342.e1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.03.052> PMID: 27063062
 16. Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics*. 2010; 125:e214–e224. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-0913> PMID: 20100760
 17. San-Juan R, Navarro D, García-Reyne A, Montejo M, Muñoz P, Carratala J, et al; REIPI Network. Effect of long-term prophylaxis in the development of cytomegalovirus-specific T-cell immunity in D+/R- solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2015; 17(5):637–646. <https://doi.org/10.1111/tid.12417> PMID: 26134282
 18. Lilleri D, Gerna G. Maternal immune correlates of protection from human cytomegalovirus transmission to the fetus after primary infection in pregnancy. *Rev Med Virol*. 2017; 27(2). <https://doi.org/10.1002/rmv.1921> PMID: 28008685
 19. Mele F, Fornara C, Jarrossay D, Furione M, Arossa A, Spinillo A, et al. Phenotype and specificity of T cells in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy: IL-7Rpos long-term memory

- phenotype is associated with protection from vertical transmission. *PLoS One*. 2017; 12(11):e0187731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187731> PMID: 29112951
20. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2000; 137:90–95. <https://doi.org/10.1067/mpd.2000.107110> PMID: 10891828
 21. Chiopris G, Veronese P, Cusenza F, Procaccianti M, Perrone S, Daccò V, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Diagnosis and Treatment. *Microorganisms*. 2020; 8(10):1516. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101516> PMID: 33019752
 22. Revello MG, Fabbri E, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol*. 2011; 50(4):303–307. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.12.012> PMID: 21277825
 23. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol*. 2011; 52(3):244–246. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.005> PMID: 21820954
 24. Leruez-Ville M, Foulon I, Pass R, Ville Y. Cytomegalovirus infection during pregnancy: state of the science. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223(3):330–349. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.018> PMID: 32105678
 25. Chatzakis C, Ville Y, Makrydimas G, Dinas K, Zavlanos A, Sotiriadis A. Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223(6):870–883.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.05.038> PMID: 32460972
 26. Forner G, Saldan A, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay but Not CMV QuantiFERON Assay Is a Novel Biomarker To Determine Risk of Congenital CMV Infection in Pregnant Women. *J Clin Microbiol*. 2016; 54(8):2149–2154. <https://doi.org/10.1128/JCM.00561-16> PMID: 27280418
 27. Delforge ML, Costa E, Brancart F, Goldman D, Montesinos I, Zaytouni S, et al. Presence of cytomegalovirus in urine and blood of pregnant women with primary infection might be associated with fetal infection. *J Clin Virol*. 2017; 90:14–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.03.004> PMID: 28319846
 28. Simonazzi G, Cervi F, Zavatta A, Pellizzoni L, Guerra B, Mastroroberto M, et al. Congenital cytomegalovirus infection: prognostic value of maternal DNAemia at amniocentesis. *Clin Infect Dis*. 2017; 64(2):207–210. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw700> PMID: 27986666
 29. Pass RF, Hutto C, Ricks R, Cloud GA. Increased rate of cytomegalovirus infection among parents of children attending day-care centers. *N Engl J Med*. 1986; 314(22):1414–1418. <https://doi.org/10.1056/NEJM198605293142204> PMID: 3010113
 30. Nigro G, Anceschi MM, Cosmi EV. Congenital Cytomegalic Disease Collaborating Group. Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG*. 2003; 110(6):572–577. PMID: 12798474
 31. Kagan KO, Enders M, Hoopmann M, Geipel A, Simonini C, Berg C, et al. Outcome of pregnancies with recent primary cytomegalovirus infection in first trimester treated with hyperimmunoglobulin: observational study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021; 57(4):560–567. <https://doi.org/10.1002/uog.23596> PMID: 33491819

2. Artículo segundo. T-Cell Immune Responses in Newborns and Long-Term Sequelae in Congenital Cytomegalovirus Infection (CYTRIC Study). [Soriano-Ramos M](#), Pedrero-Tomé R, Giménez-Quiles E, Albert E, Baquero-Artigao F, Rodríguez-Molino P, Del Rosal T, Noguera-Julian A, Fortuny C, Ríos-Barnés M, Saavedra-Lozano J, Dueñas E, Sánchez-Mateos M, Castells L, de la Serna M, Frick MA, de Vergas J, Núñez-Enamorado N, Moral-Pumarega MT, Folgueira MD, Navarro D, Blázquez-Gamero D; and CYTRIC Study Group. *J Pediatr.* 2024;272:114084.



T-Cell Immune Responses in Newborns and Long-Term Sequelae in Congenital Cytomegalovirus Infection (CYTRIC Study)

María Soriano-Ramos, MD^{1,*}, Roberto Pedrero-Tomé, MD^{2,*}, Estela Giménez-Quiles, PhD³, Eliseo Albert, PhD³, Fernando Baquero-Artigao, MD^{4,5}, Paula Rodríguez-Molino, MD^{4,5}, Teresa del Rosal, PhD^{4,6}, Antoni Noguera-Julian, PhD^{7,8,9}, Clàudia Fortuny, PhD^{7,8,9}, María Ríos-Barnés, MD⁷, Jesús Saavedra-Lozano, PhD^{10,11}, Eva Dueñas, MD¹⁰, Miguel Sánchez-Mateos, MD¹², Laura Castells, MD¹³, María de la Serna, MD¹⁴, Marie Antoinette Frick, MD¹⁵, Joaquín de Vergas, MD¹⁶, Noemí Núñez-Enamorado, MD¹⁷, María Teresa Moral-Pumarega, PhD¹⁸, María Dolores Folgueira, PhD¹⁹, David Navarro, PhD^{3,20,21,†}, and Daniel Blázquez-Gamero, PhD^{2,22,23,†}, CYTRIC Study Group²²

Objective The objective of this study was to assess the role of T-lymphocyte immune responses in newborns with congenital cytomegalovirus (CMV) infection (cCMV) and their potential association with the development of long-term sequelae.

Study design A multicenter, prospective study from 2017 to 2022 was conducted across 8 hospitals in Spain. Blood samples were collected within the first month of life from neonates diagnosed with cCMV. Intracellular cytokine staining was employed to evaluate the presence of CMV-specific interferon-gamma (IFN- γ)-producing CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes (CMV-IFN- γ -CD8⁺/CD4⁺) using flow cytometry. The development of sequelae, including hearing loss and neurologic impairment, was assessed during follow-up.

Results In total, 64 newborns were included; 42 infants (65.6%) had symptomatic cCMV. The median age at the last follow-up visit was 25.3 months (IQR 20.1-34.4). Eighteen infants had long-term sequelae (28.1%), predominantly hearing loss (20.3%) and neurologic disorders (15.6%). No relationship was observed between total count or percentage of CMV-specific IFN- γ -CD8⁺ or CD4⁺ lymphocytes and long-term sequelae. Multivariable analysis demonstrated an association between lower total lymphocyte count and long-term sequelae (aOR 0.549, 95% CI: 0.323-0.833), which requires further study.

Conclusions CMV-specific IFN- γ -CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte responses in neonates with cCMV were not predictive of long-term sequelae. (*J Pediatr* 2024;272:114084).

Human cytomegalovirus (CMV) is recognized as the most prevalent congenital infection in the developed world, with a prevalence of congenital infection that ranges from 0.14% to 0.7%.¹⁻⁵ While most infants with congenital CMV infection (cCMV) remain asymptomatic during the neonatal period, approximately 10-15% exhibit symptomatic disease and face an elevated risk of enduring long-term sequelae, such as neurologic deficits, hearing impairment, and visual abnormalities.^{2,6,7} Notably, a smaller cohort, comprising 10%-20% of children with cCMV who are asymptomatic at birth, may develop these potentially severe sequelae. The implications of cCMV on human health are considerable, encompassing far-reaching social

From the ¹Centro de Salud Ciudad Jardín, Pediatric Department, Alicante, Spain; ²Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (Imas12), Fundación Biomédica del Hospital Universitario 12 de Octubre (FBHU12O), Madrid, Spain; ³Department of Microbiology, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain; ⁴Hospital Universitario Infantil La Paz, Department of Infectious Diseases and Tropical Pediatrics, Madrid, Spain; ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Madrid, Spain; ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; ⁷Department of Pediatric Infectious Diseases, Malalties Infeccioses i Resposta Inflamatori Sistèmica en Pediatria, Servei de Malalties Infeccioses i Patologia Importada, Institut de Recerca Pediàtrica Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ⁸Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁹Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ¹⁰Department of Pediatric Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Pediatric Infectious Diseases Unit, Universidad Complutense, Madrid, Spain; ¹¹Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), CIBER Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Madrid, Spain; ¹²Department of Neonatology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ¹³Department of Neonatology, Pediatric Unit, Hospital Quirónsalud del Vallès, Barcelona, Spain; ¹⁴Department of Neonatology, Hospital Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain; ¹⁵Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatric Infectious Diseases, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ¹⁶Hospital Universitario 12 de Octubre, Pediatric Otorhinolaryngology Department, Madrid, Spain; ¹⁷Pediatric Neurology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ¹⁸Department of Neonatology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ¹⁹Microbiology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ²⁰Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Spain; ²¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ²²Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatric Infectious Diseases, Hospital Universitario 12 de Octubre, RITIP, Madrid, Spain; ²³Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*Contributed equally.
†Co-senior authors.

0022-3476/\$ - see front matter. © 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2024.114084>

cCMV	Congenital cytomegalovirus infection
CMV	Cytomegalovirus
CMV-IFN- γ -CD8 ⁺ /CD4 ⁺	CMV-specific IFN- γ -producing CD8 ⁺ and CD4 ⁺ T-cells
cUS	Cranial ultrasound
IFN- γ	Interferon-gamma
MRI	Magnetic resonance imaging
PCR	Polymerase chain reaction
SNHL	Sensorineural hearing loss

and economic consequences. cCMV is recognized as a leading cause of nongenetic hearing loss in children and the most common factor associated with neurodevelopmental delay in the United States. Nevertheless, several aspects of its pathogenesis and management remain elusive.⁸

Infants with cCMV exhibit a diminished control of CMV replication, limited capacity for cell-mediated immune responses and an inability to transition the virus into a latent state.^{2,9} Some researchers have postulated that the protracted viral shedding may be linked to the postnatal progression of hearing loss.¹⁰ Studies conducted on infants with cCMV consistently have demonstrated marked differences in specific CMV responses compared with adults following infection. Infants with cCMV less commonly have detectable CMV-specific CD4⁺ T lymphocytes and lower frequencies of specific CD8⁺ T lymphocytes capable of performing cytotoxic, chemotaxis, and multiple concurrent functions.¹¹ Furthermore, other reports have indicated a diminished capacity to produce cytokines by both CD4⁺ and CD8⁺ CMV-specific T lymphocytes, in contrast to T lymphocytes of infected adults.⁹ Recently Capretti et al have reported that CMV-specific CD8⁺ T-cell responses at birth correlate with a reduced risk of neonatal symptoms and more effective control of CMV DNAemia.¹² Nevertheless, available evidence regarding the prognostic significance of T-cell responses in cCMV and their role in the development of long-term sequelae is scarce and primarily is based on studies of a small number of patients. The primary objective of this study was to evaluate the association between neonatal CMV-specific interferon gamma (IFN- γ)-producing CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes (CMV-specific IFN- γ -CD8⁺/CD4⁺) responses and development of long-term sequelae (CYTRIC study).

Methods

Study Design

A prospective multicenter study was conducted across 8 hospitals in Spain, from January 2017 to April 2022. The study targeted newborns with confirmed cCMV born during the study period. Blood samples for T-cell responses were collected before 28 days of life.

Given that CMV screening during pregnancy or at birth is not mandatory in Spain, the diagnosis of cCMV was pursued for various reasons. Most children were identified due to the manifestation of symptoms associated with cCMV at birth. Additionally, some newborns were diagnosed because of maternal primary CMV infection during pregnancy. In certain private and public hospital/clinics, CMV status was screened during pregnancy, leading to the diagnosis of pregnant women following seroconversion or the presence of positive IgM and IgG antibodies with low IgG avidity test results. Furthermore, there were cases in which children were diagnosed after the detection of fetal imaging abnormalities associated with cCMV. Infants with any form of immunodeficiency or those born to mothers with immunodeficiencies

or under immunosuppressive therapy were excluded from participation in this study, as well as those aged more than 28 days of life at study entry. In addition, cases in which the blood sample was inadequate for analysis or was not received at the laboratory were excluded, as well as cases with a follow up for less than 6 months of age and those in which sequelae were due to other etiologies not related to cCMV. Data collection and management for this study were facilitated by the utilization of the Research Electronic Data Capture application. The secure, web-based platform is hosted at the Instituto de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre (Imas12) in Madrid, Spain. Research Electronic Data Capture is specifically designed to facilitate data capture for research studies, ensuring the secure handling of sensitive research information.¹³

Sample Collection and T-Cell Quantification

Blood samples (1 mL) were obtained in sodium heparin tubes as close as possible to the time of diagnosis of cCMV. Samples were shipped and processed in Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia, Spain) within 24 hours. T lymphocytes were quantified using an intracellular cytokine flow cytometry procedure commercialized by Beckton Dickinson (BD Fastimmune, BDBiosciences, San Jose, CA, USA). A volume of 0.5 mL of blood was incubated with 2 peptide libraries (15 amino acids) covering the whole sequence of the pp65 and IE-1 proteins of CMV (1 mcg/peptide/mL), in the presence of 2 co-stimulatory antibodies (anti-CD28 and anti-CD49d) at a concentration of 1 μ g/mL. As a control, a similar volume of heparinized blood was incubated with dimethyl sulfoxide in phosphate-buffered saline. Stimulation was maintained for 6 hours at 37 °C and Brefeldin A (10 μ g/mL) was then added for 2 hours after the incubation. The red blood cells were then lysed, and the sample was frozen at -80 °C.

After thawing at 37 °C on the day of the cytometric analysis, the cells were incubated for 30 minutes at room temperature with the following combination of antibodies: anti-IFN γ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD4 or CD8-PerCPCy5.5, and anti-CD3-APC. Finally, the cells were washed and 200 μ L of paraformaldehyde (1% in phosphate-buffered saline) was added prior to their flow cytometry analysis within 2 hours (FACSCalibur flow cytometer) and the data obtained were quantified with the CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems). Only samples with more than 1000 events through the CD69/IFN γ window were considered valid. The total number of CMV-IFN- γ -CD8⁺/CD4⁺ cells was calculated based on the positive events, and the absolute CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocyte count. Specific CD8⁺ and CD4⁺ responses against CMV were defined as >0.1% as has been established in previous studies.¹⁴⁻¹⁶

Definitions

Primary maternal CMV infection was defined as the occurrence of either CMV seroconversion or the detection of positive IgM and IgG antibodies during pregnancy, with the

additional criterion of a low IgG avidity index, which was defined as being less than 30%, as previously described.¹⁷

cCMV was established as a diagnosis if the infant tested positive for CMV through a polymerase chain reaction (PCR) analysis of urine within the first 3 weeks of life.¹⁸

The threshold of blood viral load detection varied among participating hospitals: 35 IU/mL in Puerta de Hierro, 35.6 IU/mL in Sant Joan de Déu (trading company Elitech Group), 50 IU/mL in Gregorio Marañón (trading company Abbot), 53 IU/mL in Infanta Sofía, 120 IU/mL in 12 de Octubre, 128 IU/mL in Vall d'Hebron, 188 IU/mL in General de Catalunya (trading company Beckman), and 1000 IU/mL in La Paz (trading company Seegene).

Symptomatic cCMV at birth was defined, in accordance with the recommendations of Luck et al,¹ by the presence of any of the following: (1) abnormalities in physical examination, including jaundice, petechiae/purpura, splenomegaly and/or hepatomegaly, hypotonia, seizures, paresis, microcephaly (head circumference below -2 Z-score for sex and gestational age¹⁹), and small for gestational age (birth weight below -2 Z-score for sex and gestational age¹⁹); (2) chorioretinitis; (3) sensorineural hearing loss (SNHL; hearing threshold >25 dB in any ear when tested by Auditory Brainstem Response); (4) abnormalities in blood tests, including thrombocytopenia (platelet count $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$), and elevated alanine aminotransferase levels (>80 IU/L); (5) neuroimaging abnormalities compatible with cCMV in first cranial ultrasound (cUS) or first magnetic resonance imaging (MRI), if available, including white matter abnormalities, ventricular adhesions, intracranial calcifications, ventriculomegaly, cerebellar hypoplasia, periventricular cysts, caudothalamic/subependymal cysts, hydrocephalus, lissencephaly, polymicrogyria, or other migrational abnormalities. Newborns who did not meet any of these specified criteria following a thorough evaluation at birth were classified as asymptomatic.

Newborn Evaluation

Children were evaluated at birth by an experienced pediatrician with a complete physical examination. A blood cell count, biochemistry with liver enzymes and funduscopy were performed at birth. cUS was performed in all children by a pediatric radiologist in each hospital. Cranial MRI was performed at the discretion of the treating physician.

Hearing Evaluation

Screening hearing test was performed in all children by automated auditory brainstem response. All children were referred to Audiology, and a new hearing evaluation was performed within the first 3 months after birth with an otomicroscopy and Steady-State Auditory Brainstem Response to establish the hearing thresholds.

Follow-Up

Children were evaluated clinically at birth and at 6 months of age and then once per year. At each visit physical examination

was performed, and children were assessed for the presence of microcephaly, motor impairment (paresis, spasticity), epilepsy (with medical treatment), visual impairment, and hearing evaluation by Steady-State Auditory Brainstem Response. Symptomatic children with central nervous system involvement, hearing loss, chorioretinitis, or other relevant related symptoms were offered antiviral treatment (ganciclovir/valganciclovir) according to published guidelines.^{1,20,21}

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using R software.²² Data for continuous variables were presented as mean values and SD or medians and IQR. Qualitative variables were presented as frequencies (n) and percentages (%). Means between sequelae and no sequelae groups were compared with parametric (Student *t* test) and nonparametric (Mann-Whitney *U* tests). In contrast, comparing proportions were performed using the χ^2 test and Fisher exact tests. In all cases, statistical significance was defined as $P < .05$.

Additionally, the variables related to cellular response were plotted: total lymphocyte, total CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, and total CMV-IFN- γ -CD8⁺/CD4⁺ cell counts, and their percentages. The association between cellular response and the development of long-term sequelae was determined by logistic regression analysis. All related variables described previously were used as possible predictors, and the cut-off points with the best predictive power according to the Youden Index were calculated. The logistic regression analysis was performed in steps, sequentially eliminating all those variables with P values > 0.1 . Finally, the variance inflation value of all the variables included in the most parsimonious model was checked, and its explanatory power using the McFadden Index (good predictive power if index is > 0.2). Additionally, a sub-analysis was performed in the group of infants with cCMV after maternal primary infection in the first trimester of pregnancy (<14 weeks' gestation).

Ethics

The study was approved by the reference Institutional Review Board (IRB) at Hospital 12 de Octubre (IRB number: 17/007), and by all IRB of the other participating centers. All the procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration (1964, most recently amended in 2008) of the World Medical Association. Written informed consent was obtained from the parents.

Results

During the study period, 182 infants were diagnosed with cCMV in the participating centers; 29 infants were diagnosed retrospectively by CMV-PCR in dried blood spots, thus they were not eligible. Blood samples were collected from 76/153 (49.7%) children of whom 64 comprised the analyzed group (Figure 1). Median age (IQR) at diagnosis of cCMV was 1 [0-2] day, and median age (IQR) at blood sample collection was 8.5 (4-15) days.

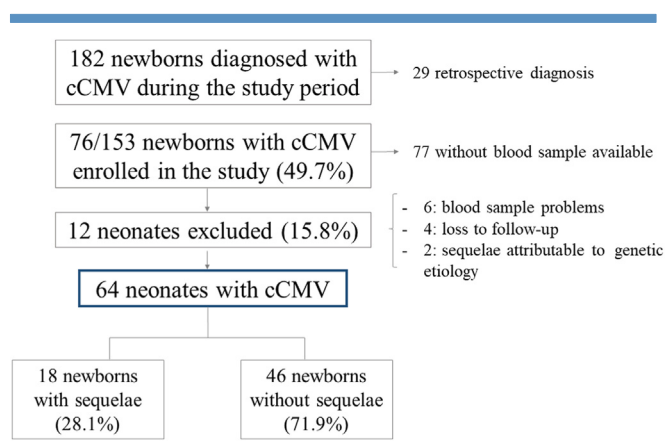


Figure 1. Patient flowchart. cCMV indicates congenital cytomegalovirus infection. cCMV, congenital cytomegalovirus infection.

Primary maternal infection was diagnosed in 31 of 64 (48.4%) women with serologic tests available at a median (IQR) time for maternal infection being 19 (12–24) weeks. Non-primary maternal infection was diagnosed in 14 of 64 (21.9%) women; in the remaining 19 mothers, the type and time of maternal infection was unknown (19 of 64, 29.7%). Almost half of infants with cCMV were male (31 of 63, 49.2%). Forty-two infants (42 of 64, 65.6%) had symptomatic cCMV at birth, 15 with an abnormal physical examination (15 of 63, 23.8%) (Table I); petechiae was the most common finding. cUS was abnormal in 25 infants (25 of 62, 40.3%) (Table II), isolated lenticulostriate vasculopathy being the most common finding (16 of 62, 25.8%). MRI identified abnormalities in 31 infants (31 of 53, 58.5%) (Table II) and the most common finding was focal/multifocal white matter abnormalities (19 of 53, 35.8%). In the majority, blood viral load for CMV-PCR at birth was positive (47 of 55, 85.5%) Table III.

Thirty-eight children (38 of 64, 59.4%) received antiviral treatment for cCMV during a median (IQR) time of 7 (7.0–14.5) days for ganciclovir and 162 (80–181) days for valganciclovir. Median age at start of antiviral treatment was 8 (3–17) days.

Median age at last follow-up visit was 25.3 months (IQR 20.1–34.4); 18 children had long-term sequelae (18 of 64, 28.1%). Among the latter, hearing loss was found in 13 children (13 of 64, 20.3%) and neurologic disorders in 10 (10 of 64, 15.6%), mainly psychomotor delay, microcephaly, speech and language developmental delay and motor abnormalities. Visual impairment due to CMV chorioretinitis was only described in one patient. Single patients each had attention-deficit/hyperactivity disorder or febrile seizures; Neither case was considered a CMV-related sequelae and cases were assigned as without sequelae.

Variables associated with long-term sequelae in the bivariate analysis were symptomatic cCMV ($P = .012$), presence of abnormal physical examination at birth ($P = .006$), abnormal

findings in first cUS ($P = .016$), presence of white matter abnormalities in cUS ($P = .008$), and a failed hearing screening test ($P < .001$). Lymphocyte counts and T-lymphocyte immune responses to CMV are shown in Table III and Figure 2. Total lymphocyte and CD4⁺ T-cell counts at birth were significantly lower in infants developing sequelae compared with those who did not (4500 vs 5350 lymphocytes/ μ L, $P = .013$; 1454 vs 2143 CD4⁺ T-lymphocytes/ μ L, $P = .020$, respectively). Also, the CD4⁺/CD8⁺ ratio was significantly lower in patients with sequelae (1.7 vs 2.4, $P = .03$) (Figure 2). No association was found between CMV-IFN- γ -CD8⁺ or CD4⁺ responses and long-term sequelae. In the multivariable model, total lymphocyte count remained significantly associated with long-term sequelae (aOR 0.549 per 1000 total lymphocytes, CI 95%: 0.323–0.833, $P = .012$) (Table S1, online; available at www.jpeds.com). A trend toward an association was observed between a higher absolute count of CD8⁺ T cells and sequelae (aOR 1.064 per 100 CD8⁺ T cells, CI 95%: 0.948–1.194, $P = .090$). This model was performed with a sample of 54 patients and the McFadden index was 16.27%. Additionally, a comparison of lymphocyte counts and T-cell responses between symptomatic children vs asymptomatic children at birth showed no significant difference (Figure S1, online; available at www.jpeds.com).

Thirteen (13/64, 20.3%) children had SNHL at birth; at the last visit, 2 children no longer had SNHL. Two children with normal hearing at birth had SNHL at last visit. Neither had CMV-IFN- γ -CD4⁺ response. However, both had a positive CMV-IFN- γ -CD8⁺ response (>0.1%).

Ten infants had cCMV after documented maternal primary infection in the first trimester of pregnancy (<14 weeks of gestation) (Table S2, online; available at www.jpeds.com); 80% had symptomatic cCMV at birth, 7 had abnormal cUS, 8 of 9 who had MRI performed had abnormal findings (88.9%), and 8 of 10 (80%) received antiviral therapy. Sequelae were found in 4 (40%) infants, all of them with SNHL of varying degrees. None of these 10 children had a positive CMV-IFN- γ -CD4⁺ response. A positive CMV-IFN- γ -CD8⁺ response was seen in 1 of 4 (25%) infants with sequelae vs 3 of 6 (50%) in the group without sequelae. No significant association was found between total lymphocyte counts or CMV-IFN- γ -CD8⁺/CD4⁺ responses and the development of long-term sequelae in these 10 infants.

Discussion

In this cohort of children with cCMV, the CMV-specific cellular response at birth, with a focus on IFN- γ -producing T lymphocytes, was not a useful predictor of the development of long-term sequelae. However, lower total lymphocyte count (still within normal range) was associated with a higher risk of long-term sequelae. Multivariable analysis showed that for every decrease of 1000 lymphocytes/ μ L, there was an increase of 1.8 times in long-term sequelae (Table S1,

Table 1. Gestational history, amniocentesis, treatment during pregnancy, demographic data and clinical findings of the newborn, and type of antiviral treatment in the newborn, based on the development of long-term sequelae

	Overall (n = 64)	No sequelae (n = 46)	Sequelae (n = 18)	P value
Pregnancy				
Type of maternal infection (n, %)				
Primary infection	31/64 (48.4)	26/46 (56.5)	5/18 (27.8)	<.001
Nonprimary infection	14/64 (21.9)	9/46 (19.6)	5/18 (27.8)	
Unknown	19/64 (29.7)	11/46 (23.9)	8/18 (44.4)	
Gestational age at delivery (wk) (median [IQR]) (n = 64)	39.0 [37.0, 40.0]	39.0 [38.0, 40.0]	38.5 [37.0, 39.8]	.411
Amniocentesis				
Amniocentesis performed (n, %)	24/60 (40.0)	18/60 (42.9)	6/18 (33.3)	.687
Weeks of gestation at first amniocentesis (median [IQR]) (n = 16)	22.5 [21.0, 27.2]	23.0 [21.0, 27.5]	22.0 [21.0, 23.0]	.731
CMV PCR-positive fluid (n, %)	19/23 (82.6)	13/17 (76.5)	6/6 (100.0)	.496
CMV viral load fluid (median [IQR]) (n = 15)	413 000.0 [63 194.0, 3 200 000.0]	186 093.5 [9870.0, 796 662.5]	3 400 000.0 [3 000 000.0, 3 500 496.0]	.050
Treatment during pregnancy (n, %)				
Hyperimmune globulin	15/64 (23.4)	10 (21.7)	5 (27.8)	.854
Valaciclovir	3/64 (4.7)	2 (4.3)	1 (5.6)	1.000
Newborn				
Symptomatic CMV infection	42/64 (65.6)	25/46 (54.3)	17/18 (94.4)	.012
Age at diagnosis (d) (median [IQR]) (n = 64)	1.0 [0.0, 2.0]	1.0 [0.0, 1.8]	1.0 [0.0, 2.0]	.342
Male (n, %)	31/63 (49.2)	23/45 (51.1)	8/18 (44.4)	.842
Birth weight (g) (median [IQR]) (n = 64)	3060.0 [2453.8, 3330.0]	3060.0 [2685.0, 3350.0]	3061.0 [2382.5, 3250.0]	.391
Birth height (cm) (median [IQR]) (n = 62)	48.0 [47.0, 50.0]	48.0 [47.0, 50.0]	48.0 [46.0, 51.0]	.607
Birth head circumference (cm) (median [IQR]) (n = 62)	33.8 [32.0, 34.5]	34.0 [32.5, 35.0]	33.0 [31.5, 34.5]	.219
Z-Score birth head circumference (median [IQR]) (n = 60)	-1.0 [-1.7, 0.0]	-0.7 [-1.5, 0.0]	-1.4 [-2.5, 0.0]	.397
Z-Score birth head circumference adjusted by weight (median [IQR]) (n = 60)	-0.6 [-1.2, 0.1]	-0.6 [-1.0, 0.1]	-1.1 [-1.5, 0.3]	.528
Physical examination at birth				
Abnormal physical examination at birth (n, %)	15/63 (23.8)	6/45 (13.3)	9/18 (50.0)	.006
Microcephaly	3/63 (4.8)	0/45 (0.0)	3/18 (16.7)	.031
Seizures	0/63 (0.0)	0/45 (0.0)	0/18 (0.0)	-
Splenomegaly	1/63 (1.6)	0/45 (0.0)	1/18 (5.6)	.633
Hepatomegaly	3/63 (4.8)	0/45 (0.0)	3/18 (16.7)	.031
Hypotonia	4/63 (6.3)	1/45 (2.2)	3/18 (16.7)	.121
Jaundice	2/63 (3.2)	0/45 (0.0)	2/18 (11.1)	.140
Petechiae	5/63 (7.9)	2/45 (4.4)	3/18 (16.7)	.269
Small for gestational age	3/63 (4.8)	0/45 (0.0)	3/18 (16.7)	.031
Chorioretinitis in first examination (n, %)	3/60 (5)	1/43 (2.3)	2/17 (11.8)	.130
Abnormal newborn hearing screening (any ear) (n, %)	11/64 (17.2)	1/46 (2.2)	10/18 (55.6)	<.001
SNHL at birth (any ear) (n, %)	13/64 (20.3)	2/46 (4.3)	11/18 (61.1)	<.001
Treatment				
Antiviral treatment received (n, %)	38/64 (59.4)	21/46 (45.7)	17/18 (94.4)	<.001
Type of antiviral treatment (n, %)				
Ganciclovir i.v	1/64 (1.6)	1/46 (2.2)	0/18 (94.4)	.925
Valganciclovir p.o	31/64 (48.8)	18/46 (39.1)	13/18 (72.2)	<.001
Ganciclovir i.v + Valganciclovir p.o	6/64 (9.4)	2/46 (4.3)	4/46 (11.1)	.248
Days of ganciclovir (median [IQR]) (n = 7)	7.0 [7.0, 14.5]	7.0 [7.0, 41.5]	10.5 [5.8, 14.2]	.714
Days of valganciclovir (median [IQR]) (n = 37)	162.0 [80.0, 181.0]	138.0 [62.5, 173.0]	180.0 [146.0, 183.2]	.039

ALT, Alanine aminotransferase; CMV, cytomegalovirus; PCR, polymerase chain reaction; SNHL, sensorineural hearing loss. Bolded P-values are <.05.

online; available at www.jpeds.com). This finding should be interpreted cautiously because of substantial T-cell count overlap in infants with and without sequelae (Figure 2). Total lymphocyte count as well as total CD8⁺ T-lymphocyte count (which were inconclusive in this study) should be assessed in larger cohorts in order to assess potential prognostic value.

Capretti et al¹² recently assessed the CMV-specific CD8⁺ T-cell responses in 30 neonates with cCMV within day 14 and during the second month of life; they found that a detectable CMV-specific CD8⁺ T-cell response correlated with the lack of CMV-related symptoms at birth, better control of CMV DNAemia, and lower risk of long-term sequelae. They found that infants with a reactive QuantiFERON-

CMV showed no long term-sequelae (0/16). In contrast, 8 of 14 (57%) infants with a nonreactive/indeterminate QuantiFERON-CMV at birth developed long-term sequelae. In our CYTRIC study, we found that 10 of 18 (55.6%) children with sequelae and 28 of 44 (60.9%) without sequelae had a positive CMV-specific IFN- γ -CD8⁺ response at birth. Divergent results with Cappretti *et al* could be partially explained by use of different techniques (QuantiFERON-CMV vs noncommercial technique). The technique used in CYTRIC study has been extensively evaluated in other populations such as transplant/immunosuppressed patients, with good predictive value.^{14,23} Other possible explanation is that the proportion of children with fetal infection in the first trimester was different in the 2 studies; however, analysis in

Table II. Neuroimaging findings of 64 newborns with cCMV infection

	Overall (n = 64)	No sequelae (n = 46)	Sequelae (n = 18)	P value
First cranial ultrasound				
Abnormal first cranial ultrasound (n, %)	25/62 (40.3)	13/44 (29.5)	12/18 (66.7)	.016
White matter abnormalities (focal/multifocal)	4/62 (6.5)	0/44 (0.0)	4/18 (22.2)	.008
White matter abnormalities (Diffuse)	1/62 (1.6)	1/44 (2.3)	0/18 (0.0)	1.000
Lenticulostriate vasculopathy	16/62 (25.8)	8/44 (18.2)	8/18 (44.4)	.068
Intracranial calcifications (single)	2/62 (3.2)	2/44 (4.5)	0/18 (0.0)	.898
Intracranial calcifications (multiple)	2/62 (3.2)	0/44 (0.0)	2/18 (11.1)	.145
Ventriculomegaly (mild-moderate <97th centile)	2/62 (3.2)	0/44 (0.0)	2/18 (11.1)	.067
Ventriculomegaly (severe >97th centile + 4 mm)	0/62 (0.0)	0/44 (0.0)	0/18 (0.0)	-
Periventricular cysts	3/62 (4.8)	1/44 (2.3)	2/18 (11.1)	.559
Caudothalamic/Subependymal cysts/germinolysis	9/62 (14.5)	4/44 (9.1)	5/18 (27.8)	.069
Hydrocephalus	0/62 (0.0)	0/44 (0.0)	0/18 (0.0)	-
First cranial MRI				
Abnormal child first cranial MRI (n, %)	31/53 (58.5)	18/36 (50.0)	13/17 (76.5)	.127
White matter abnormalities (focal/multifocal)	19/53 (35.8)	10/36 (27.8)	9/17 (52.9)	.140
White matter abnormalities (diffuse)	7/53 (13.2)	4/36 (11.1)	3/17 (17.6)	.825
Ventricular adhesions/septations	1/53 (1.9)	1/36 (2.8)	0/17 (0.0)	1.000
Lenticulostriate vasculopathy	1/53 (1.9)	0/36 (0.0)	1/17 (5.9)	.698
Intracranial calcifications (single)	1/53 (1.9)	0/36 (0.0)	1/17 (5.9)	.698
Intracranial calcifications (multiple)	3/53 (5.7)	2/36 (5.6)	1/17 (5.9)	1.000
Intracranial calcification (extensive)	0/53 (0.0)	0/36 (0.0)	0/17 (0.0)	-
Enlargement of the cisterna magna	1/53 (1.9)	1/36 (2.8)	0/17 (0.0)	1.000
Ventriculomegaly (mild-moderate <97th centile)	2/53 (3.8)	1/36 (2.8)	1/17 (5.9)	1.000
Ventriculomegaly (severe >97th centile + 4 mm)	0/53 (0.0)	0/36 (0.0)	0/17 (0.0)	-
Cerebellar hypoplasia	1/53 (1.9)	0/36 (0.0)	1/17 (5.9)	.698
Periventricular cysts	4/53 (7.5)	1/36 (2.8)	3/17 (17.6)	.175
Caudothalamic/subependymal cysts/germinolysis	2/53 (3.8)	1/36 (2.8)	1/17 (5.9)	1.000
Lissencephaly/other migrational abnormalities	2/53 (3.8)	0/36 (0.0)	2/17 (11.8)	.185
Polymicrogyria	1/53 (1.9)	0/36 (0.0)	1/17 (5.9)	.698

CNS, central nervous system; MRI, magnetic resonance imaging.

Values are presented as counts (n) and percentages (%).

Bolded P-values are <.05.

our study was limited to infants born after confirmed maternal primary infection in the first trimester of pregnancy (n = 10, [Table S2](#), online; available at www.jpeds.com) did not show significant differences.

A case series investigated by Lidehäll et al² included 24 children with cCMV in which T-lymphocyte responses measured by IFN- γ production were compared with responses of adults with symptomatic primary CMV infection. They found that children younger than 2 years of age had low or undetectable CD4⁺ responses but no differences regarding CD8⁺ T-lymphocyte function. We also found a higher proportion of CMV-specific CD8⁺ responses, than CMV-specific CD4⁺ responses (59.4% vs 19.4%) in children with cCMV.

Huygens et al⁹ published a case series of 26 newborns with cCMV and CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte responses were markedly lower than in adults. Other authors have studied cCMV-specific responses in small case series, showing that most infants with cCMV had no detectable CMV-specific CD4⁺ T-lymphocytes and lower frequencies of CMV-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses compared with adults.¹¹ Discordant results found among other previous studies could be related to their limited sample sizes. We attempted to overcome this limitation by performing a multicenter study.

The importance of cellular immune response in CMV infection has been extensively reported in patients following

solid organ and hematopoietic stem cell transplant. Certain aspects of cell-mediated immunity in pregnant women with CMV infection and their infected fetuses are functionally impaired, which may be important in transmission and disease progression.^{24,25} Several authors have found an association between maternal T-lymphocyte response and viral transmission to the fetus.²⁶⁻²⁸ However, in a previous study, we did not find an association between maternal CMV-specific T-cell response and the risk of intrauterine transmission or infant sequelae.¹⁶ Knowledge about maternal immune responses against CMV is limited and further studies are needed to understand better the role of CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ responses on the risk of fetal infection.

The fetal immune system can begin to mount a response to CMV as early as the 22 weeks of gestation.²⁹ However, it is important to note that this early cellular response may not be fully functional or mature at this stage and the exact role that the nascent immune response plays in limiting the extent of CMV-associated disease or sequelae remains uncertain. The maturation and effectiveness of the fetal immune response are complex processes that can be influenced by various factors, including gestational age, maternal immune status, and the specific dynamics of CMV infection. Understanding the precise impact of early immune response on CMV-associated outcomes is an important area of ongoing research.³⁰

Table III. Laboratory data of enrolled patients

	Overall (n = 64)	No sequelae (n = 46)	Sequelae (n = 18)	P value
Blood tests at birth				
Abnormal blood tests at birth (first week of life) (n, %) (n = 62)	11/62 (17.7)	7 (15.9)	4 (22.2)	.828
Median [IQR]				
ALT (IU/L) (n = 51)	19.5 [16.0, 23.8]	19.0 [15.0, 23.0]	21.0 [17.0, 24.0]	.412
AST (IU/L) (n = 50)	52.5 [38.5, 74.5]	55.0 [40.0, 72.5]	48.5 [35.8, 76.8]	.662
Median [IQR]				
Hemoglobin (g/dL) (n = 55)	16.9 [14.9, 18.6]	16.7 [14.9, 18.4]	17.1 [14.6, 19.2]	.597
Platelets (cells/ μ L) (n = 59)	244 000.0 [157 500.0, 293 500.0]	266 000.0 [192 000.0, 298 000.0]	213 000.0 [142 000.0, 260 250.0]	.172
Neutrophils (cells/ μ L) (n = 56)	4950.0 [2400.0, 9705.0]	5000.0 [2430.0, 9030.0]	3570.0 [2100.0, 11 800.0]	.656
Total lymphocyte count (cells/ μ L) (n = 62)	5000.0 [4225.0, 6552.5]	5350.0 [4452.5, 7227.5]	4500.0 [3357.5, 5007.5]	.013
CMV viral load				
Urine viral load (IU/mL) (n = 54)	855 000.0 [162 657.0, 11 000 000.0]	736 819.0 [140 007.2, 10 000 000.0]	2 424 000.0 [199 385.5, 126 113 132.0]	.245
Detectable viral load in blood (n, %)	47/55 (85.5)	31/39 (79.5)	16/18 (88.9)	.806
Blood viral load (IU/mL) (n = 55)	3149.0 [855.0, 11 609.0]	3161.0 [833.8, 11 609.0]	2878.0 [1002.8, 11 050.0]	.878
Cellular immune responses				
Days of life at blood sample collection (median [IQR]) (n = 64)	8.5 [4.0, 15.0]	8.5 [4.0, 15.8]	8.5 [3.0, 13.0]	.686
Total count of CD3-CD4+ T cells (n = 60)	1790.3 [976.3, 2807.4]	2143.0 [1158.8, 3346.6]	1453.7 [386.7, 2188.9]	.020
% CD3-CD4+ T cells (n = 60)	42.5 [18.5, 50.7]	41.9 [21.8, 52.2]	42.5 [10.0, 49.2]	.221
Total count CMV-specific CD4+IFN γ T cells (n = 60)	0.1 [0.0, 0.9]	0.4 [0.0, 1.1]	0.0 [0.0, 0.4]	.202
% CMV-specific CD4+IFN γ T cells (n = 60)	0.0 [0.0, 0.1]	0.0 [0.0, 0.1]	0.0 [0.0, 0.0]	.365
Positive CD4 response (>0.1% IFN γ) n, (%)	13/60 (19.4)	10/42 (22.7)	3/18 (16.7)	.851
Total count CD3-CD8+ T cells (n = 62)	891.9 [523.6, 1240.7]	891.9 [644.7, 1267.2]	898.0 [214.8, 1221.0]	.710
% CD3-CD8+ T cells (n = 62)	17.9 [13.0, 24.0]	17.5 [13.4, 21.4]	18.8 [9.1, 26.9]	.555
Total count CMV-specific CD8+IFN γ T cells (n = 62)	1.7 [0.0, 5.3]	2.3 [0.0, 5.1]	0.7 [0.0, 4.8]	.335
% CMV-specific CD8+IFN γ T cells (n = 62)	0.2 [0.0, 0.6]	0.2 [0.0, 0.6]	0.1 [0.0, 0.4]	.300
Positive CD8 response (>0.1% IFN γ) n, (%)	38/62 (59.4)	28/44 (60.9)	10/18 (55.6)	.915
CD4/CD8 ratio (n = 62)	2.2 [1.4 – 3.2]	2.4 [1.6 – 3.3]	1.7 [1.4 – 3.0]	.03

ALT, alanine aminotransferase; CMV, cytomegalovirus; IFN γ , interferon-gamma; IU, international units. Results of the bivariate analysis of the T-lymphocyte immune response in infants with cCMV. Total count and percentages of CD3-CD8+ and CD3-CD4+ T-lymphocytes are shown, as well as the total counts and percentages of CMV-specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes producing IFN- γ . Bolded P-values are <.05.

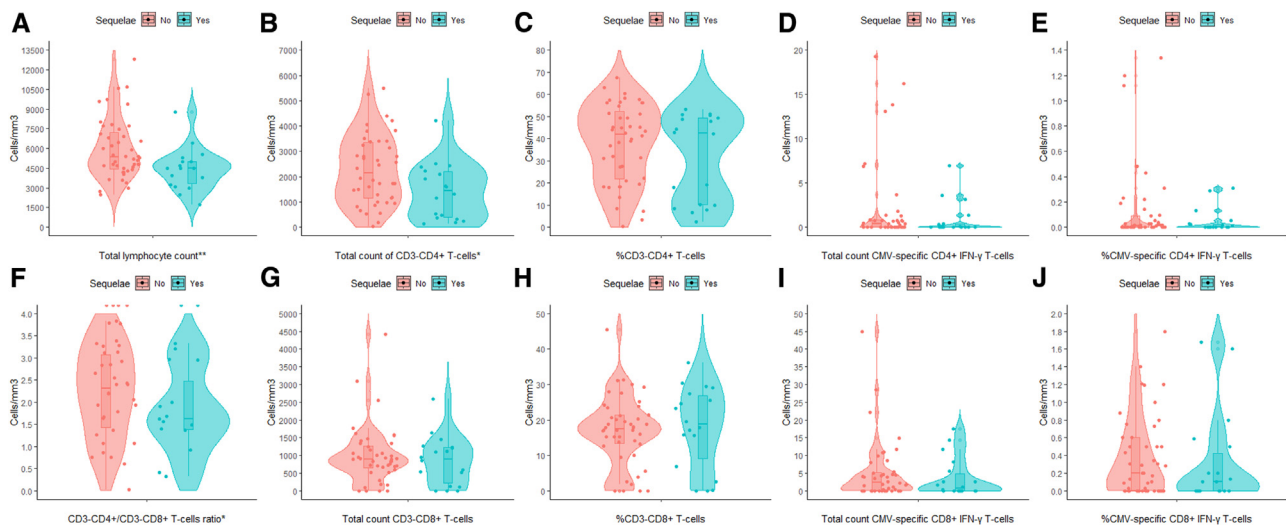


Figure 2. T-cell frequencies and distribution in cCMV according to the presence of sequelae. (A) Total lymphocyte count. (B) Total count of CD3-CD4+ T-cells. (C) %CD3-CD4+ T-cells. (D) Total count CMV-specific CD4+ IFN- γ T-cells. (E) %CMV-specific CD4+ IFN- γ T-cells. (F) CD3-CD4+/CD3-CD8+ T-cells ratio. (G) Total count CD3-CD8+ T-cells. (H) %CD3-CD8+ T-cells. (I) Total count CMV-specific CD8+ IFN- γ T-cells. (J) %CMV-specific CD8+ IFN- γ T-cells. (*) indicates $P < .05$, (**) $P \leq .01$. Statistical differences between sequelae and nonsequelae groups were determined by using Mann-Whitney U test. cCMV, congenital cytomegalovirus infection; cCMV, cytomegalovirus infection; IFN- γ , interferon-gamma.

The risk of long-term sequelae in cCMV is clearly associated with the time of fetal infection during pregnancy. Previous studies demonstrated that all cases of severe long-term sequelae were associated with maternal primary infection before 14 weeks of gestation.^{26,31} A negative PCR in amniotic fluid around 20 weeks of gestation also is a good prognostic factor.³² T-cell response in infants with cCMV could reflect several factors. First of all, time from maternal (and therefore, fetal) infection can influence cellular response. We hypothesized that children with early infection in pregnancy would have a more robust cellular immune response than children infected in late pregnancy. However, none of 10 children infected in the first trimester showed a CMV-specific IFN- γ -CD4⁺ response, and only 4 showed a CMV-specific IFN- γ -CD8⁺ response.

Our study has several limitations. First, the time at which a blood sample was collected for analysis varied as these were collected after the newborn was diagnosed with cCMV. This could have affected the results of cellular immune response because of its own variability over time. We tried to minimize this variability by collecting blood within the first 28 days of life. Second, we obtained only a single blood sample and thus were not able to assess whether antiviral treatment may be associated with changes in T-cell responses. Studies of sequential responses conducted by Capretti and Lidehäll showed only minimal change in specific T-cell immune responses during the first months of life in infants with cCMV.^{2,12} Another limitation is that only approximately 50% of eligible infants with cCMV were enrolled (76) and 12 of these were excluded after enrollment. Also, we had a limited number of patients with confirmed maternal infection in the first trimester ($n = 10$), a significant risk factor for developing long-term sequelae.

A further limitation of the study is the difficulty in determining the exact time of fetal infection, especially when maternal screening during pregnancy is not widespread and a significant proportion of cases are due to maternal nonprimary infection. T-cell responses at birth may be affected by the timing of fetal infection.^{4,33} For instance, lower T-cell responses may be present in low-risk infants who have recently been infected in the latter stages of pregnancy. But it is precisely in those infants in which the timing of fetal infection is undetermined where additional biomarkers, such as T-cell response, would be of paramount importance. Additionally, antiviral treatment could have altered the risk of long-term sequelae and some study results. Due to the lack of new samples during the follow-up of the children, we are unable to determine the role that antiviral treatment may have in the cellular response. Additionally, functional specificities of CMV-specific T cells other than IFN- γ production (ie, cytotoxicity or tumor necrosis factor- α production) were not assessed in our study. Finally, differences in CMV-PCR assays performed in different laboratories of the participating hospitals may have had an impact on our results because of the inherent variability among techniques.

Additional research is warranted to further assess and validate immunologic responses as potential risk factors for long-term sequelae in children with cCMV. ■

CRediT authorship contribution statement

María Soriano-Ramos: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Roberto Pedrero-Tomé:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Estela Giménez Quiles:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Resources, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Eliseo Albert Vicent:** Writing – review & editing, Visualization, Resources, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Fernando Baquero-Artigao:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Paula Rodríguez-Molino:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Investigation, Data curation. **Teresa del Rosal:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Investigation, Data curation. **Antoni Noguera-Julian:** Writing – review & editing, Visualization, Resources, Project administration, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Clàudia Fortuny:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Resources, Investigation, Data curation. **María Ríos-Barnés:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Resources, Investigation, Data curation. **Jesús Saavedra-Lozano:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Eva Dueñas:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Investigation, Data curation. **Miguel Sánchez Mateos:** Writing – review & editing, Visualization, Resources, Investigation, Data curation. **Laura Castells Vilella:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Investigation, Data curation. **María de la Serna:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Investigation, Data curation. **Marie Antoinette Frick:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Investigation, Data curation. **Joaquín de Vergas:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Investigation, Data curation. **Noemí Núñez Enamorado:** Writing – review & editing, Validation, Resources, Investigation, Data curation. **María Teresa Moral-Pumarega:** Writing – review & editing, Visualization, Resources, Investigation, Data curation. **María Dolores Folgueira:** Writing – review & editing, Validation, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **David Navarro:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Daniel Blázquez-Gamero:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology,

Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Judith Hernández:** Validation, Software, Investigation, Data curation.

Declaration of Competing Interest

DBG received fees from MSD as speaker in educational activities. JSL received fees from Biomerieux as speaker. None of the remaining authors have any conflict of interests to declare.

This work was supported by projects PI 16/00807, PI 19/01333, and PI 22/01540, from the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness) and co-funded by the European Regional Development Fund. DBG was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation - Instituto de Salud Carlos III and by Fondos FEDER “Contratos para la intensificación de la actividad investigadora en el Sistema Nacional de Salud, 2020 INT20/00 086 and 2023 INT23/00 039”. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario 12 de Octubre.

Paula Rodríguez-Molino was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation-Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER (Contrato Río Hortega CM21/00 174).

We thank all the participants in this study for their kind support as well as the collaborators of the CYTRIC Study Group: Judith Hernández, Raquel Pinillos Pisón, Eneritz Velasco Arnaiz, Serena Villaverde, Sara Vila, Pablo Rojo, Cristina Epalza, Cinta Moraleda, Elisa Fernández Cooke, Luis Prieto, Berta Zamora, Ana Martínez de Aragón, Rogelio Simón, Ana Camacho, Fátima Machín, Laura Cabello, María Luz Romero, Miquel Serna, Marta Martín, Estrella Esquivel-De la Fuente, María de la Calle, Sara Domínguez Rodríguez, María Cabanes, Eney Gómez-Montes, Anna Goncá, Marta Valdés Bango, M^a Carmen Viñuela-Benítez, Mar Muñoz-Chápuli Gutiérrez, Irene Cuadrado Pérez, Begoña Encinas, Alfredo Tagarro, Diana García Alcázar, Antonio García Burguillo, Roser Díez Martín, Olga Calavia, Dolores Salvia, Iciar Olabarrieta, Joan Manel Xiberta, Luz María Jiménez Losa.

Submitted for publication Jan 7, 2024; last revision received Apr 19, 2024; accepted Apr 28, 2024.

Reprint requests: María Soriano-Ramos, MD, Centro de Salud Ciudad Jardín, Pediatric Department, Calle Clot, 2. 03011, Alicante, Spain. E-mail: sorianoramosmaria@gmail.com

References

- Luck SE, Wieringa JW, Blázquez-Gamero D, Henneke P, Schuster K, Butler K, et al. ESPID congenital CMV group meeting, Leipzig 2015. Congenital cytomegalovirus: a European expert consensus statement on diagnosis and management. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:1205-13.
- Lidehäll AK, Engman ML, Sund F, Lidehäll AK, Engman ML, Sund F, et al. Cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T cell responses in infants and children. *Scand J Immunol* 2013;77:135-43.
- Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:86-102.
- Blázquez-Gamero D, Soriano-Ramos M, Vicente M, Pallás-Alonso CR, Pérez-Rivilla A, García-Álvarez M, et al. Prevalence and clinical manifestations of congenital cytomegalovirus infection in a screening Program in Madrid (PICCSA study). *Pediatr Infect Dis J* 2020;39:1050-6.
- Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, Lazzarotto T, Alain S, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e177-88.
- Eldar-Yedidia Y, Bar-Meir M, Hillel M, Abitbol G, Broide E, Falk R, et al. Low interferon Relative-response to cytomegalovirus is associated with low Likelihood of intrauterine transmission of the virus. *PLoS One* 2016;11:e0147883.
- Materne EC, Lilleri D, Garofoli F, Lombardi G, Furione M, Zavattoni M, et al. Cytomegalovirus-specific T cell Epitope Recognition in congenital cytomegalovirus Mother-infant Pairs. *Front Immunol* 2020;11:568217.
- Fowler KB. Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:1035-7.
- Huygens A, Lecomte S, Tackoen M, Olislagers V, Delmarcelle Y, Burny W, et al. Functional Exhaustion Limits CD4+ and CD8+ T-cell responses to congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 2015;212:484-94.
- Rosenthal LS, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF, Schmid SD, 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.
- Gibson L, Barysaukas CM, McManus M, Dooley S, Lilleri D, Fisher D, et al. Reduced frequencies of polyfunctional CMV-specific T cell responses in infants with congenital CMV infection. *J Clin Immunol* 2015;35:289-301.
- Capretti MG, Marsico C, Chiereghin A, Gabrielli L, Aceti A, Lazzarotto T. Immune Monitoring using QuantiFERON®-CMV assay in congenital cytomegalovirus infection: correlation with clinical Presentation and CMV DNA load. *Clin Infect Dis* 2021;73:367-73.
- Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inf* 2009;42:377-81.
- Gibson L, Barysaukas CM, McManus M, Dooley S, Lilleri D, Fisher D, et al. Reconstitution of cytomegalovirus-specific T-cell immunity following unmanipulated haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant* 2020;55:1347-56.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon-gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 2008;93:1434-6.
- Soriano-Ramos M, Esquivel-De la Fuente E, Albert Vicent E, de la Calle M, Baquero-Artigao F, Domínguez-Rodríguez S, et al., CYTRIC Study Group. The role of the T-cell mediated immune response to Cytomegalovirus infection in intrauterine transmission. *PLoS One* 2023;18:e0281341.
- Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21:1377-84.
- Lazzarotto T, Blázquez-Gamero D, Delforge ML, Foulon I, Luck S, Modrow S, et al. Congenital cytomegalovirus infection: a Narrative review of the Issues in screening and management from a Panel of European Experts. *Front Pediatr* 2020;8:13.
- Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics* 2010;125:e214-24.
- Kimberlin DW, Lin CY, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2003;143:16-25.
- Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, Ahmed A, Arav-Boger R, Michaels MG, et al., Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med* 2015;372:933-43.

22. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021, <https://www.R-project.org/>
23. Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, et al. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:543-9.
24. Rola-Pleszczynski M, Frenkel LD, Fuccillo DA. Specific impairment of cell-mediated immunity in mothers of infants with congenital infection due to cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1977;135:386-91.
25. Starr SE, Tolpin MD, Friedman HM, Paucker K, Plotkin SA. Impaired cellular immunity to cytomegalovirus in congenitally infected children and their mothers. *J Infect Dis* 1979;140:500-5.
26. Faure-Bardon V, Magny JF, Parodi M, Couderc S, Garcia P, Maillotte AM, et al. Sequelae of congenital cytomegalovirus following maternal primary infections are limited to those Acquired in the first trimester of pregnancy. *Clin Infect Dis* 2019;69:1526-32.
27. Lilleri D, Fornara C, Furione M, Zavattoni M, Revello MG, Gerna G. Development of human cytomegalovirus-specific T cell immunity during primary infection of pregnant women and its correlation with virus transmission to the fetus. *J Infect Dis* 2007;195:1062-70.
28. Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Genini E, Comolli G, et al. Lymphoproliferative response in primary human cytomegalovirus (HCMV) infection is delayed in HCMV transmitter mothers. *J Infect Dis* 2006;193:269-76.
29. Elbou Ould MA, Luton D, Yadini M, Pedron B, Aujard Y, Jacqz-Aigrain E, et al. Cellular immune response of fetuses to cytomegalovirus. *Pediatr Res* 2004;55:280-6.
30. Schleiss MR. Cytomegalovirus in the neonate: immune correlates of infection and protection. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:501801.
31. Chatzakis C, Ville Y, Makrydimas G, Dinas K, Zavlanos A, Sotiriadis A. Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223:870-83.e11.
32. Bilavsky E, Pardo J, Attias J, Levy I, Magny JF, Ville Y, et al. Clinical implications for children born with congenital cytomegalovirus infection following a negative Amniocentesis. *Clin Infect Dis* 2016;63:33-8.
33. Leruez-Ville M, Magny JF, Couderc S, Pichon C, Parodi M, Bussi eres L, et al. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection following primary and Nonprimary maternal infection: a prospective neonatal screening study using polymerase chain reaction in Saliva. *Clin Infect Dis* 2017;65:398-404.

3. Artículo tercero. Role of Magnetic Resonance Imaging and Cranial Ultrasonography in Congenital Cytomegalovirus Infection. Blázquez-Gamero D*, Soriano-Ramos M*, Martínez de Aragón A, Baquero-Artigao F, Frick MA, Noguera-Julian A, Alonso-Ojembarrena A, Moliner Calderón E, Rives Ferreiro MT, Filgueira Posse A, Garrote Llanos E, Sota Busselo I, Santos M, Tagarro García A, Bustamante J, Soler-Palacín P, Fortuny Guasch C, Rojo Conejo P; Spanish Registry of Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection (REDICCMV) Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(11):1131-1137.

* Ambos autores han contribuido igualmente.

Role of Magnetic Resonance Imaging and Cranial Ultrasonography in Congenital Cytomegalovirus Infection

Daniel Blázquez-Gamero, PhD, MD,* María Soriano-Ramos, MD,† Ana Martínez de Aragón, PhD, MD,‡
 Fernando Baquero-Artigao, MD,§ Marie Antoinette Frick, MD,¶ Antoni Noguera-Julian, PhD, MD, ||**††‡‡
 Almudena Alonso-Ojembarrena, MD,§§ Elisenda Moliner Calderón, MD,¶¶ María Teresa Rives Ferreira, MD, || ||
 Ana Filgueira Posse, MD,*** Elisa Garrote Llanos, MD,*** Itziar Sota Busselo, MD,‡‡‡ Mar Santos, MD,‡‡‡
 Alfredo Tagarro García, PhD, MD,¶¶¶ Jorge Bustamante, MD,§ Pere Soler-Palacín, PhD, MD,
 ¶¶ Claudia Fortuny Guasch, PhD, MD,***††‡‡ and Pablo Rojo Conejo, PhD, MD*,
 and the Spanish Registry of Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection (REDICCMV) Study Group

(*Pediatr Infect Dis J* 2019;38:1131–1137)

Cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of congenital infection in developed countries, affecting 0.2%–2.4% of newborns.¹ Most of the babies with congenital cytomegalovirus (cCMV) infection exhibit no symptoms at birth. However, 10%–15% of asymptomatic and approximately 50% of symptomatic newborns will develop long-term sequelae, such as hearing loss and neurodevelopmental impairment.¹ Neuroimaging studies are the best prognostic markers in cCMV infection.^{2–7} Computed tomography (CT) has been widely used to detect brain lesions in cCMV.^{2,4} However, there is great concern about the radiation exposure in those children.³ Cranial ultrasonography (cUS) is very reliable in

detecting a wide range of central nervous system (CNS) abnormalities commonly encountered in cCMV infection.^{3,5,6} However, cUS imaging acquisition and interpretation depends on the skills and experience of the physician and is not the best tool to disclose cortical, white matter (WM) and posterior fossa abnormalities.

On the other hand, magnetic resonance imaging (MRI) plays a crucial role in the diagnosis of brain developmental disorders (namely cortical dysplasias and cerebellar hypoplasia) and WM abnormalities.^{6,8} However, scarce data are available on the relationship between neonatal cUS and MRI findings and long-term sequelae (mainly hearing loss and neurologic abnormalities) in patients with cCMV.⁶ Therefore, we aim to establish the role of cerebral MRI and cUS in long-term prognosis of infants with cCMV.

METHODS

Study Population

A multicenter observational study of infants with cCMV was carried out in a prospective longitudinal cohort in Spain [Spanish Registry of Congenital Cytomegalovirus Infection (REDICCMV)]. Enrollment started in January 2011 and includes children diagnosed with cCMV from 48 hospitals in Spain, followed since birth. All consecutive newborns with cCMV infection born from January 2011 to May 2017 were eligible for the inclusion in the cohort.

Only children diagnosed with cCMV during the fetal period or at birth (first 14 days of life) were included in this study. Retrospective cases diagnosed by a positive CMV-polymerase chain reaction (PCR) in dried blood spots (DBS) after 14 days of life were excluded. Study data were collected and managed using REDCap, an electronic data capture tool hosted at Instituto de Investigación 12 de Octubre, in a secure server.⁹ Screening for maternal CMV infection during pregnancy is not mandatory in Spain, and newborn cCMV screening is only routinely performed in selected populations. Fetuses and newborns with signs and symptoms of congenital infection were investigated for cCMV.

Study Design

In Spain, there is a consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases on the diagnosis and treatment of cCMV infection,¹⁰ which helps to achieve a consistent management of these patients among centers. All the infants with cCMV infection underwent several tests within the first days of life in accordance with the consensus recommendations: physical examination by an experienced neonatologist or pediatrician, laboratory tests (complete blood count with liver enzymes and conjugated bilirubin), virologic tests (CMV-PCR) and viral load in blood and urine), brainstem-evoked response (BSER) in both ears, an ophthalmic assessment (funduscopy) and a cUS. Cranial US was

Accepted for publication July 24, 2019.

From the *Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), Traslational Research Network in Pediatric Infectious Diseases (RITIP) Madrid, Spain, †Department of Neonatology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ‡Neuroradiology Section, Radiology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, §Servicio de Pediatría Hospitalaria, Enfermedades Infecciosas y Tropicales Pediátricas, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, ¶Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencias Unit, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ||Malalties infeccioses i resposta inflamatòria sistèmica en pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatría, Hospital Sant Joan de Déu, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (Ciberesp, Spain), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **CIBER de Epidemiología y Salud Pública (Ciberesp), Spain, ††Department of Pediatrics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ‡‡Neonatology Unit, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain, §§Neonatology Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ¶¶Pediatric Intensive Care Unit and Neonatology, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Spain, ||||Neonatology Unit, Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca, Spain, ***Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain, †††Neonatology Unit, Hospital de Donostia, Guipúzcoa, Spain, ‡‡‡Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario Gregorio Marañón Madrid, Spain, and §§§Department of Pediatrics, Hospital Universitario Infanta Sofía, Universidad Europea de Madrid, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain.

Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness) and European Regional Development Fund (Grant number: PI16/807, D.B.), Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (Grant number: AY11-2016; D.B.). D.B. has received a consultancy payment from Roche.

D.B. and M.S. have contributed equally.

Address for correspondence: Daniel Blázquez-Gamero, PhD, MD, Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, RITIP, Avenida de Córdoba S/N, 28041 Madrid, Spain. E-mail: danielblazquezgamero@gmail.com

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0891-3668/19/3811-1131

DOI: 10.1097/INF.0000000000002455

performed within the first month of life in all children with cCMV by a pediatric radiologist in each center. MRI was performed within the first 3 months of life in all children with symptomatic cCMV: infants with abnormal findings in blood tests and/or in cUS, children with sensorineural hearing loss (SNHL) or with any symptoms during physical examination (see Definitions below).

In 12 de Octubre Hospital and Quirón Barcelona Hospital MRIs were routinely performed in all newborns with cCMV, including asymptomatic patients. In those hospitals, MRI examinations were performed using 1.5 T scanner and without sedation, applying a vacuum mattress to immobilize the baby. MRI was performed in each participating center according to the standard protocol: axial T1w, axial and coronal T2w, axial diffusion, 3D isometric sagittal T1w, and axial SWI (Susceptibility Weighted Imaging). Interpretation of cUS and MRI images was performed by an experienced radiologist in each participating center.

Symptoms of cCMV were evaluated at birth and at 12 months of age. All newborns with SNHL or CNS involvement received antiviral (ganciclovir and/or valganciclovir) treatment for at least 6 weeks and up to 6 months, in accordance with the 2009 Spanish Consensus document.¹⁰ Since 2015, after the publication of the randomized, placebo-controlled trial of 6 weeks versus 6 months of oral valganciclovir in children with symptomatic cCMV, most treated children received antivirals during 6 months.¹¹

The primary outcome of this study was the presence of neurologic abnormalities [epilepsy on treatment, inability to remain seated without assistance, motor impairment (paresis and/or spasticity), chorioretinitis, microcephaly or neurodevelopmental delay] and/or SNHL at 12 months of age.

Ethics

Informed consent from the parents or legal guardians of all study patients was obtained. The study was approved by the Institutional Review Board of 12 de Octubre University Hospital (number: 11/316).

Inclusion and Exclusion Criteria

All the patients included in the study fulfilled the following criteria: cCMV diagnosis during the fetal period or at birth, cUS done within the first month of life and cranial MRI performed before 3 months of age.

Patients with other neurologic conditions besides CMV, as well as those with cUS and/or MRI performed after 1 and 3 months of age, respectively, were excluded.

Definitions

Congenital CMV was defined as a positive CMV culture or identification of viral DNA by PCR in urine during the first 2 weeks of life. Diagnosis of CMV infection in the fetus was defined by a positive CMV-PCR in amniotic fluid and was confirmed with a positive sample in urine after birth. Seven different CMV-PCR kits were used in 15 different laboratories. All of them applied a quantitative real-time PCR technique coupled with automated nucleic acid extraction systems.

Symptomatic infection at birth was defined as the presence of abnormalities on physical examination (petechiae/purpura, jaundice, hepatomegaly, splenomegaly, hypotonia, seizures, paresis, or weak sucking), chorioretinitis, SNHL, small for gestational age (SGA), thrombocytopenia (platelet count $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$), elevated alanine aminotransferase levels (ALT > 80 IU/L), hyperbilirubinemia (direct bilirubin level >2 mg/dL), microcephaly or neuroimaging abnormalities in cUS or MRI. Newborns who did not fulfill any of the mentioned criteria after a complete evaluation at birth were considered as cCMV-asymptomatic.

SGA was defined as a birth weight below a SD of -2 for age and sex according to the Spanish growth charts.¹² Microcephaly was defined as a head circumference below an SD of -2 for age and sex as per the same Spanish growth charts.¹²

SNHL was defined as a hearing threshold >25 dB tested by BSER in any ear. SNHL was evaluated at birth and at 12 months of age.

Neuroimaging abnormal findings on first cUS and first MRI included: WM abnormalities, ventricular adhesions, intracranial calcifications, ventriculomegaly, cerebellar hypoplasia, CNS ischemic lesions, microcephaly (head circumference < -2 Z score), periventricular cysts, caudothalamic/subependymal cysts, hydrocephalus, lissencephaly, polymicrogyria, or other migrational abnormalities. Children with lenticulostriate vasculopathy (LSV) were evaluated and in case of an isolated LSV without other findings in MRI, LSV was considered as a not pathologic finding.¹³ WM abnormality in MRI was defined as an abnormal signal intensity within the WM (a high signal intensity on T2-weighted sequences and low signal intensity on T1-weighted sequences) as it has been previously described by Alarcon *et al.*⁸

Ventriculomegaly in cUS was defined as the presence of ventricular size over 97th centile for gestational age.¹⁴ On MRI, ventriculomegaly was defined as the presence of a frontal/occipital horn ratio greater than 0.4.³

Neurologic abnormalities at 12 months of age were defined as the presence of epilepsy on treatment, inability to remain seated without assistance, motor impairment (spasticity and/or paresis), chorioretinitis, microcephaly, or neurodevelopmental delay evaluated by a pediatrician and/or a neuropsychiatrist, depending on each center's availability.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using SPSS Statistical Software, version 20 (IBM SPSS, Armonk, NY). Continuous variables were described with mean and SD or median and interquartile range. Categorical variables were described with absolute and relative frequencies. Comparisons between categorical variables in the 2 groups were performed using χ^2 or Fisher exact test.

Contrast between groups in continuous variables was calculated using Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test. A 2-tailed $P < 0.05$ was considered statistically significant. Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were calculated for the presence of sequelae (hearing loss and neurologic abnormalities) at 12 months of age and the presence of abnormalities on physical examination at birth, failure in hearing screening, abnormalities in cUS and MRI. Multivariate analysis using logistic regression analysis was performed; all variables with *P*-value under 0.05 were included, and association with sequelae at 12 months of age was calculated.

RESULTS

Among 421 children with cCMV followed in the cohort, 107 met the inclusion criteria for the study. In the 314 remaining patients, cUS or MRI were lacking or not performed on time or presented other exclusion criteria like retrospective diagnosis by PCR in DBS. Characteristics of children included and excluded from the study were listed in Table 1.

Twenty-one infants (19.6%) were diagnosed during fetal period and infection was confirmed after birth. The remaining 86 (80.4%) were diagnosed within the first 14 days of life. Main characteristics at birth of the 107 patients are summarized in Table 1.

Overall, 46% ($n = 49$) presented an abnormal physical examination at birth, and 77/107 (72%) were classified as symptomatic cCMV at birth. Of 95 children (89%) in which BSER result was available at birth, 40 (42.1%) showed abnormal results. Five

TABLE 1. Characteristics at Birth of 107 Newborns Included and 314 Excluded From the Study

	Included (n = 107)	Not Included (n = 314)	P-value
Male sex	45/103 (43.7)	145/296 (49)	0.4
Immunodeficiency	1/105 (0.9)	7/301 (2.3)	0.95
Birth weight (g)	2591 ± 764	2531 ± 769	0.5
Gestational age (weeks)	37.53 ± 2.68	36.9 ± 3.5	0.6
Abnormal physical exam	49/105 (46.7)	80/292 (27.4)	0.0001
Microcephaly	9 (8.4)	19 (6)	0.41
Seizures	1 (0.9)	0 (0)	0.25
Splenomegaly	19 (17.8)	9 (2.9)	0.0001
Hepatomegaly	18 (16.8)	10 (3.2)	0.0001
Hypotonia	12 (11.2)	7 (2.2)	0.0001
Jaundice	8 (7.5)	13 (4.1)	0.18
Petechiae/purpura	27 (25.2)	30 (7.6)	0.0001
SGA	14 (13.1)	30 (9.5)	0.32
Other	15 (14.0)	19 (6)	0.01
Chorioretinitis	5/104 (4.8)	8/280 (2.9)	0.7
Failed hearing screening	41/101 (40.6)	66/273 (24.2)	0.002
Hearing loss at birth	40/95 (42.1)	85/256 (33.2)	0.1
Abnormal blood tests			
Hepatitis (ALT > 80 IU/L)	9/91 (9.9)	6/186 (3.2)	0.04
Thrombocytopenia (<100 × 10 ³ /μl)	30/98 (30.6)	23/209 (11)	0.0001
Symptomatic at birth	77/107 (72)	133/297 (44.8)	0.0001

Values are presented as counts (n) and percentages (%) or mean and SD. Comparison of clinical characteristics among those 2 groups was evaluated by χ^2 test or Mann-Whitney *U* test.

children (4.8%) presented chorioretinitis. Blood tests presented abnormal findings in 46 (45.5%) children. The most common laboratory abnormality was thrombocytopenia in 30/98 (30.6%), followed by an increased ALT level in 9 children (Table 1).

Regarding neonatal neuroimaging, the first cUS was abnormal in 60 patients (56.1%) and MRI showed abnormalities in 68 (63.6%) children. cUS and MRI findings are listed in Table 2.

Of 47 children with normal cUS at birth, 13 (27.7%) presented abnormal MRI findings, being WM abnormalities the most common finding (9/13; 69.2%) (Table 3). Six of 13 patients with normal cUS and abnormal MRI (6/13, 46.2%) showed abnormalities

TABLE 2. Neuroimaging Abnormalities of 107 Newborns With cCMV Infection

Neuroimaging Finding	Cranial Ultrasound, n (%)	Cerebral MRI, n (%)
WM abnormalities	18 (16.8)	45 (42.1)
Ventricular adhesions	3 (2.8)	4 (3.7)
Intracranial calcifications	25 (23.4)	19 (17.8)
Ventriculomegaly	7 (6.5)	16 (15.0)
Cerebellar hypoplasia	2 (1.9)	3 (2.8)
Ischemic CNS lesions	1 (0.9)	2 (1.9)
Microcephaly	5 (4.7)	6 (5.6)
Periventricular cysts	28 (26.2)	26 (24.3)
Caudothalamic/subependymal cysts	3 (2.8)	0
Lissencephaly/other migrational abnormalities	2 (1.9)	11 (10.3)
Polymicrogyria	0	1 (0.9)
Hydrocephalus	4 (3.7)	4 (3.7)

Values are presented as counts (n) and percentages (%).

on physical examination at birth and 4/13 (30.8%) presented hearing loss in BSER. Five of those children (5/13; 38.4%) presented a normal physical examination with normal BSER at birth (Table 3). Findings in MRI, and clinical outcomes of children with isolated LSV without other findings in cUS were listed in Table 4. All children with isolated LSV and normal MRI (except 1 child with polymalformative syndrome, not associated with cCMV) had good clinical outcomes at 1 year of age (Table 4).

There were 5 children with abnormal cUS and normal MRI; most of them (4/5; 80%) presented images suggesting intracranial calcifications at cUS that were not detected in MRI. Three children presented calcifications alone, 1 child calcifications and periventricular cysts, and 1 child enlargement of the cisterna magna.

All but 11 children (7 asymptomatic and 4 children with CMV-related symptoms) received antiviral treatment during the follow-up (96/107, 89.7%). Intravenous ganciclovir followed by oral valganciclovir (61/96; 63.5%) was the most common treatment option. Oral valganciclovir alone was given in 27 cases (27/96, 28.1%) and intravenous ganciclovir in 8 (8/96, 8.3%).

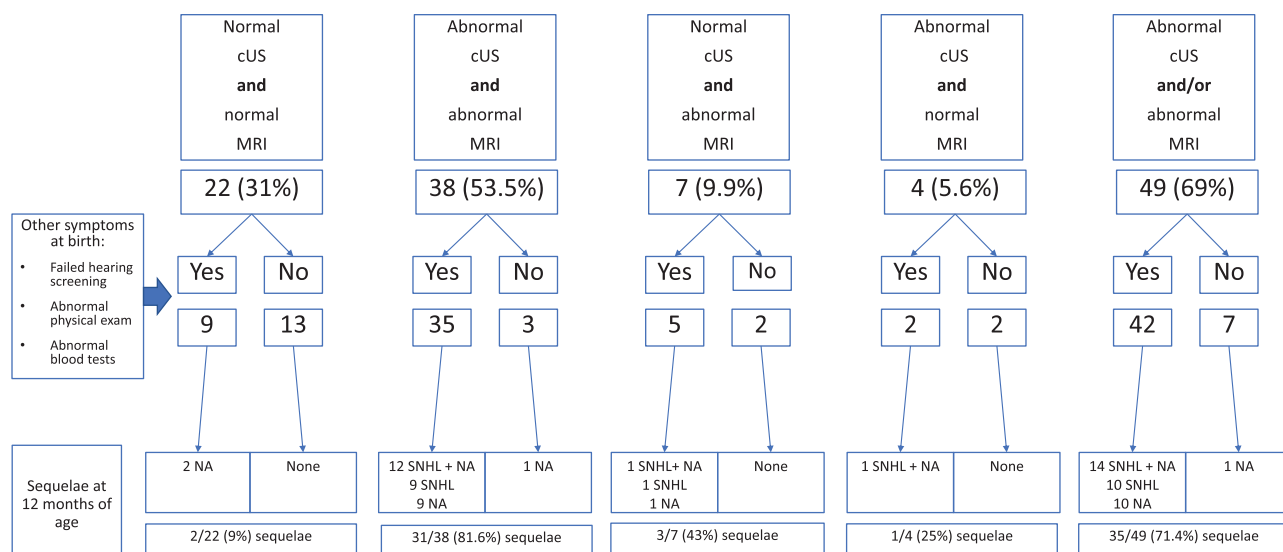


FIGURE 1. MRI and cranial ultrasound findings and other cCMV-related symptoms at birth of 71 children with available follow-up and outcomes at 12 months of age. NA indicates neurological abnormalities.

TABLE 3. Characteristics of 13 Newborns With cCMV Infection, Normal cUS and Abnormal MRI

Patient	Physical Exam	Findings Physical Exam	Abnormalities in Lab (<100,000 Platelets, ALT >80 IU/L)	Hearing Screening (Pass/No Pass)	Hearing Loss (BERS)	MRI Findings	Antiviral Treatment	Hearing Loss 12 Months	Neurologic Abnormalities 12 Months	Any Aqueclae 12 Months
1	Normal	No	No	Pass	No	WM abnormalities	Valganciclovir p.o.	Unknown	No	Unknown
2	Abnormal	SGA, jaundice	No	Pass	No	Intracranial calcifications	Valganciclovir p.o.	Yes, moderate	No	Yes
3	Abnormal	Other	Yes. Thrombocytopenia of 54,200/mm ³	No pass (right and left failed)	Yes, mild	Ischemic CNS lesions	Valganciclovir p.o.	Yes, moderate	Yes	Yes
4	Normal	No	No	No pass (right and left failed)	Yes, moderate	WM abnormalities	Valganciclovir p.o.	Yes, mild	No	Yes
5	Normal	No	No	Pass	No	WM abnormalities	Ganciclovir i.v and Valganciclovir p.o	No	No	No
6	Abnormal	SGA, microcephaly	No	Pass	No	WM abnormalities, cerebellar hypoplasia	Valganciclovir p.o.	No	No	No
7	Normal	No	No	Pass	No	WM abnormalities	Valganciclovir p.o.	No	No	No
8	Abnormal	Splenomegaly, hepatomegaly, petechia/purpura	No	Pass	No	Periventricular cysts	Ganciclovir i.v	No	No	No
9	Normal	No	No	No pass (right and left failed)	No	WM abnormalities	Valganciclovir p.o.	<12 months of age	<12 months of age	<12 months of age
10	Normal	No	No	Pass	No	WM abnormalities	Valganciclovir p.o.	<12 months of age	<12 months of age	<12 months of age
11	Normal	No	Yes. ALT 90 IU/L	Pass	No	WM abnormalities	Valganciclovir p.o.	Loss of follow-up	Loss of follow-up	Loss of follow-up
12	Abnormal	Microcephaly, other	No	No pass (right and left failed)	Yes, severe	Intracranial calcifications, ventriculomegaly, small subarachnoid hemorrhage	Ganciclovir i.v and Valganciclovir p.o	Loss of follow-up	Loss of follow-up	Loss of follow-up
13	Abnormal	SGA, splenomegaly, hepatomegaly, hypotonia, jaundice, petechia/purpura	No	No pass (right and left failed)	Yes, moderate	WM abnormalities	Ganciclovir i.v and Valganciclovir p.o	<12 months of age	<12 months of age	<12 months of age

TABLE 4. Physical Examination, Hearing Loss, Chorioretinitis, MRI Findings, and Clinical Outcomes in Children with Isolated LSV in Cranial Ultrasounds

Case	Physical Examination at Birth	Hearing Loss at Birth	Chorioretinitis at Birth	MRI Findings at Birth	WM Abnormalities	Other MRI Findings	Hearing Loss (12 Months of Age)	Neurologic Abnormalities (12 Months of Age)
1	Normal	No	No	No	No	No	No	No
2	Polymalformative syndrome	No	No	No	No	No	No	Yes, moderate psychomotor delay
3	Normal	No	No	No	No	No	No	No
4	Normal	No	No	No	No	No	No	No
5	Normal	No	No	Yes	Yes	No	No	No
6	Normal	No	No	No	No	No	No	No
7	Normal	No	No	No	No	No	No	No
8	Normal	No	No	No	No	No	No	No
9	Normal	No	No	Yes	Yes	No	No	No
10	Splenomegaly hepatomegaly	No	No	Yes	No	Periventricular cysts	No	No

TABLE 5. Association Between Physical Examination at Birth, Hearing Screening, cUS Findings, and Cranial MRI Findings and the Presence of Sequelae at 12 Months of Age

	OR*	95% CI*	P-value*	OR†	95% CI†	P-value†
Abnormal physical examination at birth	3.2	1.2–8.6	0.017	2	0.5–8.6	0.4
Failed hearing screening	21.8	6–79	0.0001	8.5	1.9–37.8	0.005
Abnormal cUS	15.4	4.6–50.9	0.0001	2.7	0.5–14.7	0.25
Abnormal MRI	23.7	6–94.4	0.0001	7.5	1.2–45.3	0.028

*Univariate analysis.

†Multivariate logistic regression analysis.

In terms of follow-up, data about sequelae at 12 months of age were available in 71 children (66.4%). Main results are shown in Fig. 1. One-half (37; 52%) presented sequelae at 12 months: 14/71 (19.7%) showed hearing loss and neurologic abnormalities, 10/71 (14%) isolated SNHL, and 13/71 (18.3%) neurologic abnormalities. At 12 months of age, no long-term sequelae were found among children with normal cranial ultrasounds and no other cCMV-related symptoms at birth (n = 15). In the univariate analysis, the presence of abnormalities in physical examination, a failed hearing screening test in any ear and abnormalities in cUS/MRI were significantly associated with sequelae at 12 months of age (Table 5). In the multivariate logistic regression analysis, only a failed hearing screening test (OR 8.5; 95% CI: 1.9–37.8; P = 0.005) and abnormalities in MRI (OR: 7.5; 95% CI: 1.2–45.3; P = 0.028) were independent risk factors for sequelae at 12 months of age (Table 5).

DISCUSSION

In the present study, abnormalities in MRI and a failed result in the hearing screening test were both independent risk factors for sequelae at 12 months of age. One-quarter of children with normal cUS presented abnormalities in MRI. Most of them (8/13) showed isolated WM abnormalities, but 5 presented additional findings such as periventricular cysts or images suggesting intracranial calcifications, which were missed in the cUS examination. This study suggests that, compared with cUS, MRI discloses relevant additional information in children with cCMV.

In REDICCMV cohort, there is a high proportion of symptomatic children, probably because screening of CMV during pregnancy or after birth is not mandatory in Spain, and most cases are diagnosed in the neonatal period because of the

presence of clinical symptoms. Moreover, the rate of symptomatic infants is higher in the “MRI performed” group (Table 1). Clinicians are more prone to perform MRI in more symptomatic cases. On the other hand, we have included the presence of image abnormalities in cUS or MRI in our definition of “symptomatic cCMV at birth.” In other studies, image findings were not included in the definition of “symptomatic” children, what could be another reason for the high proportion of symptomatic children found in this study.¹⁵

Previous studies¹⁶ indicated a good correlation between cUS abnormalities and the prediction of outcome in newborns with cCMV infection and symptoms at birth. However, there was a small proportion of children with normal cUS at birth who developed long-term sequelae. In the study of Capretti et al³, among 34 children with cCMV and normal cUS, 3 presented CNS involvement in MRI and long-term sequelae. In our series, 3 out of 7 children with normal cUS and abnormal MRI and available follow-up, presented sequelae at 12 months of age. De Vries et al⁶ performed another study in symptomatic children and found that MRI provides important additional information over cUS and CT scan, especially in the evaluation of polymicrogyria, hippocampal dysplasia, and cerebellar hypoplasia. Giannattasio et al¹⁶ performed cUS, CT scan, and MRI in a cohort of 170 Italian children, and CT had higher AUC for neurologic impairment than cUS and MRI.

We found 63% of children with CNS involvement in MRI in our sample. In this cohort, there was a high proportion of children diagnosed with cCMV because of the presence of abnormalities in physical examination or a failed hearing screening test and those children had a higher risk of CNS abnormalities. This high rate of abnormal findings was similar in other cohorts with high proportion of symptomatic children. In the Italian study, 75% of

symptomatic children showed abnormalities in MRI.¹⁶ But also, in a screening study performed in Japan, there was a high prevalence of MRI abnormalities among infected children.¹⁷

There are several image findings that could be present in MRI and/or cUS in children with cCMV. Cysts may be found in the caudothalamic groove, germinal matrix or periventricular zone.¹⁸ WM abnormalities are present as bilateral and multifocal patchy areas near the wall of the atrium of ventricles.^{18,19} It should be noted that WM involvement evaluation is challenging, particularly before the age of complete myelination; and prognosis of children with isolated mild WM disease has not been well established yet.²⁰ Parenchymal calcifications are considered a characteristic finding of cCMV infection and also a risk factor for neurodevelopmental delay.³ MRI detection of parenchymal calcifications could be difficult in the absence of SWI sequences. However, a careful detailed examination may be able to detect punctate foci of low signal on T2w or high signal on T1w images, through the periventricular wall, germinal matrix or basal ganglia in fetal and neonatal MRI.^{18,21} In our study, SWI sequences were not performed in all participant centers, which is probably why calcifications were more commonly detected with cUS than with MRI.

MRI is not an invasive technique and it is possible to perform it during the neonatal period without sedation.³ There is currently a controversial debate on whether MRI should be performed in children without any other symptoms.²² In our sample, the limited number of children without symptoms at birth (with normal physical examination, normal hearing evaluation and normal cUS) makes it impossible to draw conclusions in this point, but all children with normal cUS and no other cCMV-related symptoms showed no sequelae at 12 months of age.

We are aware of some limitations of our study. First of all, MRI is not routinely performed in all centers. In our cohort, MRI is more frequently performed in those children with abnormalities in physical examination, in blood tests or if hearing loss is suspected (Table 1). This fact bears the risk of overestimating the frequency of CNS damage. Moreover, in Spain, there is no national screening program for cCMV in newborns, so diagnosis of cCMV is more likely to be done in severe cases.

We have a small proportion of children without abnormalities in physical examination, and with normal hearing evaluation and normal cUS, so results could not be extrapolated to this population. Evaluation of cUS and MRI images were not blinded reviewed and were evaluated by different neuroradiologist, so, despite they are experienced professionals, an inter-observer variability may be present. Another important limitation was the short follow-up period (12 months), so that only severe neurologic abnormalities could be ruled out on examination and minor neurocognitive problems, that would appear in the future during the preschool and school-age, may be hardly assessed. Ideally, a new evaluation should be performed in this cohort at the time of school age, to exclude other missing neurocognitive problems.

Several authors proposed different score systems for the evaluation of image findings in cCMV.^{2,8,16} Noyola's score was based on CT findings and its application for MRI seems to be less accurate.¹⁶ Alarcon et al⁸ have built a new imaging score that was more accurate than Noyola's in predicting sequelae, but MRI was performed only in 9 children. Giannattasio et al¹⁶ tested Alarcon's score in an Italian cohort of 170 congenitally CMV infected children showing a low positive predictive values when MRI was used.

This study, in common with others recently published,¹⁷ showed that the proportion of children with cCMV and CNS involvement is higher than expected. We should think again about the current definition of "asymptomatic children" in cCMV infection. We consider that it would be necessary to move from this dual model ("asymptomatic vs. symptomatic") to a new

classification based on the risk of long-term sequelae and imaging studies (cUS and MRI) should be one of the cornerstones of this new model.

In conclusion, abnormalities in MRI and a failure in the hearing screening test are independent risk factors for long-term sequelae in children with cCMV. MRI provides additional useful information, compared with cUS, and there is a proportion of children with normal cUS that showed abnormal MRI findings. MRI should be performed in all children with cCMV and any other cCMV-related symptoms at birth. We need more studies to clarify if MRI should be routinely recommended in infants with cCMV, normal cUS, and without other symptoms.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Spanish Registry of Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection (REDICCMV) Study Group: Laura González, Alicia Ortiz and Diego Jacobo Rodríguez (Complutense University), Jesús Saavedra-Lozano (Hospital Gregorio Marañón, Madrid), Francisco Álvarez Breciano (Hospital San Agustín de Avilés, Asturias), Beatriz Agúndez Reigosa (Hospital Infanta Leonor, Madrid), Rebeca Lahoz (Hospital Joan XXIII, Tarragona), Juana Barja Tur (Hospital Moncloa, Madrid), José Beceiro (Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid), Xavier Bringué Espuny (Hospital Arnau de Vilanova, Lleida), Olga Calaviar Garsaball (Hospital Joan XXIII, Tarragona), Begoña Carazo Gallego (Hospital Regional de Málaga, Málaga), Jaime Carrasco (Hospital La Moraleja, Madrid), Laura Castells Vilella (Cipio Hospital General de Catalunya, Sant Cugat del Vallés, Barcelona), María José Cilleruelo (Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid), Elena Colino Gil (Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria), Wilfredo Coroleu Lletget (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona), Araceli Corredera Sánchez (Hospital Clínico San Carlos, Madrid), Irene Cuadrado Pérez (Hospital de Getafe, Madrid), Teresa del Rosal (Hospital La Paz, Madrid), Roser Diez Martín (Hospital de Mataró, Barcelona), Luis Escosa García (Hospital Universitario La Paz, Madrid), Clotilde Fernández Gutiérrez del Alamo (Hospital Puerta del Mar, Cádiz), Laura Ferreras Antolín (Hospital Carlos Haya, Málaga), Pilar Galán del Río (Hospital de Fuenlabrada, Madrid), María Jesús García García (Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres), Cristina Epalza, Cinta Moraleda, Elisa Fernández-Cooke, Luis Prieto (Hospital 12 de Octubre, Madrid), Ana María Grande Tejada (Hospital Infanta Cristina, Badajoz), Ana Belén Jiménez (Fundación Jiménez Díaz, Madrid), Natalia Joaqui López (Cipio Hospital General de Catalunya, Sant Cugat del Vallés, Barcelona), Isabel Llana Martín (Hospital Torrelodones, Madrid), Marta Llorente (Hospital Sureste, Arganda, Madrid), Antonio Francisco Medina Claros (Hospital de la Axarquía, Málaga), Ana Menasalvas Ruiz (Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia), María Méndez (Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Barcelona), María Montero Martín (Hospital Comarcal de Melilla), Abián Montesdeoca Melián (Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria), Oihana Muga Zuriarrain (Hospital de Donostia, Guipúzcoa), Iciar Olabarrieta (Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid), Lorena Pérez Cid (Hospital Infanta Sofía, Madrid), Raquel Pinillos (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza), Roser Porta (Hospital Dexeus Quirón, Barcelona), Flavia Pronzato Cuello (Hospital General de Castellón), José Manuel Rumbao Aguirre (Hospital Reina Sofía de Córdoba), Paula Sánchez Pintos (Hospital Barbanza, A Coruña), Miguel Sánchez Mateos (Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid), Begoña Santiago, Jesús Saavedra (Hospital Gregorio Marañón, Madrid), Beatriz Soto Sánchez (Hospital de Getafe, Madrid), Pedro Terol Barrero (Hospital Virgen

de la Macarena, Sevilla), Grisel Vilagrassa Restifo (Hospital Dexeus Quirón, Barcelona), Javier Vilas González (Hospital de Pon-tevedra), Isabel Vives Oñós (Hospital Quironsalud, Barcelona), Marta Dapena (Hospital General de Castellón), Susana Herrero Pérez (Hospital Son Llatzer), Antonio Cepillo (Hospital de Albacete). Our thanks are due to Mr. Martin J. Smyth, B.A, for his help in correcting the English.

REFERENCES

- Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, et al. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:86–102.
- Noyola DE, Demmler GJ, Nelson CT, et al; Houston Congenital CMV Longitudinal Study Group. Early predictors v neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2001;138:325–331.
- Capretti MG, Lanari M, Tani G, et al. Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev*. 2014;36:203–211.
- Boppana SB, Fowler KB, Vaid Y, et al. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 1997;99:409–414.
- Ancora G, Lanari M, Lazzarotto T, et al. Cranial ultrasound scanning and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2007;150:157–161.
- de Vries LS, Gunardi H, Barth PG, et al. The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics*. 2004;35:113–119.
- Alarcon A, Martinez-Biarge M, Cabañas F, et al. Clinical, biochemical, and neuroimaging findings predict long-term neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2013;163:828–34.e1.
- Alarcon A, Martinez-Biarge M, Cabañas F, et al. A prognostic neonatal neuroimaging scale for symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Neonatology*. 2016;110:277–285.
- Harris PA, Taylor R, Thielke R, et al. Research electronic data capture (REDCap) – A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009 Apr;42(2):377–81.
- Baquero-Artigao F, Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection. *An Pediatr (Barc)*. 2009 Dec;71(6):535–47.
- Kimberlin DW, Jester PM, Sanchez PJ, et al; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med*. 2015;372:933–943.
- Carrascosa Lezcano A, Ferrández Longás S, Yeste Fernández D, et al. Spanish cross-sectional growth study 2008. Part I: weight and height values in newborns of 26–42 weeks of gestational age. *An Pediatr (Barc)*. 2008 Jun;68(6):544–51.
- Giannattasio A, Di Costanzo P, Milite P, et al. Is lenticulostriated vasculopathy an unfavorable prognostic finding in infants with congenital cytomegalovirus infection?. *J Clin Virol*. 2017;91:31–35.
- Levene MI. Measurement of the growth of the lateral ventricles in preterm infants with real-time ultrasound. *Arch Dis Child*. 1981;56:900–904.
- Dreher AM, Arora N, Fowler KB, et al. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2014;164:855–859.
- Giannattasio A, Bruzzese D, Di Costanzo P, et al. Neuroimaging profiles and neurodevelopmental outcome in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37:1028–1033.
- Yamaguchi A, Oh-Ishi T, Arai T, et al. Screening for seemingly healthy newborns with congenital cytomegalovirus infection by quantitative real-time polymerase chain reaction using newborn urine: an observational study. *BMJ Open*. 2017;7:e013810.
- Fink KR, Thapa MM, Ishak GE, et al. Neuroimaging of pediatric central nervous system cytomegalovirus infection. *Radiographics*. 2010;30:1779–1796.
- van der Knaap MS, Vermeulen G, Barkhof F, et al. Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology*. 2004;230:529–536.
- Manara R, Balao L, Baracchini C, et al. Brain magnetic resonance findings in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Radiol*. 2011;41:962–970.
- Averill LW, Kandula VV, Akyol Y, et al. Fetal brain magnetic resonance imaging findings in congenital cytomegalovirus infection with postnatal imaging correlation. *Semin Ultrasound CTMR*. 2015;36:476–486.
- Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, Sharland M. Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Hum Dev*. 2011;87(11):723–8.

V. Discusión integradora

1. Papel de la respuesta celular T en la infección gestacional por citomegalovirus y su relación con la transmisión intrauterina

1.1. Importancia de la respuesta celular en el control de la infección por CMV.

La transmisión intrauterina de CMV dependen de múltiples factores, como el estado y función inmune de la madre y el feto, factores placentarios, carga viral materna en sangre y también se ha descrito influencia de la cepa de virus que infecta a la madre^{57,65}. Se sabe que el riesgo de infección fetal durante la gestación es mayor tras una infección primaria (32-40%) que tras una infección no primaria (1,4%)^{15,18,65}, por lo que la respuesta inmunitaria preexistente en la madre parece proporcionar cierto grado de protección frente a la transmisión de la infección al feto. Sin embargo, actualmente con los marcadores pronósticos de los que disponemos, no es posible predecir con certeza si la infección materna se transmitirá al feto o no. Los estudios en receptores de trasplantes también han mostrado la importancia de la respuesta celular T específica frente a CMV en el control de la infección viral¹⁵⁹.

En el presente estudio sobre respuesta celular T específica en la cohorte de 60 gestantes con infección primaria documentada por CMV, no se encontró asociación entre las respuestas específicas CD4 y CD8 frente a CMV en el momento del diagnóstico de la primoinfección y el riesgo de transmisión intrauterina. Se incluyó a 24 madres transmisoras y 36 no transmisoras. Se evidenció una amplia dispersión de los recuentos de linfocitos T CD4 y CD8 específicos productores de IFN- γ y en el análisis univariante no hubo diferencias significativas entre las madres transmisoras y las no transmisoras respecto a los valores absolutos y porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8 específicos productores de IFN- γ . Además, los modelos de análisis multivariante tampoco mostraron asociación entre la transmisión intrauterina y la respuesta celular CD4 y CD8 específica, teniendo en cuenta la influencia potencial de factores como haber recibido tratamiento con HIG / valaciclovir previo a la amniocentesis (de forma preventiva, sin

infección fetal confirmada) y el tiempo desde la infección materna hasta la recogida de la muestra para estudio de respuesta celular. El momento de la infección materna fue estimado a través de la avidéz relativa en un análisis de regresión lineal calculado en base a datos suministrados por el proveedor del ensayo de avidéz (Abbot®). No obstante, se observó una interacción entre la respuesta CD8 específica y el tiempo entre la infección y la extracción de la muestra de sangre, de forma que el efecto del tiempo desde la infección materna hasta la extracción de sangre en la producción de IFN- γ por los linfocitos T-CD8 específicos disminuía un 15,1% en cada semana que pasaba. Es decir, a mayor intervalo de tiempo desde la infección a la recogida de la muestra, menor era el efecto de la producción de IFN- γ por los linfocitos T-CD8 específicos frente a CMV.

A pesar de que en el presente estudio no hemos encontrado una asociación significativa, se ha descrito en algunos estudios de tamaño muestral similar al nuestro que existe una respuesta celular disminuída o retrasada en madres transmisoras en comparación con las no transmisoras^{50,52,160,161}. El estudio de Lilleri *et al* en 49 gestantes con infección primaria por CMV mostró que durante el primer mes después de la infección se observaron sistemáticamente células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN- γ , mientras que muy raramente se detectaron células T productoras de IL-2 en sangre. Se observó una correlación entre el desarrollo de LPR específica frente a CMV y la eliminación del virus de la sangre. Se observó además un retraso significativo en el desarrollo de la respuesta T CD4+ en madres transmisoras, en comparación con las no transmisoras, concluyendo que el desarrollo de la inmunidad adaptativa celular T tras una infección primaria por CMV parece ser un proceso complejo y lento hasta que se desarrolla una respuesta de células T memoria y que la respuesta celular T parece influir en la transmisión vertical del CMV⁵⁰. De forma similar, Revello *et al* investigaron la LPR específica CD4 en 74 gestantes y 29 mujeres no gestantes con infección primaria por CMV. Sus resultados más relevantes indicaron que la LPR frente a CMV era significativamente menor o ausente en madres transmisoras (n=19), en comparación con las no transmisoras (n=21). Además, encontraron que el embarazo no parece modificar significativamente la respuesta inmune celular específica frente a CMV, ya que no hubo diferencias entre los grupos de gestantes y no gestantes inmunocompetentes⁵².

Sin embargo, otros autores han demostrado justo el efecto contrario, es decir, un mayor riesgo de transmisión de la infección al feto cuanto mayor es la respuesta celular. Por ejemplo, el estudio de Saldan *et al*⁵⁶ en 57 gestantes con infección primaria por CMV mostró que una respuesta celular más potente a CMV en presencia de una baja avidéz de la IgG se correlacionaba con la transmisión de CMV durante la primoinfección materna⁵⁶. Además, el estudio de Eldar-Yedidia *et al*⁵⁷ demostró que una baja producción de IFN- γ se asociaba con una reducción en la probabilidad de transmisión intrauterina de CMV en una cohorte de 75 gestantes con infección primaria⁵⁷. Los autores plantearon la hipótesis de que una respuesta celular más potente podría estar correlacionada con una viremia más prolongada e intensa, lo que genera un ambiente proinflamatorio en la placenta que facilita el paso del virus^{56,58}. Nuestra hipótesis inicial era que cuanto menor fuera la respuesta celular en la gestante, mayor sería el riesgo de transmisión de la infección al feto. Sin embargo, no hemos encontrado una clara asociación entre la respuesta celular específica y el riesgo de infección fetal.

Se debe tener en cuenta asimismo la complejidad y extensión de la respuesta inmune celular frente a la infección por CMV, pues los distintos estudios referidos previamente presentan diferencias en su metodología y cada uno evalúa un área particular de la respuesta celular específica frente a CMV y de diversas formas. Por ejemplo, en el estudio de Eldar-Yedidia *et al* se utilizó Quantiferon y midieron la secreción de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6⁵⁷. Sin embargo, Fornara *et al* investigaron grupos de péptidos de las proteínas IE-1, IE-2 y pp65 del CMV en un ensayo tipo ELISPOT, cuya determinación, en asociación con la avidéz y la ADNemia resultó útil para evaluar el riesgo de transmisión fetal¹⁵⁹. Otros estudios, como el de Lilleri *et al* se basaron en la LPR específica frente a CMV y medían la producción de IFN- γ e IL-2 por las células T CD4+ y CD8+⁵⁰. El mismo autor en otra publicación investigó el fenotipo de membrana (CCR7 y expresión de CD45RA) y producción de citoquinas intracelulares (IFN- γ e IL-2) por células T específicas frente a CMV (estimuladas con células dendríticas infectadas por CMV)⁵¹. Otros autores como Revello se centraron en la citotoxicidad o la producción de TNF analizando la LPR de células T CD4+, CD69+ y TNF- α ⁵². Así, la amplia variedad de antígenos, péptidos y métodos puede justificar la enorme variabilidad en la evaluación

de la respuesta celular T que podría justificar en parte la discrepancia en los resultados de los distintos estudios referidos.

1.2. Edad gestacional y carga viral en sangre, orina y líquido amniótico como marcadores pronósticos.

1.2.1. Edad gestacional

En el presente estudio encontramos además que la edad gestacional en el momento de la infección materna fue significativamente mayor en las madres transmisoras (12,5 semanas) que en las no transmisoras (8 semanas) con una $p=0,013$. Esto es acorde a los resultados de otros estudios y es bien conocido el hecho que el riesgo de infección fetal aumenta al hacerlo la edad gestacional en el momento de la infección materna^{11,63,162}. El estudio de Enders *et al* que analizó la evolución de 248 gestaciones con infección primaria por CMV, encontró que las tasas de transmisión intrauterina fueron para el primer, segundo y tercer trimestre del embarazo del 30,1% (25/83), 38,2% (29/76) y 72,2% (26/36), respectivamente. No se observaron síntomas en recién nacidos infectados de madres con infección primaria en el tercer trimestre, por lo que concluyeron que aunque el riesgo de transmisión intrauterina después de una infección primaria en el tercer trimestre de gestación es alto, el riesgo de enfermedad sintomática en el recién nacido es bajo¹⁶². No obstante, el riesgo de secuelas graves a largo plazo está limitado a aquellas infecciones adquiridas antes de las 14 semanas de gestación¹⁸, como se ha comentado previamente. La transmisión de la infección fetal en las infecciones primarias durante la gestación ocurre en un 32%^{11,15,64}, similar a la tasa observada en el presente estudio (40%).

1.2.2. Carga viral en sangre y orina

Respecto a la carga viral, en el presente estudio las mujeres con carga viral detectable en sangre al diagnóstico presentaron un mayor riesgo de infección fetal (6/13 en el grupo de transmisoras vs 0/16 en el grupo de madres no transmisoras; $p= 0,004$). Además, no hubo transmisión de la infección entre las gestantes con carga viral en

sangre indetectable en el momento del diagnóstico. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de gestantes con carga viral positiva en orina al diagnóstico, aunque el porcentaje fue mayor en el grupo de madres transmisoras (87,5% vs 62,5%, $p=0,569$). El estudio de Forner *et al*¹⁶³ encontraron una asociación significativa entre la presencia de carga viral de CMV positiva en orina y en sangre y la transmisión de la infección, al estudiarlo en 80 gestantes con infección primaria ($n=57$) y no primaria ($n=23$) por CMV. También otros autores^{164,165} han encontrado asociación entre la presencia de carga viral positiva en orina y en sangre y la presencia de infección congénita. El estudio de Delforge *et al* incluyó a 150 gestantes con infección primaria por CMV en las que se determinó la carga viral de CMV en sangre (114 muestras) y orina (150 muestras)¹⁶⁴. Sus resultados mostraron una tasa de transmisión del 36,7% (55/150) y se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de CMV en orina materna y en sangre materna y la infección del recién nacido. Además, observaron que en aquellas muestras positivas para CMV en orina materna, la carga viral fue significativamente mayor en las madres transmisoras. De forma similar, Simonazzi *et al* estudiaron la influencia de la carga viral en sangre en el momento de la amniocentesis sobre la transmisión de la infección en 239 gestantes con infección primaria, 32 de las cuales (13,4%) mostraban viremia positiva¹⁶⁵. La transmisión vertical ocurrió en 14 mujeres (43,8%) con resultados positivos y 42 (20,3%) con resultados negativos para la ADNemia por CMV ($P = 0,006$; OR: 3,06; IC 95%: 1,41-6,64). La infección sintomática ocurrió en 6 (42,9%) fetos o recién nacidos infectados de mujeres con ADNemia viral, y en 9 (21,4%) de mujeres sin ADNemia viral ($p = 0,16$). De ahí concluyen que la viremia materna en el momento de la amniocentesis se asocia con una probabilidad 3 veces mayor de infección congénita, pero no se correlaciona con la enfermedad sintomática. Nuestros datos apoyan la hipótesis de que una carga viral detectable en sangre materna al diagnóstico de la infección primaria podría representar un biomarcador relevante del riesgo de transmisión intrauterina.

1.2.3. Carga viral en líquido amniótico

En la cohorte de gestantes incluidas en el presente estudio, se realizó amniocentesis en 55 mujeres, y se encontró una PCR-CMV positiva en líquido amniótico en 19 (34,6%). La infección congénita se confirmó al nacer en todos los casos menos uno

(18/19, 94,7%). En este caso no confirmado, la carga viral en líquido amniótico fue muy baja (63 UI/mL) y esta madre había sido tratada con una dosis única de HIG después del procedimiento a las 23 semanas de gestación. Entre las 36 madres cuya PCR-CMV fue negativa en líquido amniótico (65,5%), la mayoría no fueron transmisoras, pero 2 de los recién nacidos sí tenían CMVc (2/36, 5,6%, tasa de falsos negativos de la amniocentesis). De entre las 5 madres en las que no se realizó amniocentesis, cuatro fueron transmisoras (80%). Bilavsky *et al*⁸² estudiaron las secuelas a largo plazo en un grupo de niños (n =301) con CMVc en los que se había realizado una amniocentesis en la gestación. En el grupo con amniocentesis negativa (47 casos, 15,6%, grupo de estudio) encontraron que había menos recién nacidos con CMVc sintomático que en el grupo con amniocentesis positiva (4,3% frente a 25%; P < 0,001). La hipoacusia al nacer también fue menos frecuente en el grupo de estudio (2,2% frente a 17,4%; P = 0,012) y ninguno de los niños del grupo con amniocentesis negativa tuvieron secuelas neurológicas en el seguimiento a largo plazo, en comparación con 13 casos (14,1%) en el grupo de control (P <0,001). Las calcificaciones intracraneales en la ecografía cerebral, microcefalia y coriorretinitis solo se encontraron en pacientes del grupo con amniocentesis positiva. Hubo 2 casos de lactantes sintomáticos en el grupo de amniocentesis negativa: el primero fue un caso de primoinfección durante el primer trimestre con HNS al nacer y otro caso de primoinfección a principios del segundo trimestre con trombocitopenia neonatal aislada al nacer. El único niño con HNS unilateral moderada en el grupo de estudio recibió tratamiento antiviral prolongado y presentó pruebas de audición normales en el seguimiento (último control a los 5,5 años). Ante estos resultados, los autores concluyeron que, aunque la amniocentesis negativa no excluye el CMVc, los niños con CMVc nacidos tras una amniocentesis negativa rara vez son sintomáticos o presentan alteraciones en la ecografía cerebral al nacer, y que además tienen muy buen pronóstico a largo plazo. La principal hipótesis de los autores es que se trate de infecciones tardías (después de la amniocentesis) o muy cercanas a la amniocentesis, ya que, como es bien sabido, la infección fetal en las etapas finales del embarazo conlleva un mejor pronóstico que una infección fetal en el primer trimestre^{166,167}.

Por otro lado, el estudio multicéntrico llevado a cabo por Mappa *et al*¹⁶⁸ incluyó 104 fetos con infección confirmada por CMV y ecografía inicial normal. Se observó que

la carga viral media de CMV en líquido amniótico fue significativamente mayor en fetos con alteraciones en la ecografía de seguimiento o en la RM fetal, en comparación con aquellos sin alteraciones (3.346.634,27± 402.582,95 copias/ml frente a 761.934 ± 222.513,2 copias/ml; $p < 0,001$). En el análisis de regresión logística multivariante, la carga viral en líquido amniótico se asoció de forma independiente con la presencia de anomalías adicionales en la ecografía o RM de seguimiento, con un OR de 1,07 ($p = 0,010$), mientras que la edad materna ($p = 0,24$), el trimestre en el momento de la infección materna ($p = 0,97$) y el tipo de infección (primaria vs no primaria) ($p = 0,12$) no lo fueron. La carga viral de CMV en líquido amniótico tuvo un AUC de 0,755 para la aparición de anomalías por infección por CMV, con un punto de corte óptimo de $> 1.310.520$ copias/mL, una sensibilidad del 66,7% y una especificidad del 84,3%, concluyendo los autores que la carga viral de CMV en la amniocentesis tiene una precisión moderada para la aparición de anomalías relacionadas con CMV en fetos con infección congénita y ecografía normal en el diagnóstico inicial¹⁶⁸. Por último, en un reciente metaanálisis de siete estudios observacionales, realizado por Chatzakis *et al*⁸³, se encontró una tasa de falsos negativos de la amniocentesis del 8% (IC 95 %, 5,0–13,0 %), la tasa de síntomas graves al nacer fue del 0% en fetos con amniocentesis negativa y del 22,0 % en aquellos con amniocentesis positiva. La tasa de HNS grave y/o alteración del neurodesarrollo durante el seguimiento fue del 0% en fetos con amniocentesis negativa vs 14% en aquellos con resultado positivo; la tasa de interrupción de la gestación debido a la presencia de alteraciones del SNC relacionadas con CMV o afectación multiorgánica en la ecografía/RM fue del 0% en fetos con amniocentesis negativa vs 20,0% en aquellos con resultado positivo de amniocentesis. Con todo ello concluyen que un resultado negativo de la amniocentesis en gestantes con infección por CMV se asocia a la ausencia de afectación fetal y de secuelas a largo plazo en el niño, incluso en los casos en los que se ha producido la transmisión vertical⁸³.

En el presente estudio, de un total de 55 amniocentesis realizadas entre las 60 gestantes con infección primaria por CMV, se obtuvo resultado PCR positivo en 19 (34.6%), de las cuales 18 fueron transmisoras. De entre las 36 gestantes con amniocentesis negativa, en la mayoría no hubo transmisión (34/36, 94,4%) pero hubo dos casos falsos negativos de amniocentesis, pues se detectó CMVc al nacimiento en los recién nacidos (2/36, 5,6%). Esta tasa de falsos negativos de amniocentesis es similar a la descrita en otros estudios, como se ha comentado anteriormente.

1.2.4. Otros factores pronósticos

Por último, otro factor de riesgo de infección fetal es la presencia de otros niños en la misma familia que acudan a guardería. En nuestra cohorte este factor fue mucho más frecuente en el grupo de madres transmisoras que en las no transmisoras (56,5% vs 20%, $p=0,01$). El contacto cercano y prolongado con niños menores de 3 años se ha asociado con un mayor riesgo de infección materna³. En el presente estudio el 66,1% de las gestantes convivían con al menos un niño menor de 3 años. El estudio de Pass *et al*¹⁶⁹ mostró que los niños que asistían a guardería eliminaban CMV con más frecuencia (69 %) que aquellos atendidos en casa (10 %) y que el riesgo de seroconversión en padres de niños con infección por CMV era mayor en el grupo que asistía a guardería. De ahí la importancia de conocer y aplicar las medidas higiénicas como prevención primaria de la infección por CMV durante la gestación, como se ha comentado previamente.

2. Correlación de la respuesta inmune celular T con las secuelas a largo plazo en la infección congénita por citomegalovirus.

2.1. Particularidades de la respuesta celular contra CMV en el niño.

Los niños con CMVc presentan un control disminuido de la replicación viral, una capacidad limitada para desarrollar la respuesta inmune mediada por células y una imposibilidad para conseguir que el virus pase a un estado latente^{54,60}. Algunos investigadores han postulado que la eliminación viral prolongada podría estar relacionada con la progresión posnatal de la hipoacusia¹⁷⁰. Estudios realizados en niños con CMVc han mostrado diferencias importantes en la respuesta específica frente a CMV en comparación con los adultos. En los niños con CMVc se detectan menos frecuentemente linfocitos T CD4+ específicos frente al CMV y linfocitos T CD8+ específicos capaces de realizar funciones de citotoxicidad, quimiotaxis y otras funciones concurrentes⁵⁹. Además, otros estudios han descrito una capacidad disminuida para producir citoquinas tanto por linfocitos T CD4+ como CD8+ específicos, a diferencia de los linfocitos T de adultos infectados⁶⁰. Capretti *et al*⁶¹ encontraron que las respuestas de células T CD8+ específicas al nacimiento se correlacionaba con un menor riesgo de síntomas neonatales y un control más eficaz de la ADNemia por CMV. Sin embargo, la evidencia disponible sobre el papel pronóstico de la respuesta celular T en el CMVc y su implicación en el desarrollo de secuelas a largo plazo es escasa y se basa principalmente en estudios de un pequeño número de pacientes.

El presente estudio incluyó 64 niños con CMVc, de los cuales 42 fueron sintomáticos (65,6%). Se clasificaron en dos grupos, en función de la presencia o no de secuelas durante el seguimiento a largo plazo, siendo la mediana de tiempo de seguimiento 25,3 meses (RIQ 20,1-34,4). Dieciocho niños presentaron secuelas a largo plazo (28,1%), principalmente HNS en 13 niños (20,3%) y alteraciones neurológicas en 10 (15,6%). Las alteraciones neurológicas más frecuentes fueron retraso psicomotor, microcefalia, retraso del desarrollo del lenguaje y alteraciones a nivel motor. El análisis de respuesta celular mostró que los recuentos de linfocitos totales y de células T CD4+

al nacimiento fueron significativamente menores en el grupo de niños con secuelas a largo plazo comparado con aquellos que no las desarrollaron (4.500 vs 5.350 linfocitos / mL, $p=0,013$; 1.454 vs 2.143 linfocitos T CD4+/mL, $p=0,020$, respectivamente). Además, el cociente CD4/CD8 fue significativamente menor en los niños con secuelas (1,7 vs 2,4; $p=0,03$). No se encontró asociación entre las respuestas celulares específicas de células T CD4+ o CD8+ productoras de IFN- γ y el desarrollo de secuelas a largo plazo. En el análisis multivariante, se evidenció que el recuento total de linfocitos también estaba significativamente asociado con el desarrollo de secuelas a largo plazo (OR: 0,549 (IC 95% 0,323-0,833) por cada 1000 linfocitos, $p=0,012$). Esto significa que, por cada descenso de 1.000 células en el recuento total de linfocitos, el riesgo de desarrollar secuelas a largo plazo aumenta 1,8 veces. No hemos encontrado un punto de corte concreto de recuento de linfocitos por debajo del cual aumente de forma significativa el riesgo de secuelas. Se observó una tendencia a la asociación entre un mayor recuento total de linfocitos T CD8+ y el desarrollo de secuelas (OR: 1,064 (IC 95% 0,984-1,194) por cada 100 células T CD8+, $p=0,090$). Se realizó asimismo una comparación de los recuentos totales de linfocitos y respuesta celular T entre niños sintomáticos y asintomáticos al nacimiento, sin encontrar diferencias significativas.

Capretti *et al*⁶¹ evaluaron la respuesta celular T CD8+ específica en 30 recién nacidos con CMVc en el día 14 y durante el segundo mes de vida; encontraron que una respuesta T CD8+ específica detectable se correlacionaba con la ausencia de síntomas relacionados con CMV al nacimiento, un mejor control de la viremia por CMV y un menor riesgo de secuelas a largo plazo. Encontraron que los niños con un QuantiFERON-CMV reactivo no presentaron secuelas a largo plazo (0/16). En cambio, en 8 de 14 (57%) niños con una respuesta no reactiva/indeterminada en QuantiFERON-CMV al nacer sí desarrollaron secuelas a largo plazo. En el presente estudio, encontramos que 10 de 18 (55,6%) niños con secuelas y 28 de 44 (60,9%) sin secuelas tuvieron una respuesta positiva ($>0,1\%$) de células CD8+ productoras de IFN- γ específica frente a CMV al nacer. Los resultados divergentes con el estudio llevado a cabo por Cappretti *et al* podrían explicarse en parte debido al uso de diferentes técnicas (QuantiFERON-CMV vs técnica no comercial), aunque la técnica utilizada en el presente estudio ha sido ampliamente evaluada en otras poblaciones, como pacientes trasplantados/inmunodeprimidos,

con buen valor predictivo^{171,172}. Otra posible explicación es que la proporción de niños con infección fetal en el primer trimestre fuera diferente en los dos estudios; sin embargo, el sub-análisis realizado en el presente estudio entre los niños nacidos tras una primoinfección materna en el primer trimestre de gestación (n=10) no mostró diferencias significativas.

Una serie de casos investigada por Lidehäll *et al*⁵⁴ incluyó 24 niños con CMVc en los que la respuesta de linfocitos T medida por la producción de IFN- γ se comparó con las respuestas de adultos con infección primaria por CMV sintomática. Encontraron que los niños menores de 2 años tenían una respuesta CD4+ baja o indetectable, pero no hallaron diferencias con respecto a la función de los linfocitos T CD8+. Esto concuerda con nuestros resultados, pues en el presente estudio también encontramos una mayor proporción de respuesta CD8+ específica frente a CMV que de respuesta específica CD4+ (59,4 % vs 19,4 %, respectivamente) en niños con CMVc. Huygens *et al*⁶⁰ publicaron una serie de casos de 26 recién nacidos cuyas respuestas de linfocitos CD4+ y CD8+ específicas fueron notablemente más bajas que en los adultos. Otros autores han estudiado las respuestas específicas del CMVc en series de casos aún más pequeñas, mostrando que la mayoría de los niños con CMVc no tenían linfocitos T CD4+ específicos frente a CMV detectables, además de frecuencias más bajas de respuesta específica de linfocitos T CD8+, comparado con adultos⁵⁹. En el presente estudio hemos encontrado algunos resultados discordantes con estudios previos, lo que podría ser debido al pequeño tamaño muestral que presentan. En nuestro caso se trata de un estudio multicéntrico que incluyó paciente de 8 hospitales españoles con un total de 64 niños con CMVc incluidos en los que se realizó el estudio de respuesta celular T CD4+ y CD8+ específica, lo que representa hasta donde sabemos la muestra de mayor tamaño publicada hasta la fecha.

2.2. Factores pronósticos de secuelas a largo plazo.

En el presente estudio, las variables asociadas con el desarrollo de secuelas a largo plazo en el análisis bivalente fueron la presencia de CMVc sintomático ($p = 0,012$), examen físico anormal al nacer ($p = 0,006$), primera ecografía cerebral alterada ($p = 0,016$), alteraciones de sustancia blanca en la ecografía cerebral ($p = 0,008$) y no pasar el cribado auditivo ($p < 0,001$). Estos resultados concuerdan con los de otros estudios que han evaluado distintos factores pronósticos relacionados con el desarrollo de secuelas a largo plazo.

2.2.1. CMVc sintomático

Las secuelas neurológicas ocurren principalmente en niños con CMVc sintomático¹¹, con un riesgo del 40-70%^{21,173}. Los primeros estudios de la historia natural del CMVc mostraron que entre el 50% y el 90% de los niños con CMVc sintomático desarrollaban secuelas¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Sin embargo, la revisión realizada por Dollard *et al*, que incluyó 117.986 recién nacidos en los que se realizó cribado de CMVc en un total de 15 estudios revisados, encontró que la frecuencia de secuelas era del 40-58% en niños con CMVc sintomático, frente al 13,5% en niños asintomáticos²¹. La diferencia en las tasas de secuelas entre los distintos estudios publicados podría ser debido a la inclusión en los estudios más recientes de pacientes identificados mediante pruebas de cribado neonatal en comparación con los primeros estudios, que incluyeron predominantemente niños identificados por síntomas clínicos¹⁷⁷. En este sentido, el estudio de Dreher *et al* analizó los datos de 178 niños con CMVc sintomático, clasificados en dos grupos en función de si habían sido identificados mediante cribado neonatal (grupo cribado) o por la presencia de hallazgos clínicos al nacimiento (grupo referido). Se detectaron dos o más hallazgos clínicos al nacer en el 91% de los niños del grupo referido y sólo en el 58% de los niños del grupo cribado ($P < 0,001$). Significativamente más niños en el grupo referido tenían hipoacusia en comparación con los del grupo cribado ($P = 0,009$). El 51% de los niños del grupo cribado estaban libres de secuelas en comparación con sólo el 28% del grupo referido ($P < 0,003$). Globalmente, el 38% de los niños con CMVc sintomático tenían un CI < 70 , un 23% tenían déficits motores y un 19% convulsiones. El porcentaje de niños con dos o más secuelas en el grupo de cribado fue

del 21% comparado con el 42% en el grupo referido ($p=0,01$). En resumen, en los niños con CMVc sintomático identificados por sospecha clínica la enfermedad se presenta de forma más grave al nacer y tienen secuelas con mayor frecuencia que los identificados mediante cribado neonatal¹⁷³. De forma similar, el estudio de Pinninti *et al*¹⁴⁷ mostró que significativamente más niños con afectación del SNC tenían un CI <70 y un riesgo mayor de HNS, en comparación con aquellos con síntomas transitorios como hepatomegalia o esplenomegalia o aquellos con exantema petequeal aislado pero que no presentaban afectación neurológica¹⁴⁷. Otros estudios mostraron que la microcefalia, coriorretinitis y otras anomalías en las pruebas de neuroimagen en el periodo neonatal se asocian con un mal pronóstico a nivel cognitivo^{21,131,178}.

La HNS es la secuela más frecuente del CMVc. Hasta el 22-65% de los niños con CMVc sintomático desarrollan HNS, con un riesgo estimado 6 veces mayor que los niños con CMVc asintomático^{170,179}. La HNS de aparición tardía puede aparecer hasta en el 18% - 27% de los niños sintomáticos. La progresión de la pérdida auditiva a lo largo del tiempo se produce en el 20-54% de los niños sintomáticos y en el 43% de las HNS es bilateral y profunda^{23,180}.

Entre los niños con CMVc sintomático, la afectación del SNC demostrada por hallazgos clínicos (microcefalia, convulsiones, hipotonía) o de neuroimagen (calcificaciones intracerebrales, ventriculomegalia, alteraciones de sustancia blanca) ha mostrado ser un fuerte predictor de desarrollo neurológico adverso incluyendo la HNS^{129,133,135,147,173}. Algunos estudios que han incluido principalmente niños con CMVc sintomático han utilizado un sistema puntuación para definir mejor la gravedad de las alteraciones en la neuroimagen y han sugerido que dicho sistema de puntuación conduce a una mejor predicción en cuanto al pronóstico del neurodesarrollo y la HNS^{131,134}.

2.2.2. CMVc asintomático y la importancia del cribado neonatal de CMVc

Por otro lado, los niños con CMVc asintomático también tienen un riesgo incrementado de padecer HNS (Tabla 4). Aproximadamente el 10% de niños sin síntomas aparentes al nacer presentan HNS al nacimiento o desarrollan sordera durante los primeros años de vida. La fluctuación de esta hipoacusia también es una

característica frecuente en el CMVc asintomático y aproximadamente en la mitad de los niños asintomáticos se observa una mejoría en sus umbrales auditivos^{23,180}. En este sentido, otro estudio incluyó a 204 niños con CMVc asintomático y los comparó con 177 controles no infectados. No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo intelectual entre los niños asintomáticos y el grupo control, concluyendo que los niños con CMVc asintomático se comportan de forma similar a los niños no infectados¹⁸¹. Una revisión sistemática de niños con CMVc asintomático incluyó 37 estudios que proporcionaron datos sobre la valoración de la audición, el neurodesarrollo o ambos, y mostró que no existían diferencias entre los niños con CMVc asintomático y los controles sanos en cuanto al neurodesarrollo, excluyendo la hipoacusia¹⁷⁸. Estos y otros estudios de seguimiento a largo plazo de niños asintomáticos al nacer (identificados mediante pruebas de cribado para CMVc) muestran que estos niños tienen mayor riesgo de presentar hipoacusia, pero no está claro que tengan un mayor riesgo de discapacidad intelectual o déficits motores^{182,183}. López *et al*¹⁸⁴ evaluaron sistemáticamente a niños con CMVc asintomático y midieron sus resultados cognitivos y rendimiento académico hasta los 18 años de edad. El estudio encontró que los niños asintomáticos que tenían una audición normal antes de los 2 años no presentaban diferencias en su CI, vocabulario y puntuaciones de rendimiento académico durante la infancia, en comparación con los controles sanos¹⁸⁴. Por el contrario, entre los niños asintomáticos que sí desarrollaron HNS a los 2 años, vieron que sus puntuaciones en los tests de inteligencia y vocabulario receptivo fueron más bajas en comparación con el grupo control¹⁸⁴.

Hipoacusia neurosensorial	Sintomático (%)	Sin síntomas aparentes (%)
Prevalencia de HNS	32-41	7-10
Características		
Unilateral	29-33	52-57
Bilateral	67-71	43-48
Progresiva	18-54	20-54
Fluctuante	22-29	24-54
De alta frecuencia aislada	27	38
Bilateral grave y profunda	75	43
De inicio tardío	18-27	9-38
Mediana de edad (rango) de la hipoacusia tardía	33 meses (6-197)	44 meses (24-182)

Tabla 4. Resultados auditivos en CMVc sintomático y asintomático. Tomado de Kabani N, *et al*¹⁰⁷. Datos tomados de las referencias^{23,178,180}.

Se está desarrollando un programa de cribado de CMVc en Estados Unidos en niños remitidos por un cribado auditivo alterado, en 100 hospitales en 18 estados de Estados Unidos^{185,186}. Este abordaje identifica niños con CMVc asintomático e hipoacusia relacionada con CMVc que de otro modo no se habrían detectado. Un estudio realizado en Utah, el primer estado en aprobar una legislación que exigía la realización de una prueba de detección de CMV en los recién nacidos que no pasaban el cribado auditivo neonatal¹⁸⁵, mostró el beneficio adicional de mejorar la tasa de evaluación diagnóstica de hipoacusia a los 3 meses dentro de un programa de cribado auditivo neonatal. Sin embargo, un gran estudio multicéntrico demostró que más del 40% de los niños con HNS relacionada con CMVc no se hubieran identificado con el cribado dirigido¹¹². Por ello, la detección universal del CMVc en recién nacidos identificaría a todos los recién nacidos con riesgo de hipoacusia, abordaje que además ha mostrado ser coste-efectivo según el estudio de Gant *et al*¹¹³. En el estudio PICCSA realizado por nuestro grupo¹⁹, realizamos un cribado prospectivo de CMVc durante un año mediante detección de carga viral en saliva en las primeras 72 horas de vida en 3.190 recién nacidos durante su estancia en maternidad. Se detectó carga viral de CMV en saliva en 24/3.190 niños (0,75%), y la

infección congénita se confirmó en 15/3.190 (0,47%, IC 95%: 0,29%-0,77%). De los 15 niños con CMVc confirmado, dos presentaron síntomas al nacer y 8 (53,3%) anomalías en la RM, principalmente alteraciones aisladas de sustancia blanca. A pesar de que más de la mitad de los niños infectados presentaron alteraciones en la RM cerebral, el diagnóstico de CMVc en la mayoría de los casos no habría sido posible sin un programa de cribado, pues solo 2/15 recién nacidos infectados presentaron alteraciones en la exploración física al nacimiento, siendo en el resto normal. Con ello demostramos que la carga viral de CMV en saliva es un método de detección simple y muy aceptado por los padres, pero debe confirmarse en una muestra de orina. A pesar de que la mitad de los niños infectados presentaban anomalías en la neuroimagen, el diagnóstico durante el período neonatal no habría sido posible sin un programa de cribado en la mayoría de los casos¹⁹.

2.2.3. Carga viral en sangre y orina

El valor pronóstico de la carga viral para identificar a los niños en riesgo de padecer HNS, especialmente aquellos con infección asintomática, no está claro. Estudios con niños sintomáticos demostraron que una mayor carga viral durante la infancia se asociaba con un mayor riesgo de HNS^{152,154,187}. Un estudio posterior con un grupo más grande de niños con CMVc, incluidos aquellos con infección asintomática (n = 135), encontraron una gran superposición en los valores de carga viral en sangre entre niños con HNS y aquellos con audición normal¹⁵⁷. En el ensayo clínico liderado por Kimberlin en niños con CMVc sintomático, el análisis del AUC sugirió que las cargas virales más bajas al inicio del estudio se correlacionaban con mejores resultados auditivos¹⁴¹. De este modo, conocer el papel de la carga viral en sangre, orina y la saliva en la enfermedad del CMVc y su valor pronóstico necesita más investigación. En el presente estudio, se detectó carga viral en sangre en 47/55 (85,5%), sin diferencias significativas entre el grupo de pacientes con y sin secuelas. Tampoco encontramos diferencias significativas en los valores de carga viral en sangre entre el grupo de pacientes con secuelas (mediana 2.878,0 [RIQ 1.002,8; 11.050,0]) y sin secuelas (mediana 3.161,0 [RIQ 833,8; 11.609,0]), p= 0,878. Al estudiar los valores de carga viral en orina (n=54) no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

3. Papel de la resonancia magnética y ecografía cerebral en la infección congénita por citomegalovirus. Factores pronósticos de secuelas.

3.1. Definición de CMVc sintomático vs asintomático

Los hallazgos en las pruebas de neuroimagen son un gran predictor de secuelas en la infección congénita por CMV^{129,131-133,135,150}. El presente estudio sobre el papel de la RM y ecografía cerebral en CMVc incluyó a 107 niños con CMVc del Registro Estatal de Infección Congénita por CMV (REDICCMV), en los que se había realizado ecografía cerebral y RM craneal en los primeros 3 meses de vida. Más de dos tercios de los niños (72%, 77/107) se clasificaron como sintomáticos. Un 40,6% no pasaron el cribado auditivo al nacer y se confirmó la hipoacusia al nacimiento en 40 de 95 niños (42,1%). Además, casi la mitad de los pacientes presentaron alteraciones analíticas (45,5%), siendo la trombocitopenia la alteración más frecuente (30,6%), seguido del aumento de ALT en 9,9%. Cinco niños fueron diagnosticados de coriorretinitis (4,8%). En cuanto a las pruebas de neuroimagen, la primera ecografía cerebral fue anormal en 60 pacientes (56,1%) y la RM mostró alteraciones en 68 niños (63,6%). Los hallazgos más frecuentes en la ecografía cerebral fueron los quistes periventriculares (26,2%) seguidos de las calcificaciones intracraneales (23,4%) y las alteraciones de sustancia blanca (16,8%). En la RM el hallazgo más frecuente fueron las alteraciones de sustancia blanca (42,1%), seguido de los quistes periventriculares (24,3%) y las calcificaciones intracraneales (17,8%). De los 47 niños con ecografía cerebral normal al nacimiento, 13 (27,7%) presentaron alteraciones en la RM, siendo las alteraciones de sustancia blanca el hallazgo más común (9/13, 69,2%). Seis de esos 13 pacientes (46,2%) presentaban una exploración física inicial anormal y 4/13 (30,8%) presentaron hipoacusia. El presente estudio, al igual que otros publicados recientemente¹⁸⁸, mostró que la proporción de niños con CMVc y alteración en las pruebas de imagen es mayor de lo esperado.

En cuanto al seguimiento, 71 niños tenían datos sobre su evolución a los 12 meses. La mitad (37; 52%) presentó secuelas a los 12 meses: 14/71 (19,7%) mostraron HNS y alteraciones neurológicas, 10/71 (14%) HNS aislada y 13/71 (18,3%) alteraciones

neurológicas. A los 12 meses, los niños que tenían ecografía cerebral normal al nacimiento sin otros síntomas relacionados con CMVc al nacer (n = 15) no presentaron secuelas a largo plazo. En el análisis univariante, la presencia de anomalías en la exploración física, no pasar el cribado auditivo en cualquier oído y la presencia de alteraciones en la ecografía cerebral o RM se asoció significativamente con secuelas a los 12 meses de edad. En el análisis de regresión logística multivariante, no pasar el cribado auditivo (OR 8,5; IC 95%: 1,9–37,8; P =0,005) y las alteraciones en la RM (OR 7,5; IC 95%: 1,2–45,3; P =0,028) fueron factores de riesgo independientes de secuelas a los 12 meses de edad.

El término “asintomático” que se usa extensamente en la literatura debería modificarse a “sin síntomas aparentes”. Es el momento de dejar atrás este modelo dual (“asintomático versus sintomático”) y dar paso a una nueva clasificación basada en el riesgo de secuelas a largo plazo, donde los estudios de neuroimagen (ecografía cerebral y RM) deberían ser una de las piedras angulares de este nuevo modelo. De hecho, en el consenso del Grupo Internacional de Recomendaciones para el manejo de la infección por CMV en la gestante y el recién nacido¹²¹ realizado por Rawlison *et al* en 2017, establecieron categorías de enfermedad por CMVc en un esfuerzo por estandarizar las definiciones, de cara a las indicaciones de tratamiento antiviral. La infección sintomática se clasificó como: (1) enfermedad por CMVc sintomática moderada-grave, definida por la presencia de manifestaciones múltiples atribuibles a CMVc y/o afectación del SNC; o (2) CMVc levemente sintomático definido por la presencia de 1 o 2 manifestaciones aisladas de infección por CMVc que sean leves y transitorias, como petequias o hepatomegalia leve¹²¹. Los niños que no manifiestan ninguno de los síntomas anteriores, pero tienen HNS aislada en el período neonatal les consideraron asintomáticos. Este grupo recomendaba el tratamiento oral con valganciclovir solo en aquellos niños con CMVc sintomático moderado-grave. No obstante, en el último consenso de recomendaciones realizado por Leruez-Ville *et al*⁶⁴ y publicado en 2024 se recomienda el tratamiento antiviral con valganciclovir en niños con CMVc e HNS aislada, así como en aquellos recién nacidos con síntomas importantes al nacimiento relacionados con CMVc (6 meses de tratamiento), niños con hepatitis o trombocitopenia persistentes aisladas, sin otras manifestaciones clínicas asociadas (6 semanas de tratamiento). No se

recomienda el tratamiento antiviral para niños con CIR aislado, sin otra clínica asociada⁶⁴.

La definición de infección por CMVc “sintomática” es variable según los estudios. Algunos incluyen sólo los hallazgos del examen físico, mientras que otros también consideran resultados anormales de laboratorio o de neuroimagen^{121,122}. Clásicamente, la infección por CMVc se ha clasificado como “sintomática” o “asintomática” al nacimiento. Las diferentes definiciones y opiniones sobre lo que constituye una infección por CMV “sintomática” dificultan la interpretación de la literatura. De hecho, algunos de los mayores estudios de cohortes incluyen niños con HNS al nacimiento en el grupo de pacientes "asintomáticos" ante la ausencia de enfermedad "clínicamente aparente" durante la exploración inicial^{122,189}. En los sistemas sanitarios modernos, en los que el CMVc se detecta cada vez más, junto con una mayor accesibilidad a pruebas como la RM, esta dicotomía tradicional entre la enfermedad clínicamente “aparente” e “inaparente” se está volviendo menos significativa. En la tabla 5 se resumen las características clínicas aceptadas de enfermedad por CMVc con síntomas detectables en la exploración física del recién nacido, separadas de aquellas detectables sólo si se llevan a cabo investigaciones específicas, por ejemplo, cuando ya existe una sospecha de CMVc^{140,174,190,191}. Los niños con CMVc y manifestaciones clínicas al nacer tienen más probabilidades de tener afectación del SNC, y de desarrollar secuelas largo plazo, incluyendo HNS, discapacidad intelectual, epilepsia, discapacidad visual y parálisis cerebral²¹.

Signos/síntomas clínicamente detectables

Exploración física

- Pequeño para la edad gestacional (peso al nacimiento <-2DE para la edad gestacional)
- Microcefalia (perímetro craneal <-2DE para la edad gestacional)
- Petequias o púrpura (normalmente presentes a las horas del nacimiento y persisten varias semanas)
- Exantema en "blueberry muffin" (hematopoyesis intradérmica)
- Ictericia (puede estar presente el primer día de vida y suele persistir más tiempo que la fisiológica)
- Hepatomegalia
- Esplenomegalia
- Signos neurológicos (letargia, hipotonía, convulsiones, reflejo de succión pobre)

Alteraciones detectadas de forma incidental o mediante pruebas complementarias

Pruebas de laboratorio

- Anemia
- Trombocitopenia
- Leucopenia, neutropenia aislada
- Aumento de transaminasas (ALT, AST)
- Hiperbilirrubinemia conjugada

Líquido cefalorraquídeo

- Índices anormales, carga viral para CMV positiva

Neuroimagen

Calcificaciones, quistes periventriculares, dilatación ventricular, pseudoquistes subependimarios, quistes germinolíticos, alteraciones de sustancia blanca, atrofia cortical, alteraciones de la migración, hipoplasia cerebelosa, vasculopatía lenticuloestriada

Pruebas de audición

- Hipoacusia neurosensorial uni o bilateral

Exploración oftalmológica

Coriorretinitis, hemorragia retiniana, atrofia óptica, estrabismo, cataratas

Tabla 5. Signos y síntomas posibles en niños con CMVc. Tomada de Luck *et al*¹²².

De acuerdo con el consenso de Luck *et al*¹²², se debe clasificar el CMVc "sintomático" en enfermedad grave, moderada o leve. La enfermedad "leve" incluye a aquellos con hallazgos aislados (1 o 2 como máximo), clínicamente poco significativos o transitorios, como petequias, leve hepatomegalia o esplenomegalia o alteraciones bioquímicas/hematológicas (como trombocitopenia, anemia, leucopenia, aumento de transaminasas leve o hiperbilirrubinemia conjugada) o pequeño para la edad gestacional

(definido como peso para la edad gestacional <-2 DE) sin microcefalia. La enfermedad “grave” incluye aquellos casos con afectación del SNC (exploración neurológica u oftalmológica anormal, microcefalia o neuroimagen compatible con enfermedad por CMVc [como calcificaciones, ventriculomegalia de moderada a grave, quistes, alteraciones en la sustancia blanca, hipoplasia cerebral o cerebelosa, displasia del hipocampo, anomalías de la migración neuronal])¹⁵⁰ o aquellos casos con enfermedad potencialmente mortal. Además, la enfermedad “grave” también incluye a los niños con evidencia de lesión grave de un solo órgano (incluidos aquellos con insuficiencia hepática y hepatoesplenomegalia marcada) o aquellos con afectación multiorgánica significativa. Por último, existe otro grupo que puede considerarse con una enfermedad “moderada”. Este grupo es heterogéneo e incluye, por ejemplo, aquellos con alteraciones bioquímicas o hematológicas persistentes (más de 2 semanas de duración) o con más de 2 manifestaciones de enfermedad “leve” (ya descrito previamente). Sería útil poder desarrollar en el futuro un sistema de puntuación clínica validada para categorizar la gravedad de la enfermedad al diagnóstico y su relación con el riesgo de secuelas. Esto sería muy beneficioso para el asesoramiento de los padres y la toma de decisiones en cuanto al tratamiento, pronóstico y seguimiento de los pacientes¹²².

3.2. Importancia y papel de la RM

Si bien la ecografía cerebral es la prueba de imagen de primera línea, la RM puede mostrar patología significativa que a menudo se pasa por alto mediante ecografía (por ejemplo, alteraciones de sustancia blanca o malformaciones corticales)⁶⁴. La RM es una técnica no invasiva que además es posible realizar en el periodo neonatal sin sedación. Ureta-Velasco *et al*¹⁹² realizaron un estudio prospectivo en el que incluyeron recién nacidos con indicación de RM, estables y sin soporte ventilatorio. El procedimiento se fundamentó en la aplicación de cuidados centrados en el desarrollo y el uso de un colchón de vacío como sistema de inmovilización. Se llevaron a cabo 43 RM sin sedación (41 cerebrales y 2 de columna vertebral), encontrando una tasa de éxito del 97,7% (42/43) con un tiempo medio de RM de 26,3 min (IC 95% 23,3-29,3 min; rango 16-50 min), por lo que parece un procedimiento factible y con una alta tasa de éxito. En el presente estudio se encontró que de los 47 niños con CMVc y ecografía cerebral

normal, 13 (27,7%) presentaban alteraciones en la RM, principalmente alteraciones de sustancia blanca (9 pacientes), pero también se evidenciaron calcificaciones intracraneales, lesiones isquémicas de SNC, hipoplasia cerebelosa, quistes periventriculares, ventriculomegalia y hemorragia subaracnoidea en otros casos. En 7 de los 13 pacientes había datos del seguimiento a los 12 meses de vida y observamos que el 43% (3/7) presentaron secuelas (un caso de HNS aislada, un caso de HNS con alteraciones neurológicas y otro caso con alteraciones neurológicas sin HNS). Por tanto, la RM completa la información que se obtiene por ecografía y puede ser relevante para el pronóstico y manejo del paciente.

En el presente estudio se realizó RM cerebral en los primeros 3 meses de vida en todos los niños con CMVc sintomático: niños con alteraciones en las pruebas de laboratorio y/o en la ecografía cerebral, niños con HNS o con exploración física alterada. Según el consenso recientemente publicado por Leruez-Ville *et al*⁶⁴ se recomienda realizar RM en niños con CMVc que presenten manifestaciones clínicas de CMV al nacimiento, HNS, coriorretinitis o anomalías detectadas en la ecografía cerebral. La RM también podría realizarse en casos de primoinfección materna durante el primer trimestre, o cuando se desconoce el momento de la infección materna. No hay consenso sobre si la RM debe realizarse en otras situaciones. Las implicaciones pronósticas de hallazgos de neuroimagen menos graves (como las anomalías sutiles de sustancia blanca) aún no son bien conocidas y son precisos más estudios⁹⁰. La combinación de ecografía cerebral y RM permite una evaluación integral mediante escalas de puntuación de neuroimagen, ya comentadas previamente^{131,134}. Son necesarios más estudios para determinar si sería recomendable realizar de rutina una RM a todos los niños con CMVc o solo a pacientes seleccionados.

3.3. Valor pronóstico de la vasculopatía lenticuloestriada

La presencia de una VLE en la ecografía neonatal se ha relacionado a un mayor riesgo de secuelas en algunos estudios¹⁹³⁻¹⁹⁵. La VLE es un hallazgo ecográfico de aumento de la ecogenicidad de los vasos lenticuloestriados que derivan de la arteria cerebral media y que irrigan los ganglios basales y zonas del tálamo. Se ha relacionado con infecciones congénitas (CMV, toxoplasma, sífilis, rubeola, herpes, VIH) pero también

con varias etiologías no infecciosas como metabolopatías, encefalopatía hipóxico-isquémica, infartos isquémicos cerebrales, hemorragias intraventriculares, síndrome alcohólico fetal, lupus eritematoso, diabetes materna, cardiopatías congénitas, transfusión feto-fetal o hipotiroidismo congénito. También se ha visto que la VLE puede ser un hallazgo transitorio en niños pretérmino. La prevalencia de VLE en neonatos sanos es baja (0-0,5%), aumentando la proporción hasta un 0,4-5,8% en niños con patologías de base, como prematuros o niños ingresados en unidades de cuidados intensivos^{193,196}. Sin embargo, no está claro el papel pronóstico de esta alteración cuando se presenta de manera aislada al nacimiento en niños sin otros síntomas. En el presente estudio realizamos un análisis de los niños con VLE aislada sin otros hallazgos en la ecografía cerebral, y encontramos que todos los niños con VLE aislada y RM normal (excepto 1 niño con síndrome polimalformativo no relacionado con CMV) tuvieron buena evolución clínica al año de vida. Ninguno de ellos presentó al nacimiento hipoacusia ni coriorretinitis. Solo un paciente presentó hepatoesplenomegalia al nacer, y en el resto la exploración física fue normal. Solo 3 niños presentaron otras alteraciones en la RM, que en dos casos fueron alteraciones de sustancia blanca aisladas y en el otro niño quistes periventriculares. A los 12 meses de edad, ninguno de ellos presentó HNS y el desarrollo neurológico fue normal en todos salvo en 1 niño que presentaba un retraso psicomotor moderado.

Los resultados de varios estudios al respecto difieren significativamente entre sí. En el estudio de Amir *et al*¹⁹⁴ se detectó VLE en la ecografía inicial en el 54,3% de los niños con CMVc. En 9 de los 18 niños que presentaban VLE aislada no se inició tratamiento antiviral, y todos ellos desarrollaron un empeoramiento de la audición entre los 4 y 34 meses, por lo que concluyen que la VLE es un hallazgo común en CMVc sintomático y es un signo de afectación del SNC y que la VLE es un posible marcador de alto riesgo de HNS en niños con CMVc¹⁹⁴. A la misma conclusión llega el estudio realizado por Bilavsky *et al*¹⁹³ en 141 niños que tenían VLE aislada en la ecografía cerebral inicial y que fueron seguidos durante un año: se encontró un deterioro auditivo significativo en el grupo que presentaba audición normal al nacimiento y que no habían recibido tratamiento antiviral, en comparación con el grupo con VLE aislada que estaban asintomáticos pero que fueron tratados con ganciclovir/valganciclovir. Los autores

concluyeron que la VLE podría ser un signo de afectación del SNC y futura discapacidad auditiva, y que sería prudente tratar a estos niños¹⁹³. El estudio de Giannattasio *et al*¹⁹⁷ analizó los datos de 161 recién nacidos con CMVc y VLE aislada o con otras anomalías cerebrales. La VLE se evidenció en el 39,7% de los recién nacidos con CMVc en comparación con el 18% de los controles; sin embargo, el hallazgo de VLE no representó un factor de riesgo de HNS ni alteraciones neurológicas, por lo que los autores concluyeron que, aunque es un hallazgo común en CMVc, la VLE no predice una evolución adversa¹⁹⁷. Blázquez Gamero encontró que entre los niños sin otras alteraciones ecográficas, la presencia de VLE no se asociaba a un mayor riesgo de hipoacusia ni de alteraciones neurológicas a largo plazo; sin embargo, la presencia de VLE en niños con otras alteraciones ecográficas se asoció a un mayor riesgo de hipoacusia (OR: 8 (1,5-41,5); p=0,001)¹⁴⁹. Los últimos estudios no han encontrado una clara asociación entre VLE y sordera por lo que este hallazgo de manera aislada no debe condicionar por sí mismo el inicio del tratamiento antiviral¹⁹⁸.

VI. Conclusiones

Conclusiones

1. No se encontró asociación entre la presencia de una respuesta celular T específica materna (linfocitos T CD4+ y T CD8+ productores de IFN- γ específicos frente a CMV) tras una infección primaria en la gestación y el riesgo de transmisión de la infección al feto.
2. En los niños con CMVc no se encontró una asociación entre la presencia de la respuesta celular T CD4+ y T CD8+ específica frente a CMV en el recién nacido y el riesgo de secuelas a largo plazo.
3. Una carga viral detectable de CMV en sangre materna al diagnóstico de la infección primaria podría representar un biomarcador relevante asociado con el riesgo de transmisión fetal.
4. Un menor recuento total de linfocitos y de células T CD4+ en el recién nacido con CMVc se asoció con mayor riesgo de desarrollo de secuelas a largo plazo.
5. Las alteraciones en la RM craneal y no pasar el cribado auditivo al nacimiento fueron factores de riesgo independientes para el desarrollo de secuelas a largo plazo en niños con CMVc.
6. La resonancia magnética puede proporcionar información adicional útil, en comparación con la ecografía. Una proporción de niños con ecografía normal mostraron alteraciones en la RM y secuelas a largo plazo. Se recomienda realizar RM cerebral en todos los niños sintomáticos con CMVc.
7. Los niños con ecografía cerebral normal al nacer sin otros síntomas relacionados con CMVc no presentaron secuelas a largo plazo.

8. La presencia de VLE aislada sin otros hallazgos en la ecografía cerebral y con RM normal no se asoció a un mayor riesgo de secuelas a los 12 meses.

VII. Bibliografía

Bibliografía

1. Andronaco, D. W. Congenital Cytomegalovirus and Hearing Loss. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. JOGNN* 49, 293–304 (2020).
2. Fowler, K. B. & Boppana, S. B. Congenital cytomegalovirus infection. *Semin. Perinatol.* 42, 149–154 (2018).
3. Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B. & Gupta, R. K. The “Silent” Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 86–102 (2013).
4. Cannon, M. J. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 46 Suppl 4, S6-10 (2009).
5. Long Sarah S, Prober Charles G, Fischer Marc & Kimberlin Marc. Cytomegalovirus. in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, 6th Edition* 1092–1099 (Elsevier, 2022).
6. Cherry James, Demmler-Harrison Gail J, Kaplan Sheldon L, Steinbach William & Hotez Peter J. Cytomegalovirus. in *Feigin and Cherry’s Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 8th Edition.* 1429–1450 (Elsevier, 2019).
7. Weller, T. H. Cytomegaloviruses: The Difficult Years. *J. Infect. Dis.* 122, 532–539 (1970).
8. Crough, T. & Khanna, R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76–98 (2009).
9. Sallie R. Permar & Soren Gantt. Cytomegalovirus. in *Remington and Klein’s Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 9th Edition.* 640–687 (Elsevier, 2024).
10. Dowd, J. B., Aiello, A. E. & Alley, D. E. Socioeconomic disparities in the seroprevalence of cytomegalovirus infection in the US population: NHANES III. *Epidemiol. Infect.* 137, 58–65 (2009).
11. Leruez-Ville, M., Foulon, I., Pass, R. & Ville, Y. Cytomegalovirus infection during pregnancy: state of the science. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 223, 330–349 (2020).

12. Pesch, M. H., Saunders, N. A. & Abdelnabi, S. Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Prevention, Presentation, Management and Neonatal Outcomes. *J. Midwifery Womens Health* 66, 397–402 (2021).
13. Chatzakis, C. *et al.* Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 223, 870-883.e11 (2020).
14. Marsico, C. & Kimberlin, D. W. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital. J. Pediatr.* 43, 38 (2017).
15. Kenneson, A. & Cannon, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 253–276 (2007).
16. Leruez-Ville, M. *et al.* Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection Following Primary and Nonprimary Maternal Infection: A Prospective Neonatal Screening Study Using Polymerase Chain Reaction in Saliva. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 65, 398–404 (2017).
17. Mussi-Pinhata, M. M. *et al.* Seroconversion for Cytomegalovirus Infection During Pregnancy and Fetal Infection in a Highly Seropositive Population: ‘The BraCHS Study’. *J. Infect. Dis.* 218, 1200–1204 (2018).
18. Faure-Bardon, V. *et al.* Sequelae of Congenital Cytomegalovirus Following Maternal Primary Infections Are Limited to Those Acquired in the First Trimester of Pregnancy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 69, 1526–1532 (2019).
19. Blázquez-Gamero, D. *et al.* Prevalence and Clinical Manifestations of Congenital Cytomegalovirus Infection in a Screening Program in Madrid (PICCSA Study). *Pediatr. Infect. Dis. J.* 39, 1050–1056 (2020).
20. Boppana, S. B., Ross, S. A. & Fowler, K. B. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 57 Suppl 4, S178-181 (2013).

21. Dollard, S. C., Grosse, S. D. & Ross, D. S. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 355–363 (2007).
22. Smithers-Sheedy, H. *et al.* Congenital Cytomegalovirus among Children with Cerebral Palsy. *J. Pediatr.* 181, 267-271.e1 (2017).
23. Goderis, J. *et al.* Hearing Loss and Congenital CMV Infection: A Systematic Review. *Pediatrics* 134, 972–982 (2014).
24. Arvin, A. M. *et al.* Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 39, 233–239 (2004).
25. Lanzieri, T. M. *et al.* Long-term outcomes of children with symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* 37, 875–880 (2017).
26. Ministerio de Sanidad de España. Asociación Española de Cribado Neonatal. Programa de cribado neonatal en España 2016. Publicado enero 2017.
27. Cannon, M. J., Griffiths, P. D., Aston, V. & Rawlinson, W. D. Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit? *Rev. Med. Virol.* 24, 291–307 (2014).
28. Álvarez Domínguez, E., Figueras Aloy, J., Botet Mussons, F., Marcos Maeso, M. A. & Pérez Fernández, J. M. [Screening for cytomegalovirus infection in very low birth weight infants]. *An. Pediatr. Barc. Spain* 2003 79, 3–9 (2013).
29. Turner, K. M., Lee, H. C., Boppana, S. B., Carlo, W. A. & Randolph, D. A. Incidence and impact of CMV infection in very low birth weight infants. *Pediatrics* 133, e609-615 (2014).
30. Merino-Hernández, A. *et al.* Cost-effectiveness of a cytomegalovirus screening strategy in neonates born after 34 weeks small for gestational age. *An. Pediatr.* 98, 41–47 (2023).

31. Panhani, S. & Heinonen, K. M. Screening for congenital cytomegalovirus infection among preterm infants born before the 34th gestational week in Finland. *Scand. J. Infect. Dis.* 26, 375–378 (1994).
32. Santos, D. V. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 42, 129–132 (2000).
33. Lino, J. F. *et al.* Prevalence of congenital cytomegalovirus infection in preterm, small for gestational age and low birth weight newborns: characteristics and cytokines profile. *World J. Pediatr.* 18, 498–504 (2022).
34. Dobbins, J. G., Stewart, J. A. & Demmler, G. J. Surveillance of congenital cytomegalovirus disease, 1990-1991. Collaborating Registry Group. *MMWR CDC Surveill. Summ. Morb. Mortal. Wkly. Rep. CDC Surveill. Summ.* 41, 35–39 (1992).
35. Retzler, J. *et al.* Economic cost of congenital CMV in the UK. *Arch. Dis. Child.* 104, 559–563 (2019).
36. Brizić, I., Hiršl, L., Britt, W. J., Krmpotić, A. & Jonjić, S. Immune responses to congenital cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* 20, 543–551 (2018).
37. Maltezou, P.-G. *et al.* Maternal type of CMV infection and sequelae in infants with congenital CMV: Systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 129, 104518 (2020).
38. Pereira, L., Petitt, M. & Tabata, T. Cytomegalovirus Infection and Antibody Protection of the Developing Placenta. *Clin. Infect. Dis.* 57, S174–S177 (2013).
39. Tabata, T. *et al.* Induction of an epithelial integrin α v β 6 in human cytomegalovirus-infected endothelial cells leads to activation of transforming growth factor- β 1 and increased collagen production. *Am. J. Pathol.* 172, 1127–1140 (2008).
40. Schleiss, M. R. Cytomegalovirus in the neonate: immune correlates of infection and protection. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 501801 (2013).

41. Holt, P. G. & Jones, C. A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 55, 688–697 (2000).
42. Noyola, D. E. *et al.* Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur. J. Immunol.* 42, 3256–3266 (2012).
43. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 621–625 (2009).
44. Kijpittayarit, S., Eid, A. J., Brown, R. A., Paya, C. V. & Razonable, R. R. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 44, 1315–1320 (2007).
45. Chaudhuri, S. *et al.* Human cytomegalovirus interacts with toll-like receptor 2 and CD14 on syncytiotrophoblasts to stimulate expression of TNF α mRNA and apoptosis. *Placenta* 30, 994–1001 (2009).
46. Nahum, A., Dadi, H., Bates, A. & Roifman, C. M. The biological significance of TLR3 variant, L412F, in conferring susceptibility to cutaneous candidiasis, CMV and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 11, 341–347 (2012).
47. Muller, W. J., Jones, C. A. & Koelle, D. M. Immunobiology of herpes simplex virus and cytomegalovirus infections of the fetus and newborn. *Curr. Immunol. Rev.* 6, 38–55 (2010).
48. Scott, G. M. *et al.* Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory cytokine bias in placenta and amniotic fluid. *J. Infect. Dis.* 205, 1305–1310 (2012).
49. Starr, S. E., Tolpin, M. D., Friedman, H. M., Paucker, K. & Plotkin, S. A. Impaired cellular immunity to cytomegalovirus in congenitally infected children and their mothers. *J. Infect. Dis.* 140, 500–505 (1979).
50. Lilleri, D. *et al.* Development of Human Cytomegalovirus–Specific T Cell Immunity during Primary Infection of Pregnant Women and Its Correlation with Virus Transmission to the Fetus. *J. Infect. Dis.* 195, 1062–1070 (2007).

51. Lilleri, D., Fornara, C., Revello, M. G. & Gerna, G. Human Cytomegalovirus–Specific Memory CD8⁺ and CD4⁺ T Cell Differentiation after Primary Infection. *J. Infect. Dis.* 198, 536–543 (2008).
52. Revello, M. G. *et al.* Lymphoproliferative response in primary human cytomegalovirus (HCMV) infection is delayed in HCMV transmitter mothers. *J. Infect. Dis.* 193, 269–276 (2006).
53. Tu, W. *et al.* Persistent and selective deficiency of CD4⁺ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3260–3267 (2004).
54. Lidehäll, A. K. *et al.* Cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T cell responses in infants and children. *Scand. J. Immunol.* 77, 135–143 (2013).
55. La Rosa, C. & Diamond, D. J. The immune response to human CMV. *Future Virol.* 7, 279–293 (2012).
56. Saldan, A. *et al.* Strong Cell-Mediated Immune Response to Human Cytomegalovirus Is Associated With Increased Risk of Fetal Infection in Primarily Infected Pregnant Women. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 61, 1228–1234 (2015).
57. Eldar-Yedidia, Y. *et al.* Low Interferon Relative-Response to Cytomegalovirus Is Associated with Low Likelihood of Intrauterine Transmission of the Virus. *PLoS One* 11, e0147883 (2016).
58. Lazzarotto, T. *et al.* Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 137, 90–95 (2000).
59. Gibson, L. *et al.* Reduced frequencies of polyfunctional CMV-specific T cell responses in infants with congenital CMV infection. *J. Clin. Immunol.* 35, 289–301 (2015).
60. Huygens, A. *et al.* Functional Exhaustion Limits CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. *J. Infect. Dis.* 212, 484–494 (2015).

61. Capretti, M. G. *et al.* Immune Monitoring Using QuantiFERON®-CMV Assay in Congenital Cytomegalovirus Infection: Correlation With Clinical Presentation and CMV DNA Load. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 73, 367–373 (2021).
62. Elbou Ould, M. A. *et al.* Cellular immune response of fetuses to cytomegalovirus. *Pediatr. Res.* 55, 280–286 (2004).
63. Revello, M. G. *et al.* Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: A 20-year experience. *J. Clin. Virol.* 50, 303–307 (2011).
64. Leruez-Ville, M. *et al.* Consensus recommendation for prenatal, neonatal and postnatal management of congenital cytomegalovirus infection from the European congenital infection initiative (ECCI). *Lancet Reg. Health Eur.* 40, 100892 (2024).
65. Fowler, K. B., Stagno, S. & Pass, R. F. Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 38, 1035–1037 (2004).
66. Leruez-Ville, M. *et al.* Quantifying the Burden of Congenital Cytomegalovirus Infection With Long-term Sequelae in Subsequent Pregnancies of Women Seronegative at Their First Pregnancy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 71, 1598–1603 (2020).
67. Ross, S. A. *et al.* Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J. Pediatr.* 148, 332–336 (2006).
68. Nigro, G., Anceschi, M. M., Cosmi, E. V., & Congenital Cytomegalic Disease Collaborating Group. Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 110, 572–577 (2003).
69. Revello, M. G. & Gerna, G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 680–715 (2002).

70. Prince, H. E. & Lapé-Nixon, M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 21, 1377–1384 (2014).
71. Revello, M. G., Furione, M., Rognoni, V., Arossa, A. & Gerna, G. Cytomegalovirus DNAemia in pregnant women. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 61, 590–592 (2014).
72. Lazzarotto, T. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum. Immunol.* 65, 410–415 (2004).
73. Zalel, Y. *et al.* Secondary cytomegalovirus infection can cause severe fetal sequelae despite maternal preconceptional immunity. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31, 417–420 (2008).
74. Picone, O. *et al.* Cytomegalovirus non-primary infection during pregnancy. Can serology help with diagnosis? *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* 30, 224–227 (2017).
75. Gouarin, S. *et al.* Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 21, 47–55 (2001).
76. Liesnard, C. *et al.* Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet. Gynecol.* 95, 881–888 (2000).
77. Enders, M., Daiminger, A., Exler, S. & Enders, G. Amniocentesis for prenatal diagnosis of cytomegalovirus infection: challenging the 21 weeks' threshold. *Prenat. Diagn.* 37, 940–942 (2017).
78. Enders, M. *et al.* Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 115 cases: a 5 years' single center experience. *Prenat. Diagn.* 37, 389–398 (2017).
79. Lazzarotto, T., Guerra, B., Lanari, M., Gabrielli, L. & Landini, M. P. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 41, 192–197 (2008).

80. Guerra, B. *et al.* Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, 476–482 (2000).
81. Baquero-Artigao, F. & Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. [Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection]. *An. Pediatr. Barc. Spain* 2003 71, 535–547 (2009).
82. Bilavsky, E. *et al.* Clinical Implications for Children Born With Congenital Cytomegalovirus Infection Following a Negative Amniocentesis. *Clin. Infect. Dis.* 63, 33–38 (2016).
83. Chatzakis, C., Sotiriadis, A., Dinas, K. & Ville, Y. Neonatal and long-term outcomes of infants with congenital cytomegalovirus infection and negative amniocentesis: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 61, 158–167 (2023).
84. Buca, D. *et al.* Outcome of fetuses with congenital cytomegalovirus infection and normal ultrasound at diagnosis: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 57, 551–559 (2021).
85. Guerra, B. *et al.* Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198, 380.e1–7 (2008).
86. Faure-Bardon, V. *et al.* Refining the prognosis of fetuses infected with Cytomegalovirus in the first trimester of pregnancy by serial prenatal assessment: a single-centre retrospective study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 127, 355–362 (2020).
87. Grannum, P. A. Ultrasound examination of the placenta. *Clin. Obstet. Gynaecol.* 10, 459–473 (1983).
88. Slotnick, R. N. & Abuhamad, A. Z. Prognostic implications of fetal echogenic bowel. *Lancet Lond. Engl.* 347, 85–87 (1996).
89. Cannie, M. M. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: contribution and best timing of prenatal MR imaging. *Eur. Radiol.* 26, 3760–3769 (2016).

90. Alarcón, A. *et al.* Neuroimaging in infants with congenital cytomegalovirus infection and its correlation with outcome: emphasis on white matter abnormalities. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 109, 151–158 (2024).
91. Benoist, G. *et al.* Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 32, 900–905 (2008).
92. Picone, O., Simon, I., Benachi, A., Brunelle, F. & Sonigo, P. Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenat. Diagn.* 28, 753–758 (2008).
93. Fowler, K. B. & Pass, R. F. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics* 118, e286-292 (2006).
94. Cannon, M. J. *et al.* Repeated measures study of weekly and daily cytomegalovirus shedding patterns in saliva and urine of healthy cytomegalovirus-seropositive children. *BMC Infect. Dis.* 14, 569 (2014).
95. Revello, M. G. *et al.* Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *EBioMedicine* 2, 1205–1210 (2015).
96. Shahar-Nissan, K. *et al.* Valaciclovir to prevent vertical transmission of cytomegalovirus after maternal primary infection during pregnancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 396, 779–785 (2020).
97. Egloff, C. *et al.* New data on efficacy of valacyclovir in secondary prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 61, 59–66 (2023).
98. Faure-Bardon, V., Fourgeaud, J., Stirnemann, J., Leruez-Ville, M. & Ville, Y. Secondary prevention of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir following maternal

- primary infection in early pregnancy. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 58, 576–581 (2021).
99. Chatzakis, C. *et al.* The effect of valacyclovir on secondary prevention of congenital cytomegalovirus infection, following primary maternal infection acquired periconceptionally or in the first trimester of pregnancy. An individual patient data meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 230, 109-117.e2 (2024).
100. Leruez-Ville, M. *et al.* In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 215, 462.e1-462.e10 (2016).
101. Nigro, G., Adler, S. P., La Torre, R., Best, A. M., & Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 353, 1350–1362 (2005).
102. Revello, M. G. *et al.* A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N. Engl. J. Med.* 370, 1316–1326 (2014).
103. Hughes, B. L. *et al.* A Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* 385, 436–444 (2021).
104. Kagan, K. O. *et al.* Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus after primary maternal infection in the first trimester by biweekly hyperimmunoglobulin administration. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 53, 383–389 (2019).
105. Yamamoto, A. Y. *et al.* Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 36, 228–230 (2006).
106. Ross, S. A. *et al.* Contribution of Breastfeeding to False-Positive Saliva Polymerase Chain Reaction for Newborn Congenital Cytomegalovirus Screening. *J. Infect. Dis.* 217, 1612–1615 (2018).

107. Kabani, N. & Ross, S. A. Congenital Cytomegalovirus Infection. *J. Infect. Dis.* 221, S9–S14 (2020).
108. Boppana, S. B. *et al.* Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 303, 1375–1382 (2010).
109. Leruez-Ville, M. *et al.* Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 52, 575–581 (2011).
110. Wang, L., Xu, X., Zhang, H., Qian, J. & Zhu, J. Dried blood spots PCR assays to screen congenital cytomegalovirus infection: a meta-analysis. *Viol. J.* 12, 60 (2015).
111. Vos, B. *et al.* Cytomegalovirus-A Risk Factor for Childhood Hearing Loss: A Systematic Review. *Ear Hear.* 42, 1447–1461 (2021).
112. Fowler, K. B. *et al.* A Targeted Approach for Congenital Cytomegalovirus Screening Within Newborn Hearing Screening. *Pediatrics* 139, e20162128 (2017).
113. Gantt, S. *et al.* Cost-effectiveness of Universal and Targeted Newborn Screening for Congenital Cytomegalovirus Infection. *JAMA Pediatr.* 170, 1173–1180 (2016).
114. Foulon, I., Vleurinck, L., Kerkhofs, K. & Gordts, F. Hearing configuration in children with cCMV infection and proposal of a flow chart for hearing evaluation. *Int. J. Audiol.* 54, 714–719 (2015).
115. Cohen, B. E., Durstenfeld, A. & Roehm, P. C. Viral causes of hearing loss: a review for hearing health professionals. *Trends Hear.* 18, 2331216514541361 (2014).
116. Foulon, I. *et al.* Hearing Loss With Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics* 144, e20183095 (2019).
117. Kraaijenga, V. J. C. *et al.* Cochlear implant performance in children deafened by congenital cytomegalovirus-A systematic review. *Clin. Otolaryngol. Off. J. ENT-UK Off. J. Neth. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. Cervico-Facial Surg.* 43, 1283–1295 (2018).

118. Bernard, S., Wiener-Vacher, S., Van Den Abbeele, T. & Teissier, N. Vestibular Disorders in Children With Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics* 136, e887-895 (2015).
119. Dhondt, C. *et al.* Vestibular Follow-up Program for Congenital Cytomegalovirus Based on 6 Years of Longitudinal Data Collection. *Ear Hear.* 44, 1354–1366 (2023).
120. Kokkola, E. *et al.* Long-term outcome of vestibular function and hearing in children with congenital cytomegalovirus infection: a prospective cohort study. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 280, 3141–3147 (2023).
121. Rawlinson, W. D. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 17, e177–e188 (2017).
122. Luck, S. E. *et al.* Congenital Cytomegalovirus: A European Expert Consensus Statement on Diagnosis and Management. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 36, 1205–1213 (2017).
123. Olsen, I. E., Groveman, S. A., Lawson, M. L., Clark, R. H. & Zemel, B. S. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics* 125, e214-224 (2010).
124. Suzuki, Y., Toribe, Y., Mogami, Y., Yanagihara, K. & Nishikawa, M. Epilepsy in patients with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev.* 30, 420–424 (2008).
125. Gentile, I. *et al.* Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection Assessed Through Viral Genome Detection in Dried Blood Spots in Children with Autism Spectrum Disorders. *Vivo Athens Greece* 31, 467–473 (2017).
126. Sakamoto, A., Moriuchi, H., Matsuzaki, J., Motoyama, K. & Moriuchi, M. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in children with autism spectrum disorder but no other major neurologic deficit. *Brain Dev.* 37, 200–205 (2015).
127. Engman, M.-L. *et al.* Prenatal acquired cytomegalovirus infection should be considered in children with autism. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 104, 792–795 (2015).

128. Garofoli, F. *et al.* An Italian Prospective Experience on the Association Between Congenital Cytomegalovirus Infection and Autistic Spectrum Disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 47, 1490–1495 (2017).
129. Alarcon, A. *et al.* Clinical, biochemical, and neuroimaging findings predict long-term neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 163, 828-834.e1 (2013).
130. Noyola, D. E. *et al.* Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 138, 325–331 (2001).
131. Noyola, D. E. *et al.* Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 138, 325–331 (2001).
132. Boppana, S. B. *et al.* Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 99, 409–414 (1997).
133. Capretti, M. G. *et al.* Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev.* 36, 203–211 (2014).
134. Alarcon, A., Martinez-Biarge, M., Cabañas, F., Quero, J. & García-Alix, A. A Prognostic Neonatal Neuroimaging Scale for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection. *Neonatology* 110, 277–285 (2016).
135. de Vries, L. S. *et al.* The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics* 35, 113–119 (2004).
136. Giannattasio, A. *et al.* Neuroimaging Profiles and Neurodevelopmental Outcome in Infants With Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 37, 1028–1033 (2018).
137. Fink, K. R., Thapa, M. M., Ishak, G. E. & Pruthi, S. Neuroimaging of pediatric central nervous system cytomegalovirus infection. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* 30, 1779–1796 (2010).

138. van der Knaap, M. S. *et al.* Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology* 230, 529–536 (2004).
139. Garnham, J. *et al.* Evolution of the intracranial features of congenital cytomegalovirus on MRI. *Clin. Radiol.* 78, e451–e457 (2023).
140. Kimberlin, D. W. *et al.* Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J. Pediatr.* 143, 16–25 (2003).
141. Kimberlin, D. W. *et al.* Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N. Engl. J. Med.* 372, 933–943 (2015).
142. Chung, P. K. *et al.* Valganciclovir in Infants with Hearing Loss and Clinically Inapparent Congenital Cytomegalovirus Infection: A Nonrandomized Controlled Trial. *J. Pediatr.* 268, 113945 (2024).
143. Kimberlin, D. W. *et al.* Oral Valganciclovir Initiated Beyond 1 Month of Age as Treatment of Sensorineural Hearing Loss Caused by Congenital Cytomegalovirus Infection: A Randomized Clinical Trial. *J. Pediatr.* 268, 113934 (2024).
144. Jones, C. E. *et al.* Managing challenges in congenital CMV: current thinking. *Arch. Dis. Child.* archdischild-2022-323809 (2022) doi:10.1136/archdischild-2022-323809.
145. Fourgeaud, J. *et al.* Predictors of the Outcome at 2 Years in Neonates With Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics* 153, e2023063531 (2024).
146. De Cuyper, E. *et al.* Risk Factors for Hearing Loss at Birth in Newborns With Congenital Cytomegalovirus Infection. *JAMA Otolaryngol.-- Head Neck Surg.* 149, 122–130 (2023).
147. Pinninti, S. G. *et al.* Clinical Predictors of Sensorineural Hearing Loss and Cognitive Outcome in Infants with Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 924–926 (2016).

148. Rivera, L. B. *et al.* Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 110, 762–767 (2002).
149. Blázquez Gamero, Daniel. Factores de riesgo asociados a las secuelas neurológicas y auditivas en la cohorte nacional de niños con infección congénita por citomegalovirus. (Complutense de Madrid, 2015).
150. Ancora, G. *et al.* Cranial ultrasound scanning and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 150, 157–161 (2007).
151. Alarcon, A. *et al.* Beta2-microglobulin concentrations in cerebrospinal fluid correlate with neuroimaging findings in newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Eur. J. Pediatr.* 165, 636–645 (2006).
152. Lanari, M. *et al.* Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 117, e76-83 (2006).
153. Bradford, R. D. *et al.* Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *J. Infect. Dis.* 191, 227–233 (2005).
154. Boppana, S. B. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J. Pediatr.* 146, 817–823 (2005).
155. Fourgeaud, J. *et al.* Clinical Value of Serial Quantitative Analysis of Cytomegalovirus DNA in Blood and Saliva Over the First 24 Months of Life in Congenital Infection: The French Cymepedia Cohort. *J. Pediatr.* 253, 197-204.e5 (2023).
156. Forner, G., Abate, D., Mengoli, C., Palù, G. & Gussetti, N. High Cytomegalovirus (CMV) DNAemia Predicts CMV Sequelae in Asymptomatic Congenitally Infected Newborns Born to Women With Primary Infection During Pregnancy. *J. Infect. Dis.* 212, 67–71 (2015).
157. Ross, S. A. *et al.* Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 588–592 (2009).

158. Oliver, S. E. *et al.* Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 46 Suppl 4, S22-26 (2009).
159. Fornara, C. *et al.* Human Cytomegalovirus–Specific Memory CD4+ T-Cell Response and Its Correlation With Virus Transmission to the Fetus in Pregnant Women With Primary Infection. *Clin. Infect. Dis.* 65, 1659–1665 (2017).
160. Lilleri, D. & Gerna, G. Maternal immune correlates of protection from human cytomegalovirus transmission to the fetus after primary infection in pregnancy. *Rev. Med. Virol.* 27, (2017).
161. Mele, F. *et al.* Phenotype and specificity of T cells in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy: IL-7Rpos long-term memory phenotype is associated with protection from vertical transmission. *PLoS One* 12, e0187731 (2017).
162. Enders, G., Daiminger, A., Bäder, U., Exler, S. & Enders, M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 52, 244–246 (2011).
163. Forner, G. *et al.* Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay but Not CMV QuantiFERON Assay Is a Novel Biomarker To Determine Risk of Congenital CMV Infection in Pregnant Women. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2149–2154 (2016).
164. Delforge, M.-L. *et al.* Presence of Cytomegalovirus in urine and blood of pregnant women with primary infection might be associated with fetal infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 90, 14–17 (2017).
165. Simonazzi, G. *et al.* Congenital Cytomegalovirus Infection: Prognostic Value of Maternal DNAemia at Amniocentesis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 64, 207–210 (2017).
166. Picone, O. *et al.* A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat. Diagn.* 33, 751–758 (2013).

167. Gindes, L., Teperberg-Oikawa, M., Sherman, D., Pardo, J. & Rahav, G. Congenital cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 115, 830–835 (2008).
168. Mappa, I. *et al.* Prognostic Value of Amniotic Fluid Viral Load to Predict Adverse Outcome in Pregnancies Complicated by Congenital Cytomegalovirus Infection: A Multicenter Study. *Fetal Diagn. Ther.* 50, 1–7 (2023).
169. Pass, R. F., Hutto, C., Ricks, R. & Cloud, G. A. Increased rate of cytomegalovirus infection among parents of children attending day-care centers. *N. Engl. J. Med.* 314, 1414–1418 (1986).
170. Rosenthal, L. S. *et al.* Cytomegalovirus shedding and delayed sensorineural hearing loss: results from longitudinal follow-up of children with congenital infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 515–520 (2009).
171. Huntley, D. *et al.* Reconstitution of cytomegalovirus-specific T-cell immunity following unmanipulated haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant.* 55, 1347–1356 (2020).
172. N, T. *et al.* Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 45, (2010).
173. Dreher, A. M. *et al.* Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 164, 855–859 (2014).
174. Boppana, S. B., Pass, R. F., Britt, W. J., Stagno, S. & Alford, C. A. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11, 93–99 (1992).
175. Pass, R. F. Cytomegalovirus infection. *Pediatr. Rev.* 23, 163–170 (2002).

176. Conboy, T. J. *et al.* Early clinical manifestations and intellectual outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 111, 343–348 (1987).
177. Ahlfors, K., Ivarsson, S. A. & Harris, S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 31, 443–457 (1999).
178. Bartlett, A. W., McMullan, B., Rawlinson, W. D. & Palasanthiran, P. Hearing and neurodevelopmental outcomes for children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: A systematic review. *Rev. Med. Virol.* (2017) doi:10.1002/rmv.1938.
179. Fowler, K. B. & Boppana, S. B. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 35, 226–231 (2006).
180. Dahle, A. J. *et al.* Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J. Am. Acad. Audiol.* 11, 283–290 (2000).
181. Kashden, J., Frison, S., Fowler, K., Pass, R. F. & Boll, T. J. Intellectual assessment of children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* 19, 254–259 (1998).
182. Zhang, X.-W. *et al.* Physical and intellectual development in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: a longitudinal cohort study in Qinba mountain area, China. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 40, 180–185 (2007).
183. Ludwig, A. & Hengel, H. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 14, 26–32 (2009).
184. Lopez, A. S. *et al.* Intelligence and Academic Achievement With Asymptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics* 140, e20171517 (2017).
185. Diener, M. L., Zick, C. D., McVicar, S. B., Boettger, J. & Park, A. H. Outcomes From a Hearing-Targeted Cytomegalovirus Screening Program. *Pediatrics* 139, e20160789 (2017).

186. National CMV Foundation. Newborn screening. <https://www.nationalcmv.org/overview/newborn-screening>.
187. Walter, S. *et al.* Congenital cytomegalovirus: association between dried blood spot viral load and hearing loss. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 93, F280-285 (2008).
188. Yamaguchi, A. *et al.* Screening for seemingly healthy newborns with congenital cytomegalovirus infection by quantitative real-time polymerase chain reaction using newborn urine: an observational study. *BMJ Open* 7, e013810 (2017).
189. Fowler, K. B., Dahle, A. J., Boppana, S. B. & Pass, R. F. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J. Pediatr.* 135, 60–64 (1999).
190. Nassetta, L., Kimberlin, D. & Whitley, R. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 862–867 (2009).
191. Coats, D. K., Demmler, G. J., Paysse, E. A., Du, L. T. & Libby, C. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *J. AAPOS Off. Publ. Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* 4, 110–116 (2000).
192. Ureta-Velasco, N. *et al.* [Magnetic resonance imaging without sedation in neonates]. *An. Pediatr. Barc. Spain* 2003 82, 354–359 (2015).
193. Bilavsky, E. *et al.* Lenticulostriated vasculopathy is a high-risk marker for hearing loss in congenital cytomegalovirus infections. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 104, e388-394 (2015).
194. Amir, J., Schwarz, M., Levy, I., Haimi-Cohen, Y. & Pardo, J. Is lenticulostriated vasculopathy a sign of central nervous system insult in infants with congenital CMV infection? *Arch. Dis. Child.* 96, 846–850 (2011).
195. Hong, S.-Y., Yang, J.-J., Li, S.-Y. & Lee, I.-C. Lenticulostriate Vasculopathy in Brain Ultrasonography is Associated with Cytomegalovirus Infection in Newborns. *Pediatr. Neonatol.* 56, 408–414 (2015).

196. Weber, K., Riebel, T. & Nasir, R. Hyperechoic lesions in the basal ganglia: an incidental sonographic finding in neonates and infants. *Pediatr. Radiol.* 22, 182–186 (1992).
197. Giannattasio, A. *et al.* Is lenticulostriated vasculopathy an unfavorable prognostic finding in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 91, 31–35 (2017).
198. Heljić, S., Terzić, S. & Maksić, H. Lenticulostriate vasculopathy in routine brain ultrasonography in infants: next step? *Med. Glas. Off. Publ. Med. Assoc. Zenica-Doboj Cant. Bosnia Herzeg.* 19, 1–5 (2022).

VIII. Anexos

Anexo 1: Otros artículos publicados relacionados con la temática de esta tesis doctoral en los que ha colaborado la autora.

1. Artículo: Prevalence and clinical manifestations of congenital cytomegalovirus infection in a screening program in Madrid (PICCSA Study). Blázquez-Gamero D, [Soriano-Ramos M](#), Vicente M, Pallás-Alonso CR, Pérez-Rivilla A, García-Álvarez M, Pinilla Martín MT, Freire X, De Vergas J, De Aragón AM, Zamora B, Epalza C, Moraleda C, Rojo P, Prieto L, Fernández-Cooke E, Ruíz-Contreras J, Delgado R, Folgueira MD. PICCSA Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2020;39(11):1050-6.

Prevalence and Clinical Manifestations of Congenital Cytomegalovirus Infection in a Screening Program in Madrid (PICCSA Study)

Daniel Blázquez-Gamero, MD, PhD, *, †, ‡ María Soriano-Ramos, MD, PhD, †, ‡, § Marta Vicente, *, †, Carmen Rosa Pallás-Alonso, MD, PhD, †, ‡, § Alfredo Pérez-Rivilla, MD, PhD, †, § Mónica García-Álvarez, MD, PhD, †, § María Teresa Pinilla Martín, MD, ‡, † Xavier Freire, MD, ¶, † Joaquín De Vergas, MD, || Ana Martínez De Aragón, MD, PhD, **, † Berta Zamora, MD, PhD, †, † Cristina Epalza, MD, *, † Cinta Moraleda, MD, PhD, *, †, Pablo Rojo, MD, PhD, *, † Luis Prieto, MD, PhD, *, † Elisa Fernández-Cooke, MD, PhD, *, †, † Jesús Ruiz-Contreras, MD, PhD, ¶, †, † Rafael Delgado, MD, PhD, †, †, § María Dolores Folgueira, MD, PhD, †, § and PICCSA Study Group

Background: Cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of congenital infection worldwide. Up to 15%–20% of infected newborns will develop long-term sequelae such as hearing loss and neurologic abnormalities. The aim of this study was to investigate the prevalence of congenital CMV infection (cCMV) and associated clinical abnormalities in Spain.

Methods: A prospective screening for cCMV by viral load in saliva was performed. Saliva samples were obtained within the first 72 hours of life in a maternity ward in Madrid (Spain), during a 1-year period. All positive screening tests were confirmed with viral load in urine. Clinical, laboratory, auditory, visual and cerebral imaging assessments were performed in all children with cCMV.

Results: Of the 4097 neonates born during the study period, 3190 (78%) were included. CMV viral load in saliva was detectable in 24/3190 (0.75%) children, and congenital infection was confirmed in 15/3190 (0.47%, CI 95%: 0.29%–0.77%). Positive predictive value was 62.5% (CI 95%: 46.5%–76.1%). Two infants presented symptoms at birth. Eight (53.3%) children showed abnormalities in magnetic resonance imaging; most of them isolated white matter abnormalities. Newborns with abnormalities in magnetic resonance imaging showed higher viral loads in blood and saliva ($P = 0.04$).

Conclusions: One in 200 neonates born in our hospital presented a cCMV infection. CMV viral load in saliva has been shown to be a simple and

highly accepted screening method but should be confirmed by CMV detection in urine. In spite of the fact that half of infected children had abnormalities in cerebral imaging, diagnosis during the neonatal period would have been impossible without a screening program in most cases.

Key Words: Congenital cytomegalovirus, CMV, screening, saliva, PCR

(*Pediatr Infect Dis J* 2020;XX:00–00)

Cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of congenital infection worldwide, affecting 0.2%–2.4% of newborns.¹ Congenital CMV infection (cCMV) is the main cause of nongenetic sensorineural hearing loss (SNHL) and neurologic impairment.^{2,3} As most infants with cCMV are asymptomatic at birth, they might be under-recognized,³ although 10%–15% of them will develop long-term sequelae.³ Hearing loss secondary to cCMV may not be detected at birth, and it is often progressive during the first years of life.^{4–6} The prevalence of this infection in Spain has not been reported to date, and it has only been studied in specific risk groups, such as preterm infants.⁷ In other European countries, the reported prevalence of cCMV ranges from 0.2% to 0.6%.^{1,8} Several studies have shown that CMV polymerase chain reaction (CMV-PCR) in saliva has good sensitivity and specificity, and, consequently, it could be used as a screening tool in universal and targeted screening programs.^{8–10} The main objective of this study was to investigate the prevalence of cCMV in children born in a maternity ward in Madrid, as well as to evaluate clinical findings in infected newborns.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

This is a prospective screening study carried out from February 2017 to February 2018 in Hospital Universitario 12 de Octubre, which is a tertiary care university hospital that has a IIIC level neonatal unit, located in the Southern area of Madrid. All children who were born during the study period were eligible for the study. Daily, from Monday to Friday, 1 study investigator asked the parents of the newborns to participate in the study. Some children born during the weekends were not included, because they were discharged home before Monday. Children born in other hospitals who were transferred to ours after birth were excluded.

Study data were collected and managed using REDCap (Research Electronic Data Capture) application tools hosted at Instituto de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre

Accepted for publication May 19, 2020.

From the *Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Madrid, Spain, RECLIP; †Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain; ‡Neonatology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; §Microbiology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ¶Pediatrics Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; and ||Pediatric Otorhinolaryngology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Beckman Coulter Diagnostics supported the laboratory costs of this study but did not participate in the design of the study or in data analysis. This work was funded by project PI 16/00807, from the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness) and cofunded by the European Regional Development Funds. DBG has a research grant from the Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12) [grant number: AY11-2016 to DBG]. Research nurse's salary was covered by research funds from the Pediatric Infectious Diseases Unit. MGA is supported by "Instituto de Salud Carlos III" [grant number JR15/00031 to MGA].

PICCSA Study Group: Carmen Elia García, Silvia Chumillas, Concepción de Alba, Carlos Orbea, Mónica García-Álvarez, Sagrario Zurita Salas, Francisca Gutiérrez Cueto, Noelia Moral Jiménez, María Isabel González Tomé, and Antonio Cepillo.

Address for correspondence: Daniel Blázquez-Gamero, MD, PhD, Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Instituto de Investigación 12 de Octubre, Avenida de Córdoba S/N. Zip: 28048, Madrid, Spain. E-mail: danielblazquezgamero@gmail.com.

Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0891-3668/20/XXXX-0000

DOI: 10.1097/INF.0000000000002808

(imas12), Madrid, Spain, which is a secure, web-based application designed to support data capture for research studies.¹¹

Specimen Collection

A saliva sample was obtained within the first 72 hours of life by a trained nurse. To collect the specimen, a swab was placed in the inner surface of the infant's cheek for 30 seconds. Then, the swab was transferred into a sterile tube containing 3 mL of viral transport medium (Copan UTM; Copan, Brescia, Italy). Samples were processed within the first 24 hours after collection. When virus is detectable in saliva by a quantitative real-time PCR (qPCR) assay, a second specimen of saliva and a sample of urine were obtained during the first week of life. Urine was collected using sterile urine bags, after careful cleaning of perineal area. Saliva was collected at least 30 minutes after breast-feeding.

Specimen Processing and Testing

Oral sample tubes were vortexed and the swabs were removed upon arrival at the Virology Laboratory. All specimens (oral and urine samples) were centrifuged at 3000g for 15 minutes, and the supernatants were used for testing. A commercial quantitative real-time PCR (Veris Human Cytomegalovirus Assay, Beckman Coulter Diagnostics) was performed in VERIS MDx System (Beckman Coulter, Inc.). CMV viral load detection threshold was 120 IU/mL.

Newborn Evaluation

Gestational age, sex, birthweight and head circumference (HC) at birth were recorded in all participating newborns. In those newborns with a detectable viral load in saliva, urine sample and a second saliva sample were collected during the first 7 days of life for qPCR in both samples. cCMV infection was confirmed if viral load in urine was detectable.

In children with cCMV, a complete evaluation with physical examination by an experienced pediatric infectious diseases specialist or a neonatologist was performed. A thorough evaluation including blood cell count, liver enzymes and bilirubin, CMV viral load in blood, ophthalmologic assessment (funduscopy), cranial ultrasonography (cUS) and cranial magnetic resonance imaging (MRI) without sedation was carried out.

Hearing Evaluation

Automated auditory brainstem response (AABR; ALGO; Natus Medical, Inc.) was performed before maternity ward discharge in all children. All children were referred to the ENT Department and hearing evaluation was performed with an otomicroscopy and auditory steady-state evoked potentials (Elipse; Interacoustics A/S).

MRI examinations were performed within the first 2 weeks of life using 1.5 T scanner and without sedation, applying a vacuum mattress to immobilize the newborn. MRI was performed according to our protocol in cCMV cases: axial T1w, axial and coronal T2w, axial diffusion, 3D isometric sagittal T1w and axial SWI (susceptibility weighted imaging).

MRI images were evaluated by an experienced neuroradiologist, who was aware of the cCMV diagnosis but was blinded to other clinical data, such as viral load.

Follow-up

All infected children were followed up in the Pediatric Infectious Diseases Outpatient Clinic. Hearing evaluation (ABR) was repeated every 3 months during the follow-up. Neurologic follow-up was performed by an experienced neuropsychologist at 6, 12 and 24 months of age.

Serology During Pregnancy

Gestational serological status of mothers of cCMV-infected newborns was studied in stored serum samples. CMV-specific IgG and IgM levels and IgG avidity were determined with tests based on chemiluminescent microparticle immunoassays (CMIA), Architect system (Abbott Laboratories)

Definitions

cCMV was diagnosed when CMV viral loads in both saliva and urine newborn samples were detectable. False-positive (FP) result in saliva was defined as a detectable viral load with negative viral load in urine. Symptomatic infection at birth was defined as the presence of an abnormal physical exam (petechiae/purpura, jaundice, hepatomegaly, splenomegaly, neurological symptoms such as hypotonia, seizures, paresis, or weak sucking), chorioretinitis, hearing loss, small for gestational age (SGA), thrombocytopenia (platelet count $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$), elevated alanine aminotransferase levels (ALT >80 IU/L), hyperbilirubinemia (direct bilirubin level >2 mg/dL), microcephaly or neuroimaging abnormalities in cUS or MRI. Newborns who did not fulfill any of the above-mentioned criteria after a complete evaluation at birth were considered as cCMV-asymptomatic. SGA was defined as a birth weight below a standard deviation (SD) of -2 for gestational age.¹² Microcephaly was defined as an HC below an SD of -2 for gestational age.¹² SNHL was defined as a hearing threshold >25 dB tested by BSER in either ear. SNHL was evaluated at birth and at 12 months of age.

We looked for the following neuroimaging findings on first cUS and first MRI: white matter (WM) abnormalities, ventricular adhesions/septi, intracranial calcifications, ventriculomegaly, cerebellar hypoplasia, paraventricular temporal/frontal cysts, caudothalamic/subependymal/germinolytic cysts, lissencephaly, polymicrogyria or other migrational abnormalities.

WM abnormality in MRI was defined as an abnormal signal intensity within the WM (a high signal intensity on T2-weighted sequences and low signal intensity on T1-weighted sequences) as it has been previously described by Alarcon et al.¹³

Primary CMV infection during pregnancy was defined as the presence of seroconversion (anti-CMV IgG) or the presence of a positive IgM and IgG with low IgG avidity index ($<40\%$). Nonprimary infections were defined as the presence of positive IgG with high avidity ($>50\%$) before 12 weeks of gestation.

Statistical Analysis

Continuous variables were described with mean and SD. Categorical variables were described with absolute and relative frequencies. Prevalence was defined as the proportion of children with detectable viral load in both saliva and urine. The positive predictive value (PPV) was defined as the proportion of children with detectable viral load in saliva and urine among all children with detectable viral load in the first saliva sample. Two-sided 95% Clopper-Pearson exact confidence intervals for binomial proportions were calculated for prevalence and PPV. Comparisons between categorical variables in the 2 groups were performed using χ^2 or Fisher's exact test. Contrasts between continuous variables were performed using Mann-Whitney *U* test. A 2-tailed *P* value <0.05 was considered statistically significant. Data analysis was performed using SPSS statistical software, version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

Ethics

The study was approved by the Institutional Review Board of Hospital 12 de Octubre. All the procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration (1964, amended most recently in 2008) of the World Medical Association. Informed

consent was obtained from the parents of included infants, and personal data were only known by 2 investigators of the team.

RESULTS

Newborns

During the study period, 4097 children were born at Hospital 12 de Octubre, among whom 3226/4097 (79%) were invited to participate (871 children who were born during the weekends could not be included). Parents of 36 infants (36/3226; 1% CI 95%: 0.7%–1.4%) refused to participate. Saliva was collected from 3190/3226 newborns (99%) (Fig. 1). Viral load in saliva samples was above the quantification threshold (>120 IU/mL) in 24 out of 3190 children (0.75% CI 95%: 0.5%–1%). cCMV infection was confirmed in 15/3190 neonates (0.47% CI 95%: 0.29%–0.77%), all of them had a detectable viral load in urine and a second detectable viral load in saliva. The positive screening test was considered an FP test in 9 newborns (9/3190; 0.28% CI 95%: 0.15%–0.43%) in whom viral loads in the second saliva and urine specimens were undetectable. PPV was 62.5% (CI 95%: 46.5%–76.1%). In 2 FP cases, breast milk was studied and CMV viral load was detectable (546 and 5327 IU/mL, respectively). Viral load in saliva from FP infants was significantly lower than that in those with confirmed cCMV (mean: 863.4 IU/mL (SD = 1100.3 IU/mL) versus 3,177,612.4 IU/mL (SD = 3,822,646 IU/mL); $P = 0.006$, Fig. 2). In 40% (6/15) of newborns with cCMV, blood viral load within the first 2 weeks of life was under the quantification limit (<120 IU/mL). Viral loads in saliva, urine and blood are listed in Table 2.

Eighty-seven percent (13/15) of infected infants had a normal physical exam. One newborn showed a sepsis-like syndrome with no isolation in bacterial cultures; and 1 child presented jaundice, hepatomegaly and increased liver enzymes. There were no differences regarding gestational age at birth, days of life at the time of screening, birth weight or HC, between children with cCMV and those who were not infected (Table 1). Eight percent (272/3190) of newborns were born prematurely (under 37 weeks of gestation). Only 1 preterm infant (35 weeks' gestation) had cCMV (1/272 preterms; 0.37%).

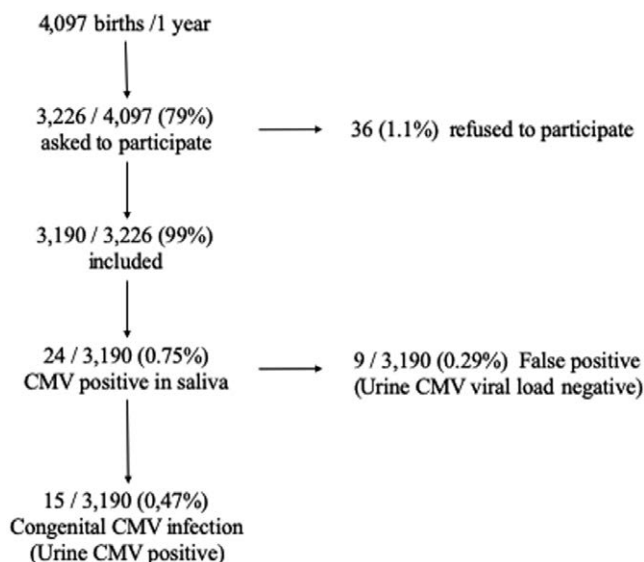


FIGURE 1. Patients flowchart. CMV indicates cytomegalovirus.

All children with cCMV had normal ABR; one of them was diagnosed with chorioretinitis and macular scar. Cerebral MRI was performed in all children with cCMV: 8 out of 15 (53%) showed abnormalities, the isolated WM abnormalities being the most common finding (6/8, 75%); however, 2 infants showed moderate to severe abnormalities (Table 2). Children with abnormalities in MRI presented higher viral loads in saliva ($P = 0.04$) and blood ($P = 0.04$) (Table 3). Viral load in urine was not associated with the presence of MRI abnormalities.

Antiviral treatment was offered to children with CNS abnormalities in cUS and/or in MRI and to the girl with chorioretinitis. Oral valganciclovir was the drug of choice in all cases, except in 1 case with a sepsis-like syndrome and abnormalities in cUS and MRI, where intravenous ganciclovir was given for 5 days and then was switched to oral valganciclovir (Table 2).

Follow-up

Children with cCMV were followed during a median period of 25 months (interquartile range: 24–31), and 2 children were lost to follow-up (at 2 and 6 months of age) (Table 2). None of those 13 children with available follow-up developed HL (Table 2). One child showed a mild neurodevelopmental delay, and another child presented a language development delay with normal hearing, at 36 months of age (Table 2). The infant with the macular scar due to CMV at birth showed no changes in ophthalmoscopic evaluation.

Mothers

Fourteen out of 15 mothers whose infants were infected had available stored serum samples from pregnancy. Ten out of 14 (71.4%) had had a nonprimary CMV infection during pregnancy, and the remaining 4, a primary infection. In all cases fetal ultrasounds during pregnancy had been reported as normal. One pregnant woman with a first-trimester primary infection (10 weeks of gestation) had an amniocentesis performed with a detectable viral load in amniotic fluid.

DISCUSSION

This is the first published study regarding the prevalence of cCMV in Spain. The observed rate (0.47%) was similar to that found in other Western countries.¹ Prevalence in industrialized countries ranges from 0.2% to 1%, and over 1% in developing countries, where there is a higher rate of seropositive women.^{1,8,14,15} Prevalence of cCMV in Spain was unknown to date, since previous studies have been conducted exclusively in particular high risk groups, such as preterm infants.⁷ Screening in saliva samples seems to be a very well-accepted technique among parents, as it is noninvasive and readily available, thus emerging as the screening test of choice. However, it has some FP results, for which it is necessary to confirm or refute the congenital infection with additional tests. In our study, there were 9 newborns with detectable viral load in saliva in which cCMV was excluded by the presence of undetectable viral load in urine. This represents a FP rate of 0.3%, similar to that found in a French study⁸ but higher than what was found in another study from the United States (0.03%).^{8,9}

In our cohort, FP cases showed a lower viral load in saliva, so they were easily discernible from true positive cases, which showed very high viral loads.^{8,16} It has been proved that CMV coming from mother's breast milk can contaminate the saliva of newborns, leading to a positive PCR detection when the saliva sample is obtained immediately after breast-feeding.¹⁰ In 2 of these FP cases, we were able to perform a CMV viral load detection in breast milk, finding a detectable result in both of them. This reinforces the hypothesis of breast milk CMV contamination. In this study, saliva was collected at least 30 minutes after breast-feeding, to minimize the risk

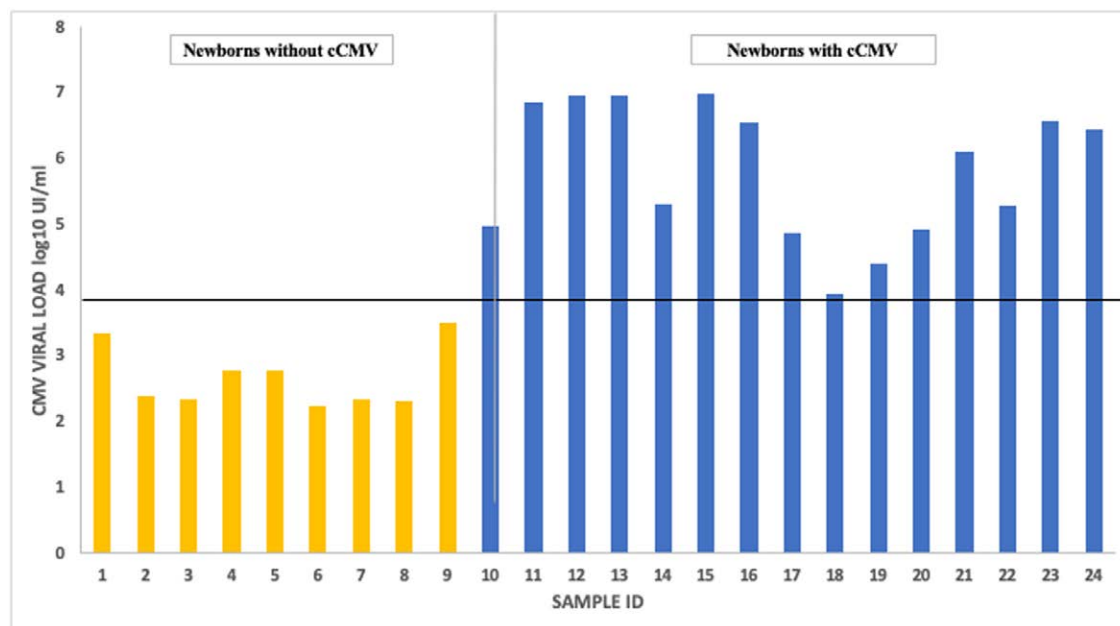


FIGURE 2. Saliva cytomegalovirus viral load (IU/mL) in confirmed cytomegalovirus congenital infected infants and in false-positive cases. CMV indicates cytomegalovirus; cCMV, congenital cytomegalovirus infection; ID, identification.

TABLE 1. Main Characteristics of Study Children Diagnosed with Congenital Cytomegalovirus Infection

	Congenital CMV Infection Average (SD)	Noninfected Average (SD)	P value ^a
Gestational age at birth (weeks)	38.3 (1.8)	38.8 (2)	0.34
Age at screening (days)	2.1 (3.2)	1.4 (2.2)	0.22
Weight (g)	3128.57 (666.2)	3188.18 (544.8)	0.7
Weight Z score	-0.007 (1.3)	0.18 (1.2)	0.57
Head circumference (cm)	33.8 (2)	34.3 (1.7)	0.24
Head circumference Z score	-0.33 (2)	0.1 (1.4)	0.25

CMV indicates cytomegalovirus; SD, standard deviation.

^aComparisons between categorical variables in the 2 groups were performed using χ^2 or Fisher's exact test. Contrasts between continuous variables were performed using the Mann-Whitney *U* test. A 2-tailed *P* < 0.05 was considered statistically significant.

of a FP result; however, we found that FP results were frequent. Most infected newborns (13/15;87%) had no symptoms on physical exam, nor did any of them show hearing loss. There were no differences in gestational age, birthweight or HC between children with and without cCMV; therefore, a targeted screening based on these variables would overlook many infected children. Moreover, none of them presented an abnormal hearing screening at birth. In spite of the fact that without a screening program only 2 (13.3%) children would have been diagnosed with cCMV, some of them had severe findings, such as major abnormalities in CNS imaging (*n* = 2) (one of them also had a severe cholestasis and hepatitis), and 1 girl presented with a macular scar. Another 6 children showed isolated WM abnormalities, bringing the overall rate of children with CNS imaging abnormalities of 8/15 (53.3%). Yamaguchi et al found that up to 83% of children with cCMV diagnosed during a screening program in Japan presented with abnormalities in cranial MRI at birth.¹⁷ However, the prognostic value of isolated WM disease in children with cCMV and no other symptoms is still unknown, and there are no data about the benefits of antiviral treatment in this situation.¹⁸

CMV viral loads in saliva and blood were higher in newborns with MRI abnormalities. Several studies have shown an association between viral loads in different fluids and long-term prognosis. Also, DNAemia has been associated with an increased risk of hearing loss and long-term sequelae in some studies.^{19,20} Ross et al found no clear association between blood viral loads and hearing loss.²¹ However, saliva viral load has not been evaluated as a prognostic marker in cCMV so far. The association found between saliva viral load and abnormalities in MRI in our study raises a question regarding the usefulness of the high viral load in saliva as a marker of CNS involvement in cCMV. If association among viral load and CNS involvement is further confirmed, this noninvasive technique could not only be a good screening method but also a potential prognostic marker.

In this study, most children with cCMV were born after a nonprimary infection during pregnancy (71.4%). The importance of nonprimary infections in cCMV has been extensively highlighted in several studies, even in high-resource countries like Spain.^{8,22} In our cohort, the 3 children with more severe symptoms were born from mothers with nonprimary infections. This fact has considerable implications for maternal CMV screening during pregnancy, as diagnosis of maternal nonprimary infection after reinfection or reactivation is challenging. Cost-effectiveness studies about cCMV screening in targeted populations and universal screening in newborns have been performed in the United States and Europe, the results of which seem to present a cost-effective initiative.²³⁻²⁵ The prevalence found in our study (approximately 1 infected child for every 200 newborns) is several times higher than that of other systematically screened diseases: for example, it is 10 times more frequent than congenital hypothyroidism and 100 times more frequent than congenital adrenal hyperplasia in Spain.²⁶ Even taking into account only the estimated number of children with long-term sequelae associated with cCMV, the incidence would be higher than that in other screened diseases by dried blood spots in Spain at birth.^{25,26} Despite the high incidence of this condition, there are several questions that should be answered before universal screening of cCMV is to be recommended at a national scale, such

TABLE 2. Clinical Characteristics, MRI Findings and Viral Loads in Saliva, Urine and Blood of 15 Infants With Congenital Cytomegalovirus Infection

Gestational Age at Birth (Weeks)	Physical Examination	Hearing Loss	Chorioretinitis	MRI	Saliva Viral Load (IU/mL)	Urine Viral Load (IU/mL)	Blood Viral Load (IU/mL)	Diagnosis	Type of Infection During Pregnancy	Antiviral Treatment	Follow-up (Months of Follow-up/Hearing and Neurologic Outcomes)
1	40 Normal	No	No	White matter abnormalities	94,735	3,595,047	923	Screening	Primary	Valganciclovir (p.o)	36 Normal
2	40 Normal	No	No	White matter abnormalities	7,426,025	1,325,721	5064	Screening	Primary	Valganciclovir (p.o)	36 Language delay
3	40 Normal	No	No	White matter abnormalities	9,411,674	2,756,345	<120	Screening	Nonprimary	Valganciclovir (p.o)	31 Normal
4	35 Jaundice, hepatomegaly, hepatitis.	No	No	Bilateral paraventricular temporal cysts	9,179,822	597,082	3223	Symptoms	Nonprimary	Valganciclovir (p.o)	12 Hepatitis and cholestasis, resolved
5	36 Normal	No	No	Normal	202,663	779,152	779,152	Screening	Nonprimary	No	Normal
6	39 Normal	No	No	White matter abnormalities	9,581,919	604,578	442	Screening	NA	Valganciclovir (p.o)	29 Normal
7	37 Sepsis-like	No	No	White matter abnormalities, ventricular adhesions, calcifications	3,483,843	10,000,000	15,836	Symptoms	Nonprimary	Ganciclovir (i.v) + Valganciclovir (p.o)	24 Normal
8	35 Normal	No	No	Normal	72,484	29,881	<120	Screening	Nonprimary	No	Mild neurodevelopmental delay
9	40 Normal	No	No	Normal	8751	25,399	<120	Screening	Nonprimary	No	24 Normal
10	39 Normal	No	No	Normal	25,450	16,479	<120	Gestational screening	Primary	No	2 Lost to follow up
11	38 Normal	No	No	Normal	80,882	255,772	<120	Screening	Primary	No	6 Lost to follow up
12	38 Normal	No	No	Normal	1,319,502	10,000,000	4002	Screening	Nonprimary	No	26 Normal
13	40 Normal	No	No	White matter abnormalities	196,398	33,144	<120	Screening	Nonprimary	Valganciclovir (p.o)	24 Normal
14	39 Normal	No	Yes	White matter abnormalities	3,837,482	10,000,000	651	Screening	Nonprimary	Valganciclovir (p.o)	15 Macular scar at right eye
15	38 Normal	No	No	Normal	2,742,556	103,978	126	Screening	Nonprimary	No	25 Normal strabismus not related to CMV

MRI indicates magnetic resonance imaging.

TABLE 3. Median Viral Load Values and Interquartile Ranges in Saliva, Urine, and Blood in Newborns With Congenital Cytomegalovirus Infection and Association With Abnormalities in MRI

	Normal MRI		Abnormal MRI		P value ^a
	Median	IQR	Median	IQR	
Saliva viral load (IU/mL)	80,882	25,450–1319502	5,631,753.5	1,018,259.3–9,353,711	0.04
Urine viral load (IU/mL)	103,978	25,399–779,152	2,041,033	598,956–8,398,761.8	0.3
Blood viral load (IU/mL)	60	60–364	787	155.5–4603.8	0.04

MRI indicates magnetic resonance imaging; IQR, interquartile range.

^aComparisons between categorical variables in the 2 groups were performed using χ^2 or Fisher's exact test. Contrasts between continuous variables were performed using Mann–Whitney *U* test. A 2-tailed *P* < 0.05 was considered statistically significant.

as the benefits of antiviral treatment in asymptomatic and mildly symptomatic children. However, generalized cCMV newborn screening would have other benefits different from those of antiviral treatment, like avoidance of unnecessary diagnostic procedures in misdiagnosed children, prompt diagnosis of hearing, visual and neurological deficits and early establishment of rehabilitation and physical therapy in children with neurological problems.

There are several limitations in this study. First, we were not able to test all children born in our center because we only tested during weekdays. Second, the screening has been carried out in newborns from the catchment area of our hospital, which is an area of low socioeconomic level in Madrid; therefore, our results may not be applicable to all regions in Spain or even to other areas in Madrid. Finally, given that urine detection of CMV within the first week of life was considered the gold standard test for cCMV diagnosis in our study, we could not estimate the false-negative rate and, consequently, the sensitivity of qPCR detection in saliva. However, previous investigations showed a sensitivity at or near 100%.²⁷

In conclusion, this is the first published study regarding the prevalence of cCMV in Spain. One in 200 neonates born in our hospital had a cCMV infection. CMV viral load in saliva is a simple and highly accepted screening method but should be confirmed by CMV detection in urine. Despite more than half of infected newborns showing any abnormalities in MRI, diagnosis during the neonatal period would have been impossible without a screening program in most cases. Children with MRI abnormalities presented higher viral loads in blood and saliva. The association between viral load and MRI abnormalities and their potential role as prognostic factors in cCMV should be addressed in future studies.

Cost-effectiveness studies of cCMV screening programs should be performed in our country.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all the children and their families included in the study and all the investigators involved in the study (PICCSA Study group). Our thanks are due to Mr. Martin J. Smyth, BA, for his help in correcting the English.

REFERENCES

- Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, et al. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:86–102.
- Arvin AM, Fast P, Myers M, et al; National Vaccine Advisory Committee. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin Infect Dis.* 2004;39:233–239.
- 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;17:355–363.
- Barbi M, Binda S, Caroppo S, et al. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:39–42.
- Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, et al. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 1997;130:624–630.
- Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol.* 2006;35:226–231.
- Balcells C, Botet F, Gayete S, et al; Castrillo Study Group. Vertically transmitted cytomegalovirus infection in newborn preterm infants. *J Perinat Med.* 2016;44:485–490.
- Leruez-Ville M, Magny JF, Couderc S, et al. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection following primary and nonprimary maternal infection: a prospective neonatal screening study using polymerase chain reaction in saliva. *Clin Infect Dis.* 2017;65:398–404.
- Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, et al; National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CHIMES Study. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2011;364:2111–2118.
- Koyano S, Inoue N, Nagamori T, et al. Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013;98:F182.
- Harris PA, Taylor R, Thielke R, et al. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42:377–381.
- Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, et al. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics.* 2010;125:e214–e224.
- Alarcon A, Martinez-Biarge M, Cabañas F, et al. A prognostic neonatal neuroimaging scale for symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Neonatology.* 2016;110:277–285.
- Smit GSA, Padalko E, Van Acker J, et al. Public health impact of congenital toxoplasmosis and cytomegalovirus infection in Belgium, 2013: a systematic review and data synthesis. *Clin Infect Dis.* 2017;65:661–668.
- Puhakka L, Lappalainen M, Lönnqvist T, et al. The burden of congenital cytomegalovirus infection: a prospective cohort study of 20 000 infants in Finland. *J Pediatr Infect Dis Soc.* 2018;8:205–212.
- Ross SA, Michaels MG, Ahmed A, et al. Contribution of breastfeeding to false-positive saliva polymerase chain reaction for newborn congenital cytomegalovirus screening. *J Infect Dis.* 2018;217:1612–1615.
- Yamaguchi A, Oh-Ishi T, Arai T, et al. Screening for seemingly healthy newborns with congenital cytomegalovirus infection by quantitative real-time polymerase chain reaction using newborn urine: an observational study. *BMJ Open.* 2017;7:e013810.
- Giannattasio A, Bruzzese D, Di Costanzo P, et al. Neuroimaging profiles and neurodevelopmental outcome in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37:1028–1033.
- Forner G, Abate D, Mengoli C, et al. High Cytomegalovirus (CMV) DNAemia Predicts CMV sequelae in asymptomatic congenitally infected newborns born to women with primary infection during pregnancy. *J Infect Dis.* 2015;212:67–71.
- Bradford RD, Cloud G, Lakeman AD, et al; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *J Infect Dis.* 2005;191:227–233.
- Ross SA, Novak Z, Fowler KB, et al. Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28:588–592.


22. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly sero-immune population. *Clin Infect Dis*. 2009;49:522–528.
23. Gantt S, Dionne F, Kozak FK, et al. Cost-effectiveness of universal and targeted newborn screening for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA Pediatr*. 2016;170:1173–1180.
24. Williams EJ, Gray J, Luck S, et al. First estimates of the potential cost and cost saving of protecting childhood hearing from damage caused by congenital CMV infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100:F501–F506.
25. Cannon MJ, Griffiths PD, Aston V, et al. Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit? *Rev Med Virol*. 2014;24:291–307.
26. Asociación Española de Cribado Neonatal. Programa de cribado neonatal en España 2016. January 2017.
27. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, et al; National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CHIMES Study. Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *J Infect Dis*. 2014;210:1415–1418.

2. Artículo: Prevention and treatment of fetal cytomegalovirus infection with cytomegalovirus hyperimmune globulin: a multicenter study in Madrid. Blázquez-Gamero D, Galindo Izquierdo A, Del Rosal T, Baquero-Artigao F, Izquierdo Méndez N, [Soriano-Ramos M](#), Rojo Conejo P, González-Tomé MI, García-Burguillo A, Pérez Pérez N, Sánchez V, Ramos-Amador JT, De la Calle M. J Matern Fetal Neonatal Med. 2019;32(4):617-25.

ORIGINAL ARTICLE



Prevention and treatment of fetal cytomegalovirus infection with cytomegalovirus hyperimmune globulin: a multicenter study in Madrid

Daniel Blázquez-Gamero^a , Alberto Galindo Izquierdo^b, Teresa Del Rosal^c, Fernando Baquero-Artigao^c, Nuria Izquierdo Méndez^d, María Soriano-Ramos^a, Pablo Rojo Conejo^a, María Isabel González-Tomé^a, Antonio García-Burguillo^b, Noelia Pérez Pérez^d, Virginia Sánchez^a, Jose Tomás Ramos-Amador^e and Maria De la Calle^f

^aPediatric Infectious Disease Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), RITIP, Madrid, Spain; ^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, Facultad de Medicina, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain; ^cPediatrics, Tropical and Infectious Diseases Department, University Hospital La Paz, RITIP, Madrid, Spain; ^dDepartment of Obstetrics, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain; ^eDepartment of Pediatrics, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), RITIP, Madrid, Spain; ^fMaternal and Fetal Unit, Department of Obstetrics, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

ABSTRACT

Introduction: Cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of congenital infection worldwide. Data about the management of CMV infection in pregnant women are scarce, and treatment options are very limited. The aim of the study is to investigate the effectiveness of cytomegalovirus hyperimmune globulin (CMV-HIG) for the prevention and treatment of congenital CMV (cCMV) infection.

Materials and methods: A retrospective observational study was conducted in three tertiary hospitals in Madrid. In the period 2009–2015, CMV-HIG (Cytotect[®] CP Biotest, Biotest) treatment was offered to all pregnant women with primary CMV infection and/or detection of CMV-DNA in amniotic fluid in participating centers. Women were divided into prevention and treatment groups (PG and TG, respectively). Those with primary CMV infection who had not undergone amniocentesis comprised the PG and received monthly CMV-HIG (100 UI/kg). If CMV-DNA was subsequently detected in amniotic fluid, one extra dose of CMV-HIG (200 UI/kg) was given 4 weeks after the last dose. Those women were considered to be part of the PG group despite detection of CMV-DNA in amniotic fluid. In the case of a negative result in CMV-DNA detection in amniotic fluid or if amniocentesis was not performed, monthly HIG was given up to the end of the pregnancy.

Results: Thirty-six pregnant women were included. Median gestational age at birth was 39 weeks (interquartile range: 38–40) and two children (5.5%) were premature (born at 28 and 34 weeks' gestation). Amniocentesis was performed in 30/36 (83.4%) pregnancies and CMV PCR was positive in 21 of them (70%). One fetus with a positive PCR in amniotic fluid that received one dose of HIG after amniocentesis presented a negative CMV-PCR in urine at birth, and was asymptomatic at 12 months of age. Twenty-four children were infected at birth, and 16/21 (76.2%) presented no sequelae at 12 months, while two (9.5%) had a mild unilateral hearing loss and three (14.3%) severe hearing loss or neurological sequelae. Seventeen women were included in the PG and 19 in the TG. In the PG 7/17 (41%) fetuses were infected, one pregnancy was terminated due to abnormalities in cordocentesis and one showed a mild hearing loss at 12 months of age. In the TG, 18/19 children (95%) were diagnosed with cCMV, while the remaining neonate had negative urine CMV at birth. Eight out of the 19 fetuses (42.1%) showed CMV related abnormalities in the fetal US before HIG treatment. Complete clinical assessment in the neonatal period and at 12 months of age was available in 16 and 15 children, respectively. At birth 50% were symptomatic and at 12 months of age, 4/15 (26.7%) showed a hearing loss and 3/15 (20%) neurologic impairment. Fetuses with abnormalities in ultrasonography before HIG presented a high risk of sequelae (odds ratios: 60; 95%CI: 3–1185; $p = .007$).

Discussion: Prophylactic HIG administration in pregnant women after CMV primary infection seems not to reduce significantly the rate of congenital infection, but is safe and it could have a favorable effect on the symptoms and sequelae of infected fetuses. The risk of long-term sequelae in fetuses without US abnormalities before HIG is low, so it could be an option in infected fetuses with normal imaging. On the other hand, the risk of sequelae among infected fetuses with abnormalities in fetal ultrasonography before HIG despite treatment is high.

ARTICLE HISTORY

Received 15 August 2017
Revised 1 October 2017
Accepted 1 October 2017

KEYWORDS

Congenital cytomegalovirus; hyperimmune globulin; hearing loss; fetal infection

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of congenital infection worldwide [1]. In industrialized countries, up to 50% of women of childbearing age are seronegative for CMV, and 1–7% of those women will be infected by CMV every year [1,2]. Transmission rates to the fetus in primary maternal infections are 30–42% in the first trimester, 38–44% in the second and 59–73%, in the third [2–6]. Neonatal manifestations occur at rates ranging from 10 to 40%, depending on the time of maternal-fetal CMV transmission, and sequelae occur at higher rates after fetal infection in the first 4 months [5–7].

Data about the management of CMV infection in pregnant women are scarce, and treatment options are very limited. Several nonrandomized studies have explored the usefulness of cytomegalovirus hyperimmune globulin (CMV-HIG) in primary infections during pregnancy, showing a lower risk of fetal infection and symptomatic disease at birth in infants born to mothers who had been treated with HIG [8–10]. In 2014, a randomized and controlled clinical trial comparing monthly infusions of HIG (100 units/kg) versus saline solution as placebo in 123 pregnant women with recent primary infection showed no significant differences in the transmission rate between HIG (18/61, 30%) and placebo groups (27/62, 44%), ($p = .13$) [11]. The aim of this study was to investigate the effectiveness of CMV-HIG for prevention and treatment of CMV fetal infection, and outcomes at 12 months of age.

Materials and methods

Study design

A retrospective observational study in three tertiary hospitals in Madrid (La Paz, 12 de Octubre and Clínico San Carlos) was performed. Pregnant women with suspected primary CMV infection were referred to those hospitals and were evaluated by a fetal medicine specialist.

CMV screening during pregnancy is currently not mandatory in Spain [12], but some centers perform it on a routine basis, usually once in each trimester of pregnancy, at around 9–11, 24–26 and 34–36 weeks. Obstetric ultrasound scans in our country are almost exclusively performed by maternal-fetal medicine doctors, and the policy regarding antenatal care in low-risk pregnancies includes an obstetric ultrasound scan in every trimester of pregnancy. However, pregnancies with CMV primary infection or with fetal anomalies are referred to tertiary centers for further assessment and

follow-up, and monthly obstetric ultrasounds are performed.

The approach to all referred patients was similar in the three centers and included serological testing for CMV IgM and IgG antibodies, IgG avidity test, and a detailed fetal ultrasonography (FUS) performed by an experienced fetal medicine specialist. Serum samples from pregnant women were tested on Abbott Architect CMV IgG, IgM and IgG Avidity assay (chemiluminescent microparticle immunoassay, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

Amniocentesis for CMV-PCR in amniotic fluid was always performed at least 6 weeks after the first positive serological result and once the pregnancy had reached the 21st week of gestation.

Congenital CMV (cCMV) infection was confirmed by virus isolation from the newborn's urine within the first 14 d of life by conventional cell culture (Vircell CMV - MAb, Granada, Spain) in MRC-5 cell lines and/or by real-time PCR detection (VERIS CMV Assay, DxN VERIS Molecular Diagnostic System, Beckman Coulter Inc., Brea, CA). Detection of CMV-DNA in amniotic fluid was performed with the same diagnostic tool.

In the period 2009–2015, CMV-HIG (Cytotect[®] CP Biotest, Biotest) treatment was offered to all pregnant women with primary CMV infection and/or detection of CMV-DNA in amniotic fluid in participating centers. Women were divided into prevention and treatment groups (PG and TG, respectively). Those with primary CMV infection who had not undergone amniocentesis comprised the PG and received monthly CMV-HIG (100 UI/kg). If CMV-DNA was subsequently detected in amniotic fluid, one extra dose of CMV-HIG (200 UI/kg) was given 4 weeks after the last dose. Those women were considered to be part of the PG group despite detection of CMV-DNA in amniotic fluid. In the case of a negative result in CMV-DNA detection in amniotic fluid or if amniocentesis was not performed, monthly HIG was offered and a median of two HIG doses were given in the PG.

Pregnant women with CMV-DNA detection in amniotic fluid and no previous HIG treatment were included in the TG, and at least one dose of HIG (200 UI/kg) was given. In cases with abnormalities in FUS, one extra dose of CMV-HIG (200 UI/kg) was offered.

All newborns were studied for cCMV infection. At birth, a complete physical examination, fundoscopy, brainstem auditory-evoked response (BAER), CNS-US, complete blood count, liver function tests (direct bilirubin and aminotransferases) were performed in infected children. In children with abnormal CNS US, magnetic resonance imaging (MRI) was performed. All infected infants were assessed by a pediatrician,

pediatric neurologist, ophthalmologist and otolaryngologist. BAER, funduscopy and physical examination were repeated at 12 months of age.

The main endpoint of the study was the presence of neurologic sequelae or hearing loss at 12 months of age. Secondary endpoints were the presence of congenital infection in children from the PG and the rate of symptomatic cCMV in each group.

Definitions

Primary maternal infection was defined by seroconversion or by the presence of positive CMV IgG and IgM antibodies with low IgG avidity test (<30%). *Seroconversion* was defined as the presence of a positive serology for CMV (IgM and/or IgG), in a previously seronegative pregnant woman (IgM and IgG negative).

Gestational age at infection was defined as the first day of CMV-related symptoms (fever, malaise, lymphadenopathy) or date of seroconversion (date of first positive serology) in asymptomatic patients. Only in one asymptomatic woman with low avidity test but no evidence of seroconversion we were not able to determine the time of infection.

CNS abnormal findings in FUS were defined as the presence of at least one of the following: ventriculomegaly, calcifications, ventricular synechiae, cysts, white matter and/or migrational abnormalities and microcephaly.

Non-CNS fetal abnormalities diagnosed by FUS were defined by the presence of intrauterine growth restriction (estimated fetal weight below the 10th percentile), hyperechogenic bowel, oligohydramnios and/or enlargement of fetal organs (cardiomegaly, splenomegaly and hepatomegaly).

Symptomatic cCMV at birth was defined by the presence of at least one of the following: microcephaly (head circumference more than two standard deviations below the mean for gestational age and gender, according to the Spanish growth charts [13]), small for gestational age (weight more than two standard deviations below the mean for gestational age and gender [13]), petechiae, splenomegaly, hepatomegaly, jaundice, hemiparesis or spasticity, thrombocytopenia (platelet count $<100 \times 10^3/\mu\text{l}$), hyperbilirubinemia (direct bilirubin level $>2 \text{ mg/dl}$), elevated alanine aminotransferase levels ($> 80 \text{ IU/l}$), chorioretinitis, seizures, hearing loss (hearing threshold $>25 \text{ dB}$ tested by BAER) in either ear, or abnormal neuroimaging findings.

Abnormal neuroimaging findings at birth were considered any of those listed above in CNS FUS findings.

Neurologic sequelae at 12 months were defined as the presence of at least one of the following: motor impairment (paresis, spasticity), epilepsy in treatment, visual impairment, inability to sit without assistance or microcephaly.

Hearing loss at 12 months was defined as a hearing threshold $>25 \text{ dB}$ tested by BAER in either ear.

Ethics

Informed consent was requested in all patients. This study was approved by the Institutional Review Board of Hospital 12 de Octubre.

Statistics

Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR), and categorical variables as counts and percentages. χ^2 or Fisher's exact test were used to compare categorical variables. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95%CI) were calculated. All statistical analyses were performed using SPSS software version 20.0 (IBM Corp, Armonk, NY).

Results

Thirty-six pregnant women who received at least one dose of CMV-HIG were included. The main reasons for consultation and characteristics of pregnant women included in the study were listed in Table 1. Median gestational age at birth was 39 weeks [IQR: 38–40] and two children (5.5%) were premature (born at 28 and 34 weeks of gestation).

Table 1. Characteristics of pregnant women included in the study. Results are expressed as median and interquartile range (IQR) or counts (*n*) and percentages (%). HIG: hyperimmune globulin.

Variables	Median or <i>n</i>	IQR or %
Age at first visit (years)	33.3	30.9–36.8
Gestational age at infection (weeks)	20	10–25
Symptomatic infection in the mother	18/33	54.5%
Gestational age at amniocentesis (weeks)	21	20–26
Gestational age at first HIG dose	24	19.5–28
Weeks from maternal infection to HIG	4	2–8
Number of HIG doses	1	1–2
HIG adverse events	1/36	3%
Gestational age at birth (weeks)	39	38–40
Main reason for consultation		
Seroconversion	14	38.9
Positive IgM and IgG antibodies with low avidity index	10	27.8
FUS findings	5	13.9
Symptoms suggestive of acute CMV infection	3	8.3
Contact with CMV-infected people	3	8.3
Positive CMV-PCR in amniotic fluid	1	2.8

Amniocentesis was performed in 30/36 (83.4%) pregnancies and CMV PCR was positive in 21 of them (70%). One fetus with a positive PCR in amniotic fluid (viral load was not performed) that received one dose of HIG after amniocentesis presented a negative CMV-

Table 2. Characteristics of children born to pregnant women included in the study. Results are expressed as counts (*n*) and percentages (%).

	<i>n</i>	%
Congenital infection	24/35	68.6
Symptomatic at birth	9/24	37.5
Microcephaly	3/24	12.5
Chorioretinitis	0/24	0
Small for gestational age	2/24	8.3
Petechiae	2/24	8.3
Splenomegaly	5/24	21
Hepatomegaly	5/24	21
Jaundice	6/24	25
Seizures	0/24	0
Motor impairment at birth	3/24	12.5
Hearing loss	5/24	21
Abnormal blood tests	3/24	12.5
Outcome at 12 months		
Hearing loss	5/21	23.8
Motor impairment	3/21	14.3
Microcephaly	2/21	9.5
Epilepsy	3/21	14.3
Chorioretinitis	2/21	9.5
Remain seated	2/21	9.5
Any disabilities	5/21	23.8

PCR in urine at birth, and was asymptomatic at 12 months of age.

One pregnancy was terminated due to abnormalities in cordocentesis. At birth the overall cCMV rate was 68.6% (24/35) and 9/22 (41%) of the infected children were symptomatic. Symptoms at birth were listed in Table 2. Among all congenitally infected children, outcomes at 12 months were available in 21/24 (87.5%). Sixteen (76.2%) presented no sequelae at 12 months of age, two (9.5%) mild unilateral hearing loss and three (14.3%) severe hearing loss and/or important neurological sequelae (motor impairment and/or epilepsy) (Figure 1). None of the 11 children with asymptomatic cCMV at birth developed any sequelae at 12 months of age.

Five out of the 21 (23.8%) cCMV-infected infants with available follow-up at 12 months presented with FUS abnormalities before HIG treatment. Only one child without abnormalities in fetal FUS before HIG had long-term sequelae (1/16; 6.2%). The risk of sequelae at 12 months was much higher in patients with FUS abnormalities before HIG (4/5 versus 1/16; OR: 60; 95% CI: 3–1185; $p = .007$). No serious adverse events related to HIG treatment were found, and only one woman presented a mild headache during infusion. Seventeen women were

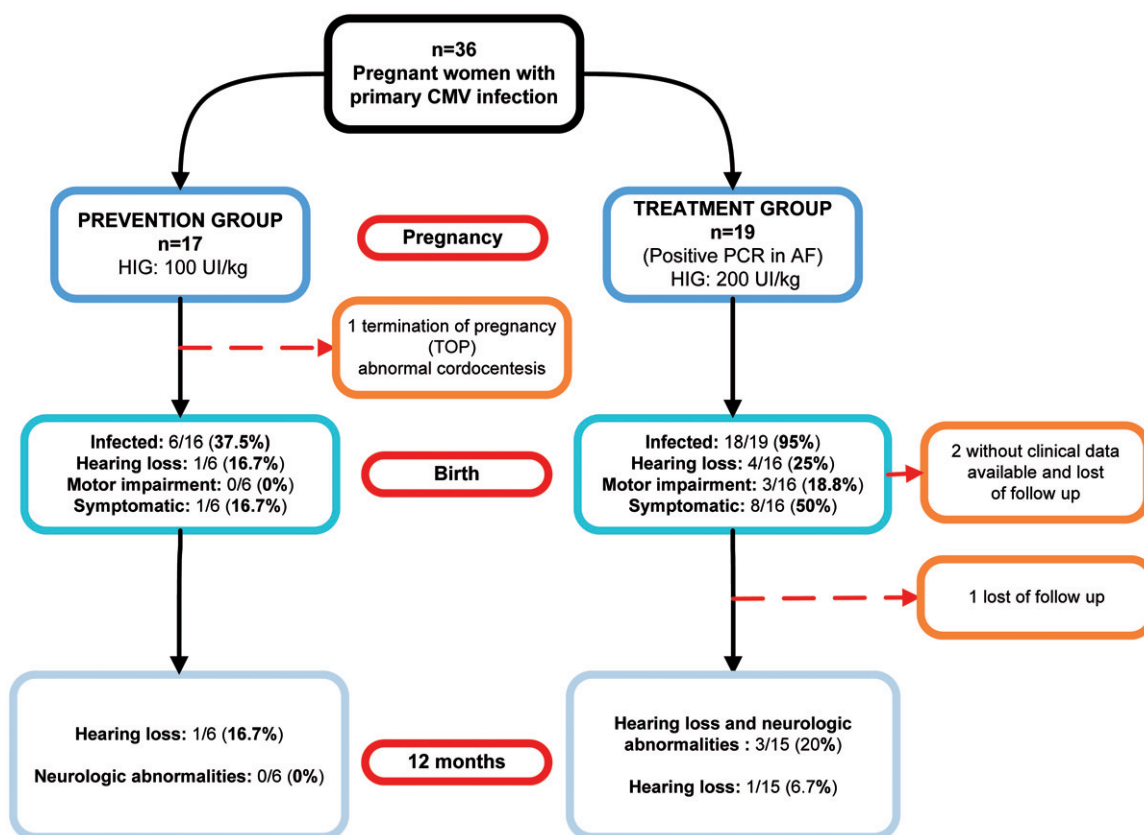


Figure 1. Treatment and prevention groups and children outcomes at birth and 12 months of age. TOP: termination of pregnancy; HIG: cytomegalovirus-specific hyperimmune globulin.

Table 3. Comparative data between preventive and treatment groups. Data expressed as median and interquartile range.

	Prevention <i>n</i> = 17 Median [IQR]	Treatment <i>n</i> = 19 Median [IQR]	<i>p</i> Value
Gestational age (weeks) at maternal infection	20 [10–26]	19 [12.8–22.5]	.8
Gestational age (weeks) at amniocentesis	21 [20–25.5]	24 [20–26.5]	.4
Viral load in amniotic fluid (cop/ml)	2385×10^3 [27×10^3 – 4700×10^3]	570×10^3 [50×10^3 – 3.000×10^3]	.8
Gestational age (w) at first HIG treatment	20 [14–27]	25.5 [23–30.3]	.04
Number of HIG doses	2 [1.5–3]	1 [1–1]	.001
Weeks from estimated maternal infection to HIG treatment	3.5 [0.8–4]	6 [4.5–6.5]	.006

included in the PG and 19 in the TG. Main characteristics of both groups are listed in [Table 3](#).

Prevention group

In the PG, 7/17 fetuses (41%) were CMV infected. Only one fetus (1/17; 5.9%) presented abnormalities in FUS before HIG treatment (hyperechogenic bowel in the first trimester) and received HIG at 12 and 16 weeks of gestation. This ultrasound marker was completely resolved at 16 weeks and the PCR in amniotic fluid at 21 weeks of gestation was negative. Finally, the newborn was not CMV-infected. One pregnancy in this group was terminated due to abnormalities in cordocentesis (platelets: $69.000/\text{mm}^3$, CMV viral load in fetal blood: 170.000 copies/ml) in a fetus with positive CMV-PCR in amniotic fluid after one dose of HIG. Among the remaining 16 children, six were diagnosed with cCMV (37.5%). In this group, there was only one symptomatic child (mild unilateral hearing loss) at birth (1/16; 6.2%). This case showed no abnormalities in FUS, performed immediately before HIG. Mild hearing loss persisted at 12 months of age ([Table 4](#) and [Figure 1](#)).

Treatment group

In the TG, 18/19 children (95%) were diagnosed with cCMV, while the remaining neonate had negative PCR-CMV in urine at birth. Eight out of the 19 fetuses (42.1%) showed CMV-related abnormalities in the fetal US before HIG treatment. Complete clinical assessment in the neonatal period and at 12 months of age was available in 16 and 15 children, respectively. At birth, 50% were symptomatic ([Table 4](#)) and at 12 months of age, 3/15 (20%) showed a hearing loss and neurologic impairment and one children (1/15; 6.7%) isolated mild hearing loss ([Table 4](#) and [Figure 1](#)).

All symptomatic children with CNS abnormalities and/or hearing loss at birth received antiviral treatment with ganciclovir or/and valganciclovir for at least 6 weeks and up to 6 months, according to cCMV national guidelines [12].

Discussion

We found no significant reduction in fetal infection rate with maternal HIG prophylactic administration (7/17; 41%), compared to that generally reported after maternal primary infection (40%) [2]. Three previous studies have analyzed the use of HIG for the prophylaxis of maternal-fetal CMV transmission [14]. In the prospective, nonrandomized study conducted by Nigro *et al*, HIG reduced the rate of fetal CMV infection from 40 to 16% compared to standard prenatal care [9]. Buxmann *et al*. reported a transmission rate of 23% in 39 pregnant women who received preventive HIG, including 5/24 infants (21%) from mothers with primary infection acquired before 12 weeks of gestation [10]. A randomized and controlled clinical trial comparing monthly infusions of HIG (100 units/kg) versus saline solution as placebo in 123 pregnant women with recent primary infection showed no significant differences in the transmission rate between HIG (18/61, 30%) and placebo groups (27/62, 44%) ($p = .13$) [11]. The long-term outcome of children whose mothers received prophylactic HIG in pregnancy has not been well established. In Revello's trial, long-term outcomes of children whose mothers received prophylactic HIG in pregnancy has not been published. In the study by Buxmann *et al*. all the congenitally-infected children born alive despite receiving prenatal prophylactic HIG were asymptomatic at birth and during follow-up (12–36 months after birth) [10]. In Nigro's study, no congenitally infected children after prophylactic HIG presented symptoms at birth, but data about long-term outcomes of those children are not available in the published work [9]. In our series, only one child (1/6; 16.7%) in the prevention group presented long-term sequelae at 12 months of age, and it was a mild unilateral hearing loss. However, there was one termination of pregnancy (TOP) with high viral load and thrombocytopenia in fetal blood indicating a high risk of long-term sequelae.

Data about the treatment of infected fetuses with intravenous HIG is scarce, and evidence is derived from small case series and nonrandomized studies

Table 4. Clinical characteristics, image findings and treatment information of fetuses and newborns included in the study, and type of sequelae at 12 months of age.

#	Groups	Gestational age at maternal infection (weeks)	FUS findings (before HIG)	Gestational age at first dose of HIG	Weeks from infection to HIG treatment	Number of HIG doses	Infected at birth	Symptoms at birth	Type of sequelae
1	PG	10	No	14	4	1	Yes	Mild unilateral hearing loss. Ventriculomegaly, calcifications, periventricular cysts	Yes, mild unilateral hearing loss (50 dB).
2	PG	20	No	28	8	2	Yes	No	None
3	PG	26	No	NA	NA	3	Yes	No	None
4	PG	14	No	15	1	2	Yes	No	None
5	PG	23	No	23	0	1	Yes	No	None
6	PG	31	No	34	3	1	Yes	No	None
7	PG	10	No	14	4	1	TOP	No	None
8	PG	NA	No	NA	NA	3	No	No	None
9	PG	26	No	28	2	3	No	No	None
10	PG	9	No	20	11	2	No	No	None
11	PG	27	No	27	7	3	No	No	None
12	PG	11	No	12	1	2	No	No	None
13	PG	8	Hyperechogenic bowel	12	4	2	No	No	None
14	PG	10	No	14	4	2	No	No	None
15	PG	27	No	27	0	3	No	No	None
16	PG	12	No	14	2	2	No	No	None
17	PG	22	No	26	4	1	No	No	None
18	TG	NA	White matter abnormalities, intracranial calcifications, cardiomegaly, hepatosplenomegaly, ventriculomegaly, periventricular cysts	35	NA	1	Yes	Petechiae, hepatosplenomegaly, unilateral hearing loss. US periventricular cysts and white matter abnormalities	Yes, mild unilateral hyperacusis (60 dB), normal development
19	TG	20	No	24	4	1	Yes	LBW, Fallot	None
20	TG	18	No	23	5	1	Yes	No	None
21	TG	20	Ventricular adhesions	26	6	2	Yes	Hepatosplenomegaly, profound hearing loss, hemiparesis. US: periventricular cyst, ventricular adhesions, porencephalia. MRI: ventriculomegaly, white matter abnormalities, cysts, migrational abnormalities.	Yes, bilateral severe hearing loss (cochlear implants) hemiparesia, epilepsy
22	TG	15	No	27	12	2	Yes	Mild bilateral hearing loss (45 dB). White matter abnormalities in MRI	None
23	TG	24	No	32	8	1	Yes	Germinolysis in cranial US, white matter abnormalities in MRI	None
24	TG	8	No	21	13	1	Yes	No	None
25	TG		No	30	NA	1	Yes	No	None
26	TG	30	Placentomegaly and hyperechogenic bowel	32	2	1	Yes	No	None

(continued)

Table 4. Continued

#	Groups	Gestational age at maternal infection (weeks)	FUS findings (before HIG)	Gestational age at first dose of HIG	Weeks from infection to HIG treatment	Number of HIG doses	Infected at birth	Symptoms at birth	Type of sequelae
27	TG	9	No	21	12	1	Yes	No	None
28	TG	NA	No	25	NA	1	Yes	No	None
29	TG	20	Hepatic calcifications	23	3	2	Yes	Microcephaly, petechiae, splenomegaly, hepatomegaly, motor impairment, jaundice, hearing loss. Calcifications in US and, periventricular cysts, white matter abnormalities and polymicrogyria in MRI	Yes, hearing loss, motor impairment, epilepsy, visual impairment.
30	TG	NA	Periventricular cysts, microcephaly, ventriculomegaly, ventricular adhesions, intracranial calcinations, abnormalities in white matter.	23	NA	1	Yes	Microcephaly, motor impairment hearing loss, splenomegaly and hepatomegaly jaundice. Calcifications and ventriculomegaly in US. MRI white matter abnormalities and polymicrogyria	Yes, hearing loss, microcephaly, motor impairment, epilepsy, visual impairment
31	TG	20	No	NA	NA	1	Yes	NA	NA
32	TG	8	Microcephaly, occipital cyst, cerebellar hypoplasia	23	15	2	Yes	Mild hypotonia. Periventricular cysts and white matter abnormalities in MRI	NA
33	TG	18	Ventriculomegaly	31	13	1	Yes	NA	NA
34	TG	22	No	27	5	1	Yes	No	None
35	TG	29	No	29	0	1	Yes	No	None
36	TG	14	Hyperechogenic bowel	19	5	1	No	No	None

PG: prevention group; TG: treatment group; NA: not available; MRI: magnetic resonance imaging; FUS: fetal ultrasounds; TOP: termination of pregnancy; HIG: cytomegalovirus specific hyperimmune globulin; preHIG: before first dose of CMV-HIG.

[14]. Placentas infected with CMV up-regulate vascular endothelial growth factor expression and viral replication is present in uterine and fetal blood vessels, villous cytotrophoblast progenitors and endothelial cells. There is an impairment in the remodeling of uterine arteries that leads to a decreased maternal blood flow and a hypoxia-like condition [15,16]. Placentas treated with HIG showed an increased number of chorionic villi and vasculature, improving maternal blood flow [15,16]. All these properties of the HIG could lead to better outcomes in infected fetuses.

In our study, 50% of infected newborns in the TG were symptomatic at birth, and 26.7% developed at

least one long-term sequela. In Nigro's study symptomatic cCMV infection at birth was much more frequent in nontreated fetuses than in treated ones ($p = .001$) [9]. In the study by Visentin *et al*, HIG treated children were less likely to develop long-term sequelae at 12 months of age (13 versus 43%; $p < .01$).

Studies about the natural history of cCMV outcomes based on routine CMV screening programs at birth were not comparable to our work, where median gestational age at fetal infection was 20 weeks and an important proportion of pregnancies were referred because of the presence of abnormalities in FUS. Data about long-term outcomes after CMV fetal infection

are limited because there is a high rate of TOP in the published studies. In one study performed by Revello *et al*, up to 63.5% of the pregnancies with a positive amniocentesis were terminated [17]. Enders *et al*. found cCMV in 57 fetuses and newborns among 189 pregnancies studied [18]. In this work, pregnant women were referred for similar reasons as in our study [18]. In 57 cases, fetal infection was confirmed. In 21 (38%) of those pregnancies TOP was performed, and all fetuses except two presented with FUS abnormalities before TOP. There were also 19 children who were symptomatic at birth (33%) and 14 (24.6%) asymptomatic and 3 stillbirths (5.7%). The rate of pregnancies with abnormalities in FUS before TOP, stillbirths or leading a symptomatic children at birth was 41/57 (72%) compared with 10/23 (43%) in our study (OR: 3.3; 95% CI: 1.2–9.1; $p = .02$). Besides, in Ender's study, 3/12 (25%) asymptomatic children presented long-term sequelae (hearing loss and/or statomotor retardation) during follow-up, compared with 0/11 in our work ($p = .17$).

FUS abnormalities detected during pregnancy have been reported as an important risk factor for long-term sequelae [18–20]. In Nigro's study, HIG administration led to a significant improvement or even a complete resolution of most FUS abnormalities [9]. However, in the study by Visentin *et al*. abnormal FUS predicted poor outcomes at the 1-year follow up. In this line, we have also observed that although some fetuses with extracerebral findings receiving HIG were asymptomatic at birth, this therapy did not improve prenatally existing CNS abnormalities, and all fetuses with abnormal CNS findings developed long-term sequelae.

HIG administration is well tolerated and not associated with any relevant adverse events. The RCT conducted by Revello *et al*. found a decrease in gestational age at birth in the treatment arm compared to placebo [11]. However, Nigro *et al*. found no association with either a diminished birth weight or a reduced duration of pregnancy [21]. In the present study, median gestational age at birth was 39 weeks and 5.6% were prematures, a similar rate to data in general population previously published in Spain [22].

There are several limitations to this work. This is a retrospective and nonrandomized study, and there is no control group. The lack of a national screening program could cause a selection bias. The exact time of maternal infection is difficult to establish in our cohort, a limitation which is shared with other studies, as it is only possible to know it approximately in those women with symptomatic infection or with a well-

estimated dated seroconversion, and even in these cases the infection could have occurred several weeks before the estimated time. In this study, a high overrepresentation of patients infected early in pregnancy could lead to a higher rate of symptomatic congenital infection. This study has been performed in a real clinical setting, with women referred from other centers or cities, and sometimes there is a delay from diagnosis to treatment. Although this possible delay in HIG administration could cause poorer results in fetal transmission rates or long-term outcomes, it is similar to what we could find in normal practice. In this study, we have a low rate of TOP comparing with other studies [8,9], even in cases with infected fetuses and abnormalities in the fetal US. This could be an important bias when results among different studies are compared.

In conclusion, prophylactic HIG administration in pregnant women after CMV primary infection seems not to reduce significantly the rate of congenital infection but is safe and it could have a favorable effect on the symptoms and sequelae of infected fetuses. The risk of long-term sequelae in fetuses without US abnormalities before HIG is low, so it could be an option in infected fetuses with normal imaging, if there is no termination of the pregnancy. On the other hand, the risk of sequelae among infected fetuses with abnormalities in FUS before HIG despite treatment is high.

Acknowledgements

Collaborators: D. Folgueira, P. Brañas, A. Perez-Rivilla, R. González, T. Cernuda. The authors thank Martin J. Smyth, BA, for his help in correcting the English, and R. González, T. Cernuda for their contribution in data collection.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was funded by project PI 16/00807, from the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness) and cofunded by the European Regional Development Fund, and approved by the Ethics Committee of our Institution. DB has a research grant of the Instituto de Investigacion Hospital12 de Octubre (i.12) number: AY11-2016.

ORCID

Daniel Blázquez-Gamero  <http://orcid.org/0000-0001-6483-8329>

References

- [1] Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, et al. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):86–102.
- [2] 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.
- [3] Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, W. B. Saunders; 2011.
- [4] Nigro G. Maternal-fetal cytomegalovirus infection: from diagnosis to therapy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22(2):169–174.
- [5] Enders G, Daiminger A, Bäder U, et al. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol.* 2011;52(3):244–246.
- [6] Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Zech F, et al. Human cytomegalovirus *in utero* transmission: follow-up of 524 maternal seroconversions. *J Clin Virol.* 2010;47(2):201–202.
- [7] Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, et al. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol.* 2006;35(2):216–220.
- [8] Visentin S, Manara R, Milanese L, et al. Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clin Infect Dis.* 2012;55(4):497–503.
- [9] Nigro G, Adler SP, La Torre R, et al. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005;353(13):1350–1362.
- [10] Buxmann H, Stackelberg OM, Schlöszer RL, et al. Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *J Perinat Med.* 2012;40(4):439–446.
- [11] Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N Engl J Med.* 2014;370(14):1316–1326.
- [12] Baquero-Artigao F. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr.* 2009;71(6):535–547.
- [13] Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al. Estudio transversal español de crecimiento 2008. parte II: valores de talla, peso e índice de masa corporal desde el nacimiento a la talla adulta. *An Pediatr.* 2008;68(6):552–569.
- [14] Jückstock J, Rothenburger M, Friese K, et al. Passive immunization against congenital cytomegalovirus infection: current state of knowledge. *Pharmacology.* 2015;95(5–6):209–217.
- [15] Maidji E, Nigro G, Tabata T, et al. Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1298–1310.
- [16] Pereira L, Petitt M, Tabata T. Cytomegalovirus infection and antibody protection of the developing placenta. *Clin Infect Dis.* 2013;57(Suppl 4):S174–S177.
- [17] Revello MG, Fabbri E, Furione M, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol.* 2011;50(4):303–307.
- [18] Enders G, Bäder U, Lindemann L, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001;21(5):362–377.
- [19] Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, et al. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 2008;41(3):192–197.
- [20] Benoist G, Salomon LJ, Mohlo M, et al. Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32(7):900–905.
- [21] Nigro G, Capretti I, Manganello AM, et al. Primary maternal cytomegalovirus infections during pregnancy: association of CMV hyperimmune globulin with gestational age at birth and birth weight. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(2):168–171.
- [22] Euro-Peristat. Euro-Peristat project with SCPE and Eurocat. European Perinatal Health Report. The health and care of pregnant women and babies in Europe in 2010; 2013.

**Anexo 2: Informe del Comité Ético de Investigación
Clínica del proyecto de investigación en salud FIS
PI16/00807 de Hospital 12 de Octubre.**

Nº CEI: 17/007

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Dña. **MARÍA UGALDE DÍEZ**, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación del **HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCE DE OCTUBRE**.

CERTIFICA:

Que este Comité en la reunión celebrada el día **17/01/2017** ha evaluado la propuesta del investigador para que se realice el proyecto de investigación con código **TP16/0120**, titulado:

ESTUDIO MULTICÉNTRICO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR T MATERNA Y NEONATAL EN LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios, este Comité **INFORMA FAVORABLEMENTE** a la realización de dicho proyecto.

El estudio será realizado por el Dr. **BLAZQUEZ GAMERO, Daniel** como Investigador Principal en el Servicio **PEDIATRIA** del Hospital Universitario Doce de Octubre.

Lo que firmo en Madrid, a **18 de Enero de 2017**



Hospital Universitario
12 de Octubre
Comunidad de Madrid
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
CON MEDICAMENTOS - CEIM

Firmado: **Dra. Maria Ugalde Diez**
Secretaria del CEI Hospital Universitario 12 de Octubre.

Anexo 3: Consentimiento informado del proyecto de investigación en salud FIS PI16/00807.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA GESTANTES SOBRE LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO CLÍNICO TITULADO "ESTUDIO MULTICÉNTRICO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR T MATERNA Y NEONATAL EN LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS (CYTRIC STUDY).

Investigador del centro

Investigador principal: Dr. Daniel Blázquez

Sección de Enfermedades Infecciosas Pediátricas. Hospital Universitario 12 de Octubre

Teléfono: 913908569

Yo (nombre y apellidos)

.....

con DNI.....

He leído y entendido la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con (nombre y apellidos del investigador que informa)

.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo abandonar el estudio en el momento que lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos que reciba.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:.....

Firma del paciente:

Teléfono de contacto:

Email:

HOJA DE INFORMACIÓN A PACIENTES (GESTANTE) SOBRE LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO CLÍNICO TITULADO "ESTUDIO MULTICÉNTRICO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR T MATERNA Y NEONATAL EN LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS (CYTRIC STUDY).

Investigador del centro:.....

Investigador principal: Dr. Daniel Blázquez

Sección de Enfermedades Infecciosas Pediátricas. Hospital Universitario 12 de Octubre

Teléfono: 913908569

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital 12 de Octubre. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.

¿QUÉ ES LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS?

El Citomegalovirus es un virus que puede infectar al feto durante la gestación. En España se estima que cada año nacen más de 1500 niños con esta infección, y entre 200 y 300 niños tendrán secuelas a largo plazo. Entre las principales secuelas se encuentran la sordera, las alteraciones neurológicas y los problemas en la visión.

¿CUÁL ES EL OBJETIVO DEL ESTUDIO?

Cuando se produce una infección por CMV durante la gestación existe riesgo de que esa infección se transmita al feto y que el recién nacido nazca infectado. En la actualidad es difícil predecir en que gestaciones se va a producir la infección fetal y si esa infección va a producir una infección sintomática al nacimiento. El objetivo de este estudio es evaluar el papel de la respuesta inmune en la gestante con infección por CMV y su posible asociación con el riesgo de infección del feto y de desarrollo de secuelas a largo plazo.

¿EN QUÉ CONSISTE EL ESTUDIO?

En este estudio participarán las gestantes con una infección, reactivación o reinfección por CMV en la gestación. Se estudiará el tipo de respuesta inmunológica en sangre de la madre y su relación con el riesgo de infección del feto y con la presencia de secuelas a los 12 y 24 meses de vida del niño.

¿QUÉ PRUEBAS ADICIONALES SE HARÁN A LAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO?

En las gestantes que participen en el estudio se tomará una muestra de sangre (5ml) para realizar el estudio inmunológico. El resto de las pruebas complementarias, seguimiento y manejo será el mismo que en las pacientes no participantes del estudio siguiendo las recomendaciones habituales.

ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO Y CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS

- **Participación voluntaria:**

La participación en el estudio es voluntaria, y se podrá retirar el consentimiento y abandonar el estudio en el momento que lo deseen

- **Beneficios y riesgos:**

BENEFICIOS: No existen beneficios directos para la paciente con su participación en el estudio. El principal beneficio de participar en este estudio consiste en mejorar el conocimiento sobre esta infección y sobre el papel de la respuesta inmune en el riesgo de transmitir la infección al feto y sobre el desarrollo de secuelas a largo plazo. Mediante la valoración de la respuesta inmune podríamos evaluar el riesgo de cada gestación de que se produzca la infección fetal y el riesgo de desarrollo de secuelas en el niño, por lo que se podría individualizar las decisiones diagnósticas y terapéuticas.

RIESGOS:

Los riesgos son los derivados a la obtención de sangre (dolor, hematoma en zona de punción). Se intentará recoger la sangre durante las analíticas rutinarias que se realicen durante el seguimiento de la gestante infectada. De no ser posible sería necesaria una extracción adicional de sangre, con los riesgos asociados que conlleva (dolor, hematoma en zona de punción). El resto de pruebas son las habituales que están recomendadas por las sociedades científicas en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

- **Confidencialidad de los datos**

Los investigadores participantes se comprometen al cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal y al Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007). Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código que no incluya información que pueda identificarle y solo los investigadores del estudio podrán relacionar dichos datos con usted y su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustará a lo dispuesto por la ley. El acceso a la información personal quedará restringido a los investigadores del estudio y al Comité de Ética de la investigación y personal autorizado cuando lo necesiten para comprobar los datos y procedimientos del estudio pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos. Los

datos se recogerán en un fichero de investigación del centro y se tratarán únicamente en el marco de su participación en este estudio. El paciente puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Si el paciente decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos pero si se utilizarán los que ya se hayan recogido.

CONSENTIMIENTO INFORMADO (NEONATOS) SOBRE LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO CLÍNICO TITULADO "ESTUDIO MULTICÉNTRICO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR T MATERNA Y NEONATAL EN LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS (CYTRIC STUDY).

Investigador del centro:

Investigador principal: Dr. Daniel Blázquez

Contacto: Sección de Enfermedades Infecciosas Pediátricas. Hospital Universitario 12 de Octubre

Teléfono: 913908569

Yo (nombre y apellidos).....

con DNI..... y en calidad de padre /madre /representante legal

del paciente

He leído y entendido la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con (nombre y apellidos del investigador que informa)

.....

Comprendo que la participación es voluntaria. Comprendo que es posible abandonar el estudio en el momento que lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos que reciba mi hijo/a

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:.....

Firma del padre/madre representante legal:

Teléfono de contacto:

Email:

HOJA DE INFORMACIÓN A PACIENTES (NEONATOS) SOBRE LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO CLÍNICO TITULADO “ESTUDIO MULTICÉNTRICO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR T MATERNA Y NEONATAL EN LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS (CYTRIC STUDY).

Investigador del centro:.....

Investigador principal: Dr. Daniel Blázquez

Sección de Enfermedades Infecciosas Pediátricas. Hospital Universitario 12 de Octubre

Teléfono: 913908569

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital 12 de Octubre. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.

¿QUÉ ES LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS?

El Citomegalovirus es un virus que puede infectar al feto durante la gestación. En España se estima que cada año nacen más de 1500 niños con esta infección, y entre 200 y 300 niños tendrán secuelas a largo plazo. Entre las principales secuelas se encuentran la sordera, las alteraciones neurológicas y los problemas en la visión.

¿CUÁL ES EL OBJETIVO DEL ESTUDIO?

Cuando se produce una infección por CMV durante la gestación existe riesgo de que esa infección se transmita al feto y que el recién nacido nazca infectado. En la actualidad no se puede predecir con exactitud que niños van a desarrollar secuelas en el futuro y cuáles no. Se cree que la inmunidad del neonato juega un papel fundamental en el riesgo de desarrollar secuelas a largo plazo. Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar el papel de la respuesta inmune en recién nacido para intentar predecir con más exactitud el pronóstico en los neonatos con infección congénita por citomegalovirus.

¿EN QUÉ CONSISTE EL ESTUDIO?

En este estudio participarán los recién nacidos con infección congénita por citomegalovirus. Se estudiará el tipo de respuesta inmunológica en sangre del recién nacido y su relación con la presencia de secuelas a los 12 y 24 meses de edad.

¿QUÉ PRUEBAS ADICIONALES SE HARÁN AL RECIÉN NACIDO SI SE CONFIRMA LA INFECCIÓN?

En los neonatos en los que se confirma que tienen una infección congénita por CMV se recomienda realizar la determinación de la carga viral en orina y/o saliva y en sangre y estudiar en sangre otros parámetros como el número de plaquetas o las transaminasas. Si el niño participa en el estudio se recogerán 1 ml adicional de sangre para realizar el estudio inmunológico. A los 12 y 24 meses de edad se realizará una valoración clínica del paciente mediante un test de desarrollo.

ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO Y CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS

- **Participación voluntaria:**

La participación en el estudio es voluntaria, y se podrá retirar el consentimiento y abandonar el estudio en el momento que lo deseen

- **Beneficios y riesgos:**

BENEFICIOS: No existen beneficios directos para el paciente con su participación en el estudio. El principal beneficio de participar en este estudio consiste en mejorar el conocimiento sobre esta infección y sobre el papel de la respuesta inmune en el pronóstico a largo plazo. Mediante la valoración de la respuesta inmune podríamos evaluar el riesgo de cada paciente para individualizar el tratamiento y seguimiento en estos niños.

RIESGOS:

Los riesgos son los derivados a la obtención de sangre (dolor, hematoma en zona de punción). Se intentará recoger la sangre durante la primera analítica que se hace en todos los niños con citomegalovirus congénito. De no ser posible sería necesaria una extracción adicional de sangre, con los riesgos asociados que conlleva (dolor, hematoma en zona de punción). El resto de pruebas son las habituales que están recomendadas por la Sociedad Española de Infectología Pediátrica en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

- **Confidencialidad de los datos**

Los investigadores participantes se comprometen al cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal y al Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007). Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código que no incluya información que pueda identificarle y solo los investigadores del estudio podrán relacionar dichos datos con usted y su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustará a lo dispuesto por la ley. El acceso a la información personal quedará restringido a los investigadores del estudio y al Comité de Ética de la investigación y personal autorizado cuando lo necesiten para comprobar los datos y

procedimientos del estudio pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos. Los datos se recogerán en un fichero de investigación del centro y se tratarán únicamente en el marco de su participación en este estudio. El paciente puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Si el paciente decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos pero si se utilizarán los que ya se hayan recogido.



MARÍA SORIANO RAMOS

Madrid, 2025