

Diagnóstico retrospectivo de infecção congénita por citomegalovírus numa coorte de crianças com hipoacusia neurosensorial

Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in a cohort of children with neurosensorial hearing impairment

Araújo-Martins J • Correia I • Monteiro L • Santos PB • Paixão P • Campos O • Vilarinho L • Almeida S • Marques T

RESUMO

Objectivos: Determinar a prevalência da infecção congénita por Citomegalovírus (CMV) como causa de hipoacusia infantil. **Métodos:** Realizou-se um estudo de coorte retrospectivo através da revisão de dados nos processos clínicos. Seleccionaram-se as crianças com hipoacusia neuro-sensorial bilateral moderada ou mais grave e que não tinham diagnóstico estabelecido. Os cartões de Guthrie armazenados num laboratório de referência nacional foram analisados com uma técnica baseada em extracção de ácido desoxirribonucleico (ADN) induzida por calor, seguida de pesquisa de ADN do CMV através de amplificação por polimerase chain reaction.

Araújo-Martins J

Interno de Otorrinolaringologia, Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital de São José, CHLC, EPE

Correia I

Interno de Otorrinolaringologia, Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital de São José, CHLC, EPE

Monteiro L

Directora de serviço, Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital Dona Estefânia, CHLC, EPE

Santos PB

Assistente hospitalar, Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital Dona Estefânia, CHLC, EPE

Paixão P

Professor auxiliar, Departamento de Microbiologia, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Campos O

Técnica de laboratório, Departamento de Microbiologia, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Vilarinho L

Instituto de Genética Jacinto de Magalhães

Almeida S

Centro Hospitalar da Cova da Beira

Marques T

Directora de departamento, Departamento de Microbiologia, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Correspondência:

José Araújo-Martins
Serviço de Otorrinolaringologia,
Hospital de São José,
Rua José António Serrano
1150-199 Lisboa
jmartinsmed@yahoo.com

Este artigo corresponde a uma comunicação oral apresentada no 59º Congresso Nacional da Sociedade Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial em Maio de 2012 (Viseu)

Resultados: Dos 83 cartões de Guthrie testados, 8 (9,6%) foram positivos. Na nossa coorte, 11 doentes têm infecção congénita por CMV confirmada, correspondendo a 8,1% dos casos com diagnóstico confirmado mas apenas 3,4% dos casos no global.

Conclusão: A infecção congénita por CMV é uma causa significativa de hipoacusia infantil na nossa população. O diagnóstico retrospectivo é possível com recurso aos cartões de Guthrie.

Palavras chave: Surdez infantil; infecção por citomegalovírus; cartões de Guthrie

ABSTRACT

Objectives: To determine the prevalence of congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of hearing impairment in children.

Methods: We conducted a retrospective cohort study based on patient clinical records. Children were selected if they had moderate (or worse) bilateral sensorineural hearing loss, with no established diagnosis. Data blood storage cards kept in a reference laboratory in Portugal were analyzed with a heat-induced deoxyribonucleic acid (DNA) extraction technique, followed by polymerase chain reaction to amplify CMV DNA.

Results: Of 83 tested cards, 8 (9,6%) were positive. In our cohort, eleven patients have confirmed congenital CMV infection, accounting for 8,1% of cases with an established diagnosis, but only 3,4% of cases overall.

Conclusion: Congenital CMV infection is a significant cause of hearing impairment in children from our study population. Retrospective diagnosis can be made through data blood storage cards analysis.

Keywords: Child deafness; cytomegalovirus infection; Guthrie cards

INTRODUÇÃO

A hipoacusia congénita é uma manifestação de várias doenças que tem uma prevalência estimada entre 1-3 crianças em cada 1000 nascidas em diferentes populações, incluindo a portuguesa¹. Cerca de metade dos casos de hipoacusia congénita relaciona-se com

alterações genéticas que podem seguir padrões de transmissão diferentes: 77% são autossómicas dominantes, 22% autossómicas recessivas e 1% são ligadas ao cromossoma X ou, numa fracção pequena dos casos, mitocondriais. Nas etiologias não genéticas inclui-se tradicionalmente as infecções congénitas por Citomegalovírus (CMV), rubéola, toxoplasmose ou sífilis e ainda a exposição a outros agentes teratogénicos (radiações ionizantes, medicamentos) ou alterações peri-natais (prematuridade, hipoxia intra-parto, kernicterus, exposição a agentes ototóxicos)². É importante estabelecer o diagnóstico definitivo da hipoacusia precocemente para prever a evolução clínica, evitar a exposição a agentes que a possam agravar, detectar precocemente co-morbilidades, permitir a intervenção terapêutica adequada e atempadamente e para fazer aconselhamento familiar³.

A infecção congénita por CMV tem sido associada a cerca de um quinto a um terço dos casos de hipoacusia neuro-sensorial infantil^{4,5}. A transmissão materno-infantil pode ter origem: intra-uterina, quando há viremia materna e passagem através da placenta; durante o parto; durante a amamentação. No período pós-natal, todos os indivíduos estão em risco de contágio por contacto com fluidos biológicos infectados (saliva, urina, fezes, esperma, secreções vaginais e sangue). A probabilidade de infecção congénita por CMV é maior no caso das primo-infecções maternas, durante o primeiro trimestre da gravidez e se os anticorpos maternos forem de baixa afinidade para o vírus (caso em que podem inclusivamente facilitar a transmissão placentária do vírus)⁶. A infecção congénita é possível mesmo em crianças cujas mães eram seropositivas para o CMV antes da gravidez, nos casos em que houve reactivação da infecção materna ou re-infecção com outros serotipos virais⁶. Este facto é ilustrado pela prevalência de infecção congénita por CMV numa população com quase 100% de seropositividade materna, que é comparável à de outras séries⁷. Após a viremia, o CMV infecta os tecidos ubiquamente, podendo persistir como infecção de proliferação lenta (as crianças com infecções congénitas podem excretar vírus nas secreções até aos 4 anos) ou latente, com reactivações futuras. Pode manifestar-se através de: hepatomegalia, esplenomegalia, petéquias, trombocitopenia, icterícia, coriorretinite, estrabismo, atrofia óptica, microcefalia, atraso mental, paralisia cerebral, epilepsia e hipoacusia, entre outras. O nosso trabalho foca-se na hipoacusia, que é a manifestação mais frequente e que se caracteriza por ser neuro-sensorial, bilateral ou unilateral⁵ e tende a ser de manifestação tardia (média de 33 meses para as crianças sintomáticas à nascença, 44 meses para as assintomáticas), flutuante e progressiva⁸. Os mecanismos responsáveis pela perda auditiva causada pelo CMV, ainda não estão completamente esclarecidos mas presume-se que envolvam alterações a dois níveis: no ouvido interno, com labirintite por passagem do

vírus através da estria vascular, infecção das estruturas endolinfáticas e hidrópsia coclear; no sistema nervoso central, por alteração da proliferação, diferenciação ou migração dos precursores neuronais ou citotoxicidade associada a inflamação glial⁶. Cerca de metade das crianças com infecção sintomática à nascença, e 10% das assintomáticas, desenvolverão futuramente algum grau de hipoacusia⁹. Sabemos que, idealmente, a reabilitação auditiva de crianças com hipoacusia congénita deve começar o mais precocemente possível para evitar as sequelas linguísticas, cognitivas e sociais que essa situação pode acarretar¹⁰. A apresentação tardia, flutuante e progressiva dificulta esta intervenção. As crianças assintomáticas frequentemente passam nos rastreios auditivos neonatais e não têm o diagnóstico da infecção. O diagnóstico tardio no período pós-natal através da detecção de ácido desoxirribonucleico (ADN) viral em amostras biológicas pode corresponder a uma infecção congénita de proliferação baixa, a uma primo-infecção ou mesmo a reactivação viral. Estima-se ainda que cerca de 40% das crianças de uma população ocidental sejam seropositivas para o CMV ao fim de um ano de idade⁶. Para ultrapassar as dificuldades de diagnóstico que estes casos representam, os estudos de prevalência da infecção congénita por CMV têm utilizado uma técnica validada que pesquisa ADN viral em amostras de sangue recolhidas nos cartões de Guthrie durante o “teste do pezinho”¹¹⁻¹³.

Com este estudo pretendemos determinar qual a prevalência de infecção congénita por CMV numa população pediátrica acompanhada na consulta de Reabilitação Auditiva do Hospital Dona Estefânia, e qual a proporção de casos que o diagnóstico retrospectivo identifica no grupo das crianças sem etiologia previamente estabelecida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram seleccionados sequencialmente todos os doentes observados na consulta de Reabilitação Auditiva, no segundo semestre de 2010, cujos responsáveis legais consentissem e quando nas crianças se cumprissem os seguintes critérios: presença de hipoacusia neuro-sensorial bilateral com limiares tonais iguais ou superiores a 40 dB; diagnóstico etiológico da hipoacusia desconhecido; sem história de pesquisa de infecção por CMV no período peri-natal; idade máxima de 8 anos.

A identificação dos doentes seleccionados foi enviada para o departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Nova de Lisboa que pediu ao Instituto de Genética Jacinto Magalhães para enviar os cartões de Guthrie respectivos (figura 1) para o seu laboratório.

No laboratório do Departamento de Microbiologia procedeu-se à pesquisa de ácido desoxirribonucleico (ADN) do CMV no sangue armazenado nos cartões de Guthrie. Para este fim, adaptou-se uma técnica já descrita na literatura por Barbi et al¹⁴. Em linhas gerais,

FIGURA 3

Proporção relativa de amostras com confirmação de infecção congénita pelo CMV através da identificação de ADN viral no sangue dos cartões de Guthrie

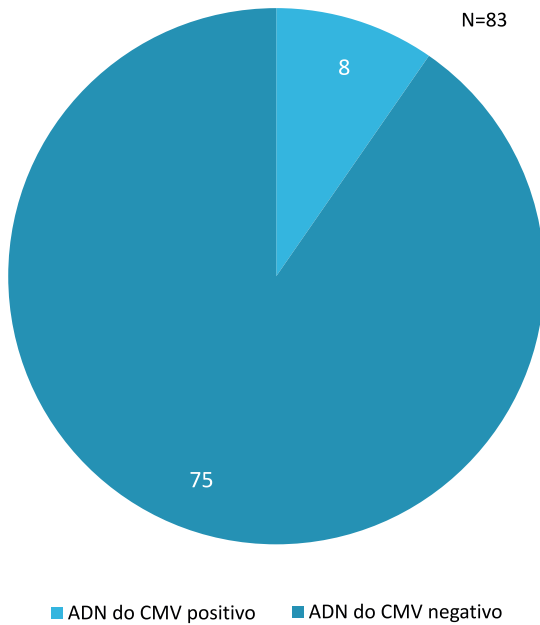


FIGURA 4

Fluxograma de selecção e exclusão de indivíduos do estudo

Fluxograma do estudo

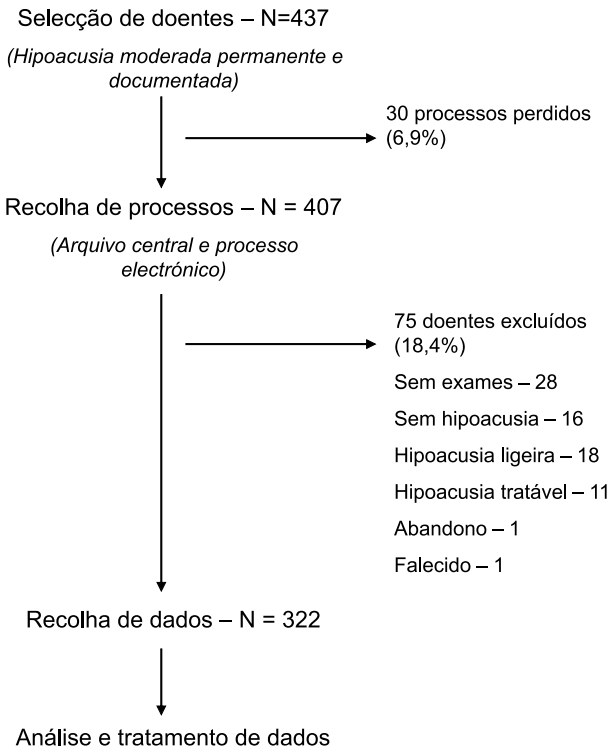


TABELA 1

Descrição base e audiológica da população

	CMV (n = 11)	Restante população (n = 311)
Sexo		
Feminino	2	163*
Masculino	9	148*
Perda auditiva		
Moderada	1	102*
Severa	2	111*
Profunda	8	98*
Hipoacusia progressiva		
Sim	3	17*
Não	8	150*
Ganho tonal médio (dB)	33,4 ± 26,5	32,3 ± 14,5φ
Ganho linguístico		
Sim	5	115φ
Não	3	57φ

Os dados apresentados são frequências absolutas ou média ± desvio-padrão.

O valor de significância assumido foi de $\alpha = 0,05$.

* - diferença estatisticamente significativa.

φ - diferença estatisticamente não significativa.

variadas e a sua proporção relativa pode ser consultada na tabela 2. No global, 3,4% dos doentes seguidos na nossa consulta têm infecção congénita por CMV confirmada.

TABELA 2

Diagnóstico etiológico da hipoacusia infantil

Diagnóstico	Frequência (N = 140)
Genética síndrómica	28 (20%)
Genética não síndrómica	31 (22%)
Neonatal	25 (18%)
Síndromes malformativos	18 (13%)
Infecções	
Infecção congénita por CMV	11 (8%)
Outras	22 (16%)
Outras causas	5 (3%)

Distribuição relativa de diagnósticos estabelecidos responsáveis pela hipoacusia das crianças seguidas na consulta de Reabilitação auditiva do HDE nascidas entre 1998 e 2011. Em 182 casos ainda não está estabelecido o diagnóstico. Nos gráficos estão representados os valores absolutos de cada categoria e a respectiva percentagem. As causas neonatais incluem a prematuridade, hipóxia intra-parto e internamento em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais. As causas malformativas incluem síndromes polimalformativos generalizados ou malformações do ouvido externo e do ouvido médio sem diagnóstico genético estabelecido. Outras infecções para além do CMV incluem a rubéola congénita, malária cerebral e meningite bacteriana ou tuberculosa. Sobram ainda alguns casos de kernicterus e exposição a ototóxicos.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da infecção congênita por CMV é importante para o seguimento dos doentes por múltiplos motivos. Em primeiro lugar, encontra-se bem estabelecido que a hipoacusia pode ser progressiva ao longo do tempo, e flutuante, em pelo menos metade dos indivíduos^{5,8}. Eventualmente, algumas crianças poderão normalizar os seus limiares auditivos, temporária ou definitivamente⁵. Estas características da doença implicam que se faça um acompanhamento regular das crianças afectadas, dado que os cuidados de reabilitação auditiva necessários (nomeadamente através de protetização) podem variar ao longo do tempo. Será preciso ter especial atenção às crianças com hipoacusia ligeira (que geralmente não produz sequelas cognitivas ou linguísticas), para não descuidar a sua vigilância regular. Está recomendado o estudo audiológico trimestral ou semestral durante os 3 primeiros anos de vida e depois anual até aos 6 anos em crianças afectadas¹⁵. Em segundo lugar, há sempre um envolvimento do sistema nervoso central, mesmo que inicialmente assintomático. Mesmo em crianças sem alterações neurológicas grosseiras, foram identificadas perturbações psicomotoras (dificuldades na linguagem, na coordenação visual-motora, na estabilidade emocional e adaptação ao ensino escolar) durante o primeiro ano de ensino primário¹⁶. É necessário estar alerta para estas alterações em crianças afectadas, para que se possa iniciar a habilitação necessária (por Psicologia, Terapia da Fala, Ensino especial, etc.) atempadamente. Para além destes aspectos, deve também seguir-se a criança anualmente em consulta de Pediatria/Desenvolvimento e rastrear-se a presença de cicatrizes retinianas pelo menos uma vez, em crianças assintomáticas, e anualmente, até aos 5 anos, em crianças sintomáticas¹⁵. Em terceiro lugar, está indicado o tratamento de crianças sintomáticas com infecção congénita pelo CMV¹⁵. A terapia com ganciclovir (endovenoso, 6 mg/kg, durante 6 semanas) deve ser iniciada preferencialmente no primeiro mês de vida e cuidadosamente vigiada (cerca de 2/3 dos doentes desenvolverão algum tipo de citopenia, sendo mais frequente a neutropénia). Em crianças sintomáticas, o ganciclovir é eficaz a tratar as manifestações agudas (pneumonite, hepatite...), a melhorar o cumprimento de metas de desenvolvimento somático⁴ e psicomotor¹⁷ e a estabilizar, ou mesmo reverter, a perda auditiva^{18,19}. As crianças sintomáticas são também as que têm maior risco de agravamento da hipoacusia. Não parece lícito medicar crianças assintomáticas com ganciclovir endovenoso, tendo em conta o seu perfil de efeitos adversos. A utilização de valganciclovir como formulação oral (16 mg/kg, 6 semanas) poderá vir a permitir a intervenção terapêutica em crianças assintomáticas¹⁵. Ainda não há estudos que comparem o valganciclovir directamente com o ganciclovir, mas já se demonstrou a eficácia da formulação oral no tratamento de crianças sintomáticas.

Por enquanto, não há evidências sólidas de que o tratamento de crianças assintomáticas seja igualmente eficaz, embora um estudo com uma população reduzida sugira esse benefício²⁰. A comparação entre estudos deve ser cautelosa porque nem sempre é utilizado o mesmo regime de tratamento e a definição de doença sintomática ainda não é consensual¹⁵. Há, pelo menos, 5 vacinas a ser testadas em ensaios clínicos²¹. Actualmente, a intervenção mais efectiva que se pode propor para evitar a infecção congénita por CMV é a adopção de cuidados higieno-dietéticos pelas mulheres grávidas. A necessidade de acompanhamento da evolução clínica das crianças, a possibilidade de as reabilitar, ou mesmo de as tratar com ganciclovir, e a prevalência da doença na população, têm levado vários autores a propor o desenvolvimento de programas de rastreio da infecção congénita por CMV, eventualmente associados aos rastreios auditivos neonatais⁹.

A utilização de cartões de Guthrie encontra-se bem estabelecida para o diagnóstico de doenças metabólicas (fenilcetonúria e hipotiroidismo congénitos). É uma técnica que tem também sido utilizada com bom rendimento e baixo custo para executar estudos retrospectivos de larga escala e estudos prospectivos aplicados à virologia²². É particularmente útil em contextos com baixos recursos e onde não há equipamento ou condições de armazenamento de amostras. A sua utilização deve ser dirigida a um objectivo bem definido, dadas as implicações éticas associadas ao armazenamento de amostras biológicas. Uma meta-análise de estudos de prevalência de infecção congénita por CMV, por utilização de diferentes técnicas, estima que a sua média seja cerca de 0,64%²³. Já se utilizou o método de diagnóstico retrospectivo com cartões de Guthrie em várias populações, tendo-se obtido resultados semelhantes: os valores variam entre os 0,14% e 0,68%¹¹⁻¹³. Recentemente, um estudo prospectivo de larga escala debruçou-se sobre a utilidade dos cartões de Guthrie para o diagnóstico desta infecção²⁴. Embora a sensibilidade tenha sido muito baixa (34,4%), a especificidade foi de, praticamente, 100%. Os valores obtidos para a sensibilidade contrastam com os que haviam sido previamente publicados¹⁵. Esta diferença poderá dever-se a uma proporção de casos sintomáticos maior nos estudos com sensibilidade superior, porque nestas crianças a viremia é bastante superior²². Assumindo que a viremia influencia o resultado no cartão de Guthrie, os falsos negativos poderiam corresponder a indivíduos infectados, mas com menor risco de desenvolver sequelas. Outro factor que diminui a sensibilidade é a qualidade de conservação dos cartões. Está descrito que é possível obter resultados fiáveis com cartões armazenados há mais de 10 anos²², mas a nossa experiência sugere que a partir dos 8 anos já não é possível obter resultados fiáveis com os cartões. Foi por este motivo que limitámos a idade dos nossos

doentes para inclusão no estudo àquele valor. Com a sensibilidade referida, este método é inviável para ser aplicado como técnica de rastreio universal. Contudo, os valores de especificidade são constantes entre diferentes estudos. Alguns investigadores do nosso grupo publicaram previamente dados referentes à prevalência de infecção congénita por CMV em Portugal¹². O valor médio estimado foi de 1,05%, o que é bastante superior aos valores vulgarmente reportados. Dado que a especificidade do método elimina, quase na totalidade, os falsos positivos, parece seguro afirmar que a prevalência desta infecção em Portugal é superior à de outros países ocidentais.

As crianças com hipoacusia ligeira foram excluídas, porque na nossa consulta de Reabilitação Auditiva são acompanhadas selectivamente aquelas cuja perda auditiva acarreta maior risco de perturbações da fala ou cognitivas. Os dados obtidos são compatíveis com os da literatura em relação à distribuição das causas etiológicas da hipoacusia.

As proporções de hipoacusia mais grave e de hipoacusia progressiva são maiores no grupo com infecção congénita por CMV, como previsto. Os dados do CMV não são comparáveis com os da literatura porque não determinámos a taxa de infecção congénita por CMV, nem a proporção de doentes que desenvolveram hipoacusia. O estudo foi retrospectivo, partindo da hipoacusia para o CMV. Deve acautelar-se que os dados se referem à população da nossa consulta, não sendo generalizáveis para todo o país. Contudo, parece-nos razoável concluir que o diagnóstico retrospectivo da infecção congénita por CMV numa população de crianças portuguesas com hipoacusia moderada, severa ou profunda terá uma boa rentabilidade, permitindo esclarecer qual é o diagnóstico etiológico em cerca de 10% dos indivíduos.

Este estudo foi útil porque nos permitiu caracterizar a nossa população relativamente à infecção por CMV, estabelecer o diagnóstico etiológico em 8 crianças (3 já haviam sido referenciadas a partir da Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais com o diagnóstico) e ainda construir uma lista de doentes, sem diagnóstico estabelecido, elegíveis para a pesquisa de ADN do CMV em cartões de Guthrie. À data deste estudo, encontra-se pendente o resultado da análise de 10 cartões, que foi pedida ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas. Embora tenhamos seleccionado as crianças que são seguidas na consulta de Reabilitação Auditiva (com hipoacusia moderada, severa ou profunda) para efeitos do estudo populacional, estamos a considerar alargar a pesquisa desta infecção às crianças com hipoacusia neuro-sensorial ligeira, dado que a doença é progressiva, flutuante, e parece ser mais prevalente em Portugal do que noutros países europeus.

CONCLUSÃO

A infecção congénita por CMV é uma causa significativa de hipoacusia neuro-sensorial na população pediátrica e pode passar despercebida nos rastreios auditivos neonatais, por ser de apresentação tardia e flutuante. O diagnóstico retrospectivo é possível através da pesquisa de ADN do CMV em sangue armazenado em cartões de Guthrie. Esta possibilidade deve ser tida em conta em face da necessidade de esclarecer o diagnóstico de uma hipoacusia infantil de apresentação tardia e na eventualidade de a criança vir a beneficiar de tratamento com ganciclovir.

Agradecimentos

O estudo de diagnóstico retrospectivo de infecção por CMV foi patrocinado pela associação de solidariedade social Coração Delta, a quem agradecemos o apoio prestado.

Referências bibliográficas

1. Vaz R, Spratley J, Silva JS, Falcão A, et al. Rastreio auditivo neonatal universal no Hospital de S. João: resultados dos primeiros 12 meses. *Rev Portuguesa ORL*. 2010;48(4):207-10.
2. De S, Archbold S, Clarke R. Investigation and Management of the Deaf Child. In: Gleeson M, Clarke R, editors. *Scott Brown's Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*. London, UK: Edward Arnold Ltd; 2008.
3. Matsunaga T. Value of genetic testing in the otological approach for sensorineural hearing loss. *Keio J Med*. 2009;58(4):216-22. Epub 2009/12/29.
4. Nassetta L, Kimberlin D, Whitley R. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic strategies. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(5):862-7. Epub 2009/03/17.
5. Foulon I, Naessens A, Faron G, Foulon W, et al. Hearing thresholds in children with a congenital CMV infection: A prospective study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012. Epub 2012/03/06.
6. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):99-126, Table of Contents. Epub 2009/01/13.
7. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Isaac Mdel, Amaral FR, et al. Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(12):1043-6. Epub 2011/08/05.
8. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol*. 2006;35(2):226-31. Epub 2006/01/03.
9. Lazzarotto T, Lanari M. Why is cytomegalovirus the most frequent cause of congenital infection? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(10):841-3. Epub 2011/10/07.
10. Vohr B, Topol D, Girard N, St Pierre L, et al. Language outcomes and service provision of preschool children with congenital hearing loss. *Early Hum Dev*. 2012. Epub 2012/01/24.
11. Paradiz KR, Seme K, Puklavec E, Paro-Panjan D, et al. Prevalence of congenital cytomegalovirus infection in Slovenia: a study on 2,841 newborns. *J Med Virol*. 2012;84(1):109-15. Epub 2011/10/27.
12. Paixao P, Almeida S, Gouveia P, Vilarinho L, et al. Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Euro Surveill*. 2009;14(9):13-5. Epub 2009/03/26.
13. Noyola DE, Matienzo-Serment L, Rodriguez-Vidal SO, Ochoa-Perez UR, et al. [Congenital cytomegalovirus infection in newborn infants from the state of San Luis Potosi, Mexico]. *Salud Publica Mex*. 2011;53(6):513-5. Epub 2012/01/28. Infeccion congenita por citomegalovirus en recién nacidos del estado de San Luis Potosi, Mexico.
14. Barbi M, Binda S, Primache V, Caroppo S, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol*. 2000;17(3):159-65. Epub 2000/09/21.
15. Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, et al. Evidence based

- management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Hum Dev.* 2011;87(11):723-8. Epub 2011/10/04.
- 16.Milewska-Bobula B, Zebrowska J, Olszaniecka M, Pijanowska S, et al. Evaluation of intellectual development of children following congenital, mildly symptomatic cytomegalovirus (CMV) infection. A prospective study. *Med Wieku Rozwoj.* 2010;14(4):370-3. Epub 2011/04/05.
- 17.Oliver SE, Cloud GA, Sanchez PJ, Demmler GJ, et al. Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system. *J Clin Virol.* 2009;46 Suppl 4:S22-6. Epub 2009/09/22.
- 18.Shin JJ, Keamy DG, Jr., Steinberg EA. Medical and surgical interventions for hearing loss associated with congenital cytomegalovirus: a systematic review. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;144(5):662-75. Epub 2011/04/16.
- 19.Royackers L, Christian D, Frans D, Ermelinde R. Hearing status in children with congenital cytomegalovirus: up-to-6-years audiological follow-up. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75(3):376-82. Epub 2011/01/18.
- 20.Lackner A, Acham A, Alborn T, Moser M, et al. Effect on hearing of ganciclovir therapy for asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: four to 10 year follow up. *J Laryngol Otol.* 2009;123(4):391-6. Epub 2008/07/01.
- 21.Bernstein DI. Vaccines for Cytomegalovirus. *Infect Disord Drug Targets.* 2011. Epub 2011/08/11.
- 22.Snijdewind IJ, van Kampen JJ, Fraaij PL, van der Ende ME, et al. Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Res.* 2012;93(3):309-21. Epub 2012/01/17.
- 23.Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(4):253-76. Epub 2007/06/21.
- 24.Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 2010;303(14):1375-82. Epub 2010/04/15.