

Artículo original

Anticuerpos anti-citomegalovirus en sangre del cordón umbilical de recién nacidos

Gerardo Godoy^{a,*}, Julio Espinoza^b, Isabel Hernández de Cuesta^a, Rodolfo Devera^a

^aDepartamento de Parasitología y Microbiología

^bDepartamento de Obstetricia y Ginecología

Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo Bolívar

Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar

Estado Bolívar - Venezuela

Recibido 23 de enero de 2007; aceptado 25 de mayo de 2007

Resumen: Se investigó la presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-citomegalovirus (CMV), en el suero de muestras de sangre tomadas del cordón umbilical de recién nacidos, mediante técnica inmunoenzimática de uso comercial, cuantificando la concentración de IgG anti-CMV demostrada, comparando su densidad óptica, con las de muestras testigo positivo de 0, 0,4, 1,0, 4,0 y 10 UI/ml. La demostración de IgM anti-CMV, se hizo luego de determinar la densidad óptica de corte de la prueba, por encima de la cual los valores encontrados indicarían la presencia de IgM anti-CMV en la muestra. En 196 (96,0 %), de 204 muestras analizadas, se demostró IgG anti-CMV, pero, en contraste con lo anterior, todas las muestras fueron negativas para IgM anti-CMV. La presencia de IgG anti-CMV en las muestras, en ausencia de IgM anti-CMV, sugiere que esta inmunoglobulina provino de las madres. De ser esto así, el porcentaje de seropositividad materna para IgG anti-CMV, estaría indicando un elevado índice de endemicidad de la infección en mujeres adultas del área.

Palabras clave: Citomegalovirus, anticuerpos anti-citomegalovirus, IgG anti-citomegalovirus, citomegalovirus en recién nacidos

Anti-cytomegalovirus antibodies in umbilical cord blood of newborns

Abstract: Presence of IgG and IgM anti-cytomegalovirus (CMV) antibodies in the serum of blood samples taken from umbilical cord of newborns was investigated with a commercial immuno-enzymatic technique, quantifying the IgG concentration found by comparing its optical density with that of positive control samples containing 0, 0.4, 1.0, 4.0 and 10 IU/ml. Anti-CMV IgM was demonstrated after determining the cut-off optical density for anti-CMV IgM of the test, over which all values found would indicate anti-CMV IgM presence in the sample. Anti CMV IgG was demonstrated in 196 of 204 (96.0%) of the samples studied but, in contrast, all the samples were negative for anti-CMV IgM. Anti-CMV IgG presence and anti-CMV IgM absence in the samples suggests that this immunoglobulin came from the mothers. If this is so, the percentage of maternal anti-CMV IgG serum positivity would be indicating a high index of endemicity for this infection in adult women of the area.

Keywords: Cytomegalovirus, anti-cytomegalovirus antibodies, anti-cytomegalovirus IgG, cytomegalovirus in new borns

* Correspondencia:

Email: godorey@cantv.net

Introducción

Las infecciones por citomegalovirus (CMV), como sucede con los virus de la familia *Herpesviridae* [1], evolucionan lentamente y persisten en forma crónica, sin producir en el huésped, la mayoría de las veces, manifestaciones

clínicas apreciables [2]. La transmisión del virus a personas sanas se da por contacto directo con individuos infectados, por transfusión de sangre contaminada, durante el embarazo o al nacer de madres infectadas, durante la lactancia, y por trasplante de tejidos [2-5]. La infección, endémica a nivel mundial, alcanza altos niveles de endemicidad en

países y poblaciones que viven en hacinamiento y saneamiento ambiental deficiente [1]. En la mujer, la infección primaria puede ocurrir antes del embarazo o durante el mismo, con posibilidad de infectar al feto, inducir abortos, partos prematuros, mortinatos, niños con malformaciones congénitas, lesiones oculares, desarrollo intelectual posterior deficiente, etc [4,6,7]. Las infecciones primarias y exacerbaciones de infecciones crónicas adquieren especial importancia en individuos objeto de trasplante de órganos, en inmunodeficientes y en infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [2,8,9]. Un estudio realizado en personas infectadas por el VIH [10], demostró que un alto porcentaje tenían anticuerpos IgM anti-CMV, y que el 38,9% sufrían coinfecciones con CMV y virus Epstein-Barr.

Además del aislamiento del virus, las infecciones se pueden demostrar utilizando varios métodos [1,2,11], entre los cuales se encuentran los serológicos y los de biología molecular [12-16], habiéndose demostrado que los serológicos, tienen gran aplicación clínica práctica en el diagnóstico de infecciones primarias, crónicas y de exacerbaciones.

La información epidemiológica sobre la infección por CMV es importante, y con ese propósito se han realizado estudios en varios países. En Costa Rica, por ejemplo, la seroprevalencia de la infección es de un 95% en la población adulta [17]. En el municipio de Sao Paulo, Brasil, se demostró que el 92,7% de los niños, en los primeros 3 meses de vida se convertían en seropositivos para CMV [18]. En Ecuador, aun cuando la seropositividad de la mujer adulta es alta [19], el 90% de recién nacidos infectados, estudiados en un centro hospitalario de ese país, fueron asintomáticos.

La falta de información, sobre este proceso infeccioso en la región, determinó la presente investigación prospectiva de anticuerpos anti-CMV en sangre del cordón umbilical de niños recién nacidos de partos normales, atendidos en el hospital universitario de la ciudad, con el propósito de, 1) investigar la presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-CMV en recién nacidos de madres con embarazo a término, 2) registrar cualitativa y cuantitativamente, los niveles de anticuerpos demostrados, y 3) iniciar, con los resultados obtenidos, la elaboración de una base de datos sobre la infección en recién nacidos e indirectamente en las madres, base de datos que podrá ampliarse en estudios posteriores, al analizar un mayor número de individuos de varios sectores de la población.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron muestras de sangre, tomadas al azar del cordón umbilical de recién nacidos de partos normales a término, durante el período comprendido entre Julio y Diciembre del año 2006. Las muestras se colectaron en tubos estériles adecuadamente identificados con número correlativo, fecha y número del expediente clínico de la madre, a quien previamente se le informó del proyecto, procediendo a la recolección de las muestras cuando estas otorgaron el consentimiento respectivo. Cada muestra se

conservó a temperatura ambiente y fue procesada, para la separación del suero, dentro de las siguientes 6 horas. Una vez separado el suero, éste se distribuyó en tres viales, en volúmenes de 0,2 ml cada uno, e identificados con el número correspondiente se guardó a -20°C , hasta su uso posterior, descartando todas aquellas que presentaron algún grado de hemólisis. La determinación de anticuerpos IgG anti-CMV se realizó a grupos de muestras de suero, entre 16 y 32 por sesión, incluyendo blanco y controles negativo y positivo. Como controles negativo y positivos se utilizaron muestras testigos proporcionadas por Eti-Citok-G Plus, Laboratorios DiAsorin (Vercelli, Italia). La cuantificación de IgG anti-CMV, se hizo comparando los valores de densidad óptica encontrados a cada muestra, con los registrados a las muestras control, de concentraciones conocidas de 0; 0,4; 1,0; 4,0 y de 10 Unidades Internacionales por mililitro de suero (UI/ml) de IgG anti-CMV, proporcionados por la casa comercial. En general, el procedimiento consistió en agregar a pocitos de microplacas, con antígeno de CMV fijado en su superficie interna, 100 μl de una dilución 1:101 de cada muestra de suero. En forma similar, a cinco pocitos adicionales se les agregaron 100 μl de las muestras control negativo y controles positivos. Las tiras de pocitos en uso se cubrieron para evitar la evaporación y se incubaron a 37°C durante 60 minutos, después de lo cual se lavaron con solución salina tamponada (SST). Una vez removido por aspiración el líquido del último lavado, a cada pocito se le agregaron 100 μl de una solución de IgG monoclonal de ratón anti-IgG humana, conjugada con enzima peroxidasa y se incubaron a 37°C por otros 60 minutos, al final de los cuales se lavaron nuevamente. Para demostrar la peroxidasa que pudo ser capturada en cada pocito, de las muestras control y problema, se agregaron a cada uno 100 μl de una solución reveladora proporcionada por la casa comercial, se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos, al final de los cuales se paró la reacción enzimática agregando a cada pocito, 200 μl de una solución de ácido sulfúrico 0.4 N. La densidad óptica (DO) del volumen final de cada pocito, incluyendo el blanco, se hizo en espectrofotómetro automatizado realizando lecturas a longitudes de onda de 450 y de 630 nm. Cuando los sueros registraron valores mayores a los obtenidos con el control positivo de 0.4 UI/ml de IgG, la prueba se consideró cualitativamente positiva. Para determinar cuantitativamente la concentración de IgG anti-CMV de las muestras positivas, sus valores de DO se compararon con los de la curva graficada con los valores de las muestras testigo negativo y positivos de 0,4, 1,0, 4,0, y 10 UI/ml de IgG, en cada sesión ejecutada.

La investigación de IgM anti-CMV, se hizo por el procedimiento Eti-Citok-M reverse Plus, según técnica también estandarizada por los Laboratorios DiAsorin (Vercelli, Italia). Una vez definido el número de muestras a procesar, se seleccionaron de la microplaca comercial, los pocitos sensibilizados con IgG monoclonal de ratón anti-IgM humana, dejando uno como blanco, pocitos individuales para las muestras control negativo, positivo y duplicados para la muestra control de corte, cuya absorbancia determinó el valor de DO de corte para la prueba, por

encima de la cual los valores que se demostraran, indicarán positividad para IgM anti-CMV. Con excepción del primer pocito seleccionado como blanco del substrato, a todos los demás se les agregó 100 µl de controles negativo, positivo, control de corte y de muestras de suero (previamente diluida 1:101 en solución salina tamponada). Las tiras de pocitos, protegidas para evitar evaporación de las muestras, se incubaron a 37°C durante 60 minutos, al final de los cuales se lavaron con SST, removiendo con cuidado el exceso de humedad. Cumplido este paso se agregaron a todos los pocitos, menos al blanco, 100 µl de una solución de IgG monoclonal de ratón conjugada con la enzima peroxidasa, solución a la cual se mezcló una suspensión conocida de CMV inactivado, mantenido en forma liofilizada hasta el momento de la prueba. Protegiendo los pocitos, para evitar su evaporación, se incubaron nuevamente durante 60 minutos a 37°C y luego se lavaron, como en el paso anterior. Concluido esto, se agregó a todos los pocitos 100 µl de solución substrato de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se paró la reacción mediante la adición, a cada pocito, de 200 µl de ácido sulfúrico 0.4 N. Las muestras de suero cuyos valores de DO fueron inferiores al determinado como valor de corte, se consideraron negativas. Resultados dudosos, por registrar cifras en un rango 10%, por encima o por debajo del valor de corte, se repitieron y cuando los resultados continuaron dudosos, la prueba se consideró negativa.

Resultados

La presencia de IgG e IgM anti-CMV, se investigó a 204 muestras de suero, luego de descartar aquellas que presentaron hemólisis, grumos o precipitados al momento del análisis. En 196 de ellas, se demostró la presencia de anticuerpos IgG anti-CMV, número que representa el 96,0 % de las 204 muestras analizadas. La positividad de la reacción inmunoenzimática se definió por la demostración, en las muestras de suero problema, de valores de DO mayores al obtenido con el control positivo de 0,4 UI/ml de IgG anti-CMV, que definió el límite de corte que separó los resultados positivos de los negativos de la prueba, de acuerdo a la estandarización del sistema comercial utilizado.

La concentración de IgG anti-CMV se pudo cuantificar a 186 de las muestras de suero positivas para IgG anti-CMV, comparándolos con los demostrados a las muestras testigo. El análisis comparativo de los valores de absorbancia de cada muestra, con los registrados a las muestras control en cada sesión, permitió la cuantificación y demostrar que 5 (2,6%) de las muestras contenían concentraciones de IgG anti-CMV que variaron entre 0,4 y 1,0 UI/ml, 48 (25,8%) contenían concentraciones de IgG entre 1 y 4 UI/ml, 102 (54,8%) de las 186, tenían concentraciones entre 4 y 10 UI/ml, y 31 (16,6%), concentraciones superiores a las 10 UI/ml de IgG anti-CMV.

En contraste con el elevado porcentaje (96%) de muestras positivas a IgG anti-CMV, el 100% de las 204 mues-

tras de suero analizadas resultaron negativas para anticuerpos IgM anti-CMV.

Discusión

La infección por CMV ha sido motivo de estudio en diferentes grupos humanos, en especial en mujeres durante el embarazo y en niños [20,21,22], con el propósito de conocer su prevalencia en el sector, mejorar el diagnóstico de infecciones activas [23], investigar las infecciones congénitas y cuantificar los riesgos de infección del recién nacido. Un estudio realizado en Cuernavaca, México [24], sobre la prevalencia de CMG en mujeres de edad reproductiva, encontró que el 91,6% eran positivas para IgG anti-CMV, y que tal seropositividad varió muy poco después de los 14 años de edad, indicando que la infección la adquirieron tempranamente en la vida. En Chile, el 93,5% de mujeres embarazadas [25], fueron serológicamente positivas para CMV, y otro estudio realizado en el mismo país [26], en un número importante de recién nacidos encontraron un 1,8% positivos para IgM anti-CMV. En Venezuela, la investigación serológica de CMV en un pequeño número de mujeres embarazadas [27], demostró un 91,6% de positividad para IgG anti-CMV, y entre ellas, a un 13,1% con anticuerpos IgM anti-CMV, que sugirió, en estos casos, infección reciente o reactivación de una infección crónica. De estas madres IgM anti CMV positivas, nacieron 3 niños con IgM anti-CMV y manifestaciones clínicas que indicaba infección adquirida *in útero*.

La presencia de inmunoglobulina IgG anti-CMV, en sangre del cordón umbilical de recién nacidos, en ausencia de IgM anti-CMV en la misma muestra, se interpreta como de origen materno y no del feto [28], ya que, cuando ocurre infección fetal, este sintetiza anticuerpos IgM contra el virus, además de sintetizar anticuerpos IgG contra el mismo virus [29].

La infección materna siempre ha sido motivo de investigación, tanto en su forma primaria como en la crónica [21,30], estimándose que entre el 0,5 hasta el 2,5 % de las veces, madres embarazadas con infecciones crónicas por CMV, son capaces de transmitirla al feto, cifra que puede aumentar cuando las madres sufren primoinfección, reactivación de la infección o viremia demostrable durante el embarazo [3,20,31]. En el primer caso, los niveles de inmunidad celular y humoral, alcanzados por la madre, y la barrera placentaria, logran proteger al feto, en la mayoría de los casos. En el segundo, la falta de inmunidad o como consecuencia de una inmunidad deficiente, no logran impedir que la viremia alcance al feto, en un número variable de oportunidades [4,6,15,29,32].

Lo anterior, permite interpretar que las inmunoglobulinas demostradas en el 96,0 % de las muestras analizadas en el presente trabajo, proceden de las madres y no fueron sintetizadas por los fetos. La ausencia de infección activa en los recién nacidos se explica por la falta de anticuerpos IgM anti-CMV en las muestras de sangre estudiadas [3,13]. La presencia de inmunoglobulina (IgG) materna en la sangre de los recién nacidos se debió a que ellas, en ese elevado porcentaje, se infectaron con el virus en algún

momento anterior al embarazo [31], lo que les permitió desarrollar niveles adecuados de inmunidad celular y humoral, la cual, además de pasarle IgG hiperinmune al feto, los protegió.

De pertenecer a las madres la inmunoglobulina demostrada en la sangre del cordón umbilical de los recién nacidos, como parece ser el caso, el hecho de que el 96,0 % de ellas sean portadoras de anticuerpos IgG anti-CMV, indica que la infección en este grupo humano, alcanza un alto índice de endemidad en la comunidad. La protección de los recién nacidos de este grupo de madres, podría explicarse por el nivel de anticuerpos IgG anti-CMV demostrados cuantitativamente, en las muestras de sangre del cordón umbilical, que en más del 71% alcanzaron cifras superiores a las 4 UI/ml, una concentración importante de anticuerpos específicos contra CMV transmitidos a los fetos, los cuales de alguna manera participaron en su protección, evitando el desarrollo de la infección intrauterina.

En el presente estudio no se demostró IgM anti-CMV en los recién nacidos, posiblemente debido a que la frecuencia de la infección en ellos debe ocurrir en menos del 0,5 % de los casos, ya que en las 204 muestras de sangre analizadas, no se encontró uno solo. La investigación se debe profundizar, en estudios posteriores, para ampliar la información, dilucidar la prevalencia y características locales y regionales de la infección por CMV, en recién nacidos y en diferentes grupos humanos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Proyecto CI-2-0407-1115/2.

Referencias

- Hodinka RL. Human cytomegalovirus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology (8th Ed), ASM Press. Washington DC. USA. 2003. pp. 1304-18.
- Griffiths PD, Clyve Emery M. Cytomegalovirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, Clinical Virology. 2^a Ed. ASM Press. Washington, DC. USA. 2002. pp 443-61.
- Griffiths PD, Stagno S, Pass RS, Smith RJ, Alford CAJ. Congenital cytomegalovirus infection: diagnostic and prognostic significance of detection of specific immunoglobulin M antibodies in cord serum. *Pediatric* 1982; 69: 544-9.
- Griffiths PD, Baboonian C. A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynecol* 1984; 91: 307-15.
- Winston DJ, Huang ES, Miller MJ, Lin CH, Ho WG, Gale RP, Champlin RE. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1985; 102: 16-20.
- Conboy TJ, Pass RF, Stagno S, Alford CA, Myers GJ, Britt WJ, Summer MN, McFarland CE, Boll TJ. Early clinical manifestations and intellectual outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 1987; 111: 343-48.
- Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.* 1990; 12 (suppl): 745-53.
- Alvarez M, Marrero M, Soler M, Puig L, Moreno D, Reyes L, Castillo A. Diagnóstico rápido de citomegalovirus (CMV) en pacientes inmunocomprometidos mediante anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas precoces virales. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 1989; 84: 265-8.
- Wolf DG, Spector SA. Diagnosis of human cytomegalovirus in central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Inf Dis* 1992; 166: 1412-5.
- Carrero Castillo Y, Maváres A, Callejas D, Porto L, Araujo M, Atencio R, Monsalve F, y col. Coinfección Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en pacientes atendidos en el laboratorio regional de referencia virológica. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. 1999-2004. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VII Congreso Venezolano de Infectología y II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual. Caracas, Venezuela. 15-18 de Mayo, 2005. <http://caibco.ucv.ve>.
- Boeckh M, Biovin G. Quantitation of cytomegalovirus methodologic aspects and clinical application. *Clin Microbiol Rev* 1994; 11: 533-54.
- Beckwith DG, Halstead DC, Alpaugh K, Schweder A, Blount-Fronefield DA, Toth K. Comparison of a latex agglutination test with five other methods for determining the presence of antibody against cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 328-31.
- McHugh TH, Casavant CH, Wilber JC, Stites DP. Comparison of six methods for the detection of antibody to cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 1004-19.
- Re MC. IgM to human cytomegalovirus. Comparison of two enzyme immunoassay and IgM reactivities to viral polypeptides detected by immunoblotting. *J Clin Lab Anal* 1989; 3: 169-73.
- Egger M, Metzger C, Enders G. Differentiation between acute primary recurrent human cytomegalovirus infection in pregnancy, using a microneutralization assay. *J Med Virol* 1998; 56: 351-8.
- Castillo Z, Navarro C, Moreno J, Morillo C, Nuñez O, Montoya J, y col. Análisis clínico epidemiológico de la infección aguda por Citomegalovirus. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso Venezolano de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual. Caracas, Venezuela. 15-18 de Mayo, 2005. <http://caibco.ucv.ve>.
- Ahumada-Ruiz S, Taylor-Castillo L, Visoná K, Luftig RB, Herrero U. Determination of human cytomegalovirus genetic diversity in different patient population in Costa Rica. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46: 87-92.
- Machado CM, Fink MC, Vilas Boas LS, Sumita LM, Weinberg A, Shiguetatsu K, Souza IC y col. Infección perinatal pelo citomegalovirus em hospital público do município de Sao Paulo; estudio prospectivo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991; 32: 159-66.
- Zurita C, Caisa ME, Villasis P. Prevalencia de IgG e IgM para citomegalovirus en madres y recién nacidos del Hospital Gineco Obstétrico Isidro Ayora. *Rev Ecuat Pediatr* 2003; 4: 4-7.
- Urkin J, Sarov B, Naggan L, Haikin H, Sarov I. Prevalence of CMV antibodies among women of childbearing age of different social environments in southern Israel. *J Med Virol* 1988; 24: 19-25.
- de Ory F, Castañeda R, Ramirez R, Pachón J. Estudio epidemiológico frente a citomegalovirus en mujeres en la edad

- fértil de la comunidad de Madrid. *Med Clin (Barc)* 1998; 111: 290-1.
22. Gratacap-Cavallier B, Morrand P, Dutertre N, Bosson JJ, Bacard-Longere M, Jouks PS. Cytomegalovirus infection in pregnant women. Seroepidemiological prospective study in 1018 women in Isere. *J Gynecol Obstet Reprod (Paris)* 1998; 27: 161-6.
 23. Lazzarotto T, Varani S, Gabrielli L, Spezziacateria P, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Intervirolog* 1999; 42: 390-7.
 24. Echániz-Avilés G, Tamayo-Legorreta E, Cruz-Valdéz MC, Rángel-Flores H, Hernández-Nevárez P, Gatica-Martínez R, Calderón-Jaimes E. Prevalencia de anticuerpos contra citomegalovirus en mujeres de edad reproductiva. *Salud Pública de México* 1993; 35: 20-6.
 25. Contreras Larrabe M, Escaff M, Salinas Tapia P, Saavedra Umpierrez T, Suárez González M. Detección de marcadores parasitarios y virales en embarazadas adolescentes y sus recién nacidos en riesgo. *Rev chil obstetr ginecol* 1995; 60: 85-9.
 26. Luchsinger, V., Suárez González, M., Schultz Alvarado, R., Barraza Carvajal, P., Guzmán, M., Terrada, L., Méndez, V. y Kaltwasser Gonzalez, G. 1996. Incidencia de infección congénita por citomegalovirus en recién nacidos de distinta condición socioeconómica. *Rev med Chil.* 1996; 124: 403-8.
 27. Sosa P, Octavio M. Detección antenatal de infección por citomegalovirus. *Bol Postgrado (UCLA, Venezuela)*. 1994; 10: 169-75.
 28. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 469-73.
 29. Lazzarotto T, Guerra B, Spazacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradilli P. *et al.*, Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol* 1998; 36: 3540-4.
 30. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME. Congenital cytomegalovirus infection. The relative importance of primary and current maternal infection. *N Engl J Med* 1982; 306: 945-9.
 31. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326: 663-7.
 32. Boppana DB, Pass RF, Britt WJ. 1993. Virus specific antibody responses in mothers and their new born infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* 1993; 167: 72-7.