

INFECCIÓN CITOMEGÁLICA DEL RECIÉN NACIDO

Libia Herrero U.* , Emma Zamora**, Francisco Eheverría B.*** Alberto Sáenz***

Key Word Index: cytomegaloviruses infant, newborn

RESUMEN

Se estudió a 105 neonatos, admitidos al Servicio de Neonatología y 36 niños mayores que ingresaron a otros servicios del Hospital Nacional de Niños. Todos ellos presentaron uno o más signos de la sintomatología clásica del síndrome de TORCH. Se determinó el citomegalovirus en 10 de los niños (7%) y se detectó IgM e IgG específica en el suero de cada uno de ellos. Cuatro de los pacientes fueron estudiados durante la primera semana de vida, por lo cual pudo concluirse que eran infecciones in utero. Cuatro de ellos tuvieron su ingreso después de la primera semana por lo cual no se pudo concluir certeramente el tipo de infección, aunque los signos, patología y evolución, hicieron inclinarse fuertemente hacia una infección congénita. Se logró determinar infección natal o postnatal en dos de los casos. Se presentan las características de las madres como edad, seropositividad, paridad, y otras, y se discute ampliamente cuál tipo de infección (primaria o reactivación) es más importante en Costa Rica [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(2):137-143].

INTRODUCCIÓN

Los citomegalovirus (CMV) pertenecen a la familia Herpesviridae, y se conocen por su amplia distribución en humanos y otros mamíferos (6,28). Una de las características más importantes que comparte con el resto de los virus de su grupo, es el establecimiento de infecciones latentes que, a lo largo de la vida del individuo, pueden volver a entrar en actividad con una frecuencia variada. Esta recurrencia del virus se da fundamentalmente cuando ocurre una depresión en la inmunidad celular del paciente, ya sea natural o inducida (3,5).

Las manifestaciones clínicas de la infección citomegálica dependen de la edad y el estado

inmunológico del paciente. El problema más serio producido por el CMV es la infección congénita, ya que está asociada con un espectro de defectos congénitos oculocerebrales y también con manifestaciones sistémicas relacionadas con la infección de los pulmones, hígado, bazo y otros. Las secuelas más importantes de la infección congénita incluyen la microcefalia, sordera, ceguera, convulsiones y retardo en el crecimiento sicomotor (7, 9, 13, 21). Se ha demostrado una incidencia de infecciones congénitas del 0.2 al 3 por ciento de los nacidos vivos en diferentes poblaciones (9,18).

La gran mayoría de las infecciones primarias por CMV son asintomáticas, incluyendo la infección congénita. El 95 por ciento de los niños infectados *in utero* no presentan enfermedad aparente al nacer. Sin embargo, se ha observado que del 10 al 25 por ciento de estos neonatos pueden desarrollar tardíamente problemas auditivos y del 5 al 10 por ciento pueden sufrir de varios grados de problemas sicomotores (12, 21, 26).

La incidencia del CMV está inversamente relacionada al estatus socio-económico, de manera que, en los países en vías de desarrollo o en las poblaciones de escasos recursos, se ha encontrado una inmunidad en más del 80 por ciento de los adultos jóvenes, demostrando una amplia circulación del virus en la población (10, 23). La infección congénita es también más frecuente en sociedades de bajos recursos, habiéndose encontrado hasta en un 3 por ciento de los nacidos vivos en los países o los grupos menos favorecidos (8).

Como se ha señalado anteriormente, el CMV produce infecciones latentes; por lo tanto, puede reactivarse y producir infección activa nuevamente, aún en presencia de anticuerpos específicos circulando en la sangre del paciente (17).

Los estudios realizados con mujeres embarazadas han demostrado que la excreción del CMV por la orina y las secreciones vaginales aumenta con el progreso del embarazo. Algunos autores afirman que esto se debe a que hay una disminución en la inmunidad celular específica contra el CMV (2,25). Por lo tanto, una infección congé-

* Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José. Costa Rica, e Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Tres Ríos, Costa Rica.

** Louisiana State University International Center for Medical Research and Training (LSU-ICMRT), San José, Costa Rica.

*** Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica.

nita puede ocurrir cuando la madre adquiere el virus por primera vez, cuando ocurre una reactivación o una reinfección (20,24).

El estadio del embarazo es muy importante, ya que dependerá del momento de contacto del CMV con el feto, el resultado final de la infección. Si ocurre en los estadios tempranos, puede producir la muerte al feto, o manifestaciones más severas en el neonato. Si la infección ocurre durante los últimos estadios del embarazo, la sintomatología generalmente es más leve. Si hay una reactivación del virus en el cuello uterino, el niño se infectará a la hora del nacimiento (28).

Este trabajo es parte de un estudio sobre el síndrome de TORCHS que se llevó a cabo en el Hospital de Niños durante un año calendario. Se presentan y discuten los casos en que se aisló y confirmó serológicamente la presencia del CMV en los pacientes estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población Estudiada

Se incluyó en el estudio a 105 neonatos admitidos al Servicio de Neonatología del Hospital Nacional de Niños y 36 niños mayores que ingresaron a otros servicios del hospital. Todos ellos presentaron uno o varios de los siguientes signos: ictericia, hepatoesplenomegalia, púrpura, trombocitopenia, petequias, anemia, neumonía, microcefalia, retardo en el crecimiento intrauterino, calcificaciones intracraneanas, defectos oculares y malformaciones congénitas. Se estudió un total de 141 niños durante un año calendario.

Cultivo de Virus

Las orinas se trataron con antibióticos (penicilina, estreptomycin y micostatin) y el pH se ajustó con NaOH al 0.8 por ciento. Después de inocular los cultivos celulares con orina fresca, ésta se mezcló 1:1 con sorbitol al 50 por ciento y fueron guardadas a 4°C por una semana. Si después de ese tiempo la monocapa inoculada se mantenía viable y sin contaminación, los viables eran congelados a -70°C.

Se utilizó fibroblastos de pulmón embrionario humano (HEL-299) obtenidos de la American Type Culture Collection para el aislamiento de CMV. Luego de inocular 0.2 ml de orina por tubo, se dejó adsorber 1 hora a temperatura ambiente y se agregó medio MEM (GIBCO) complementado con 2 por ciento de suero fetal bovino. Los tubos inoculados a 37°C se descar-

taron como negativos después de seis semanas de observación (27).

Métodos Serológicos

La preparación del antígeno para las pruebas serológicas se realizó utilizando la cepa AD-169 amablemente suministrada por el Dr. P. Glezen de la Universidad de Baylor. La extracción del antígeno se hizo con el bórfer de glicina pH 9.5 (1). Se utilizó tanto el antígeno intracelular como el libre de células, después de ultracentrifugar el sobrenadante a 100.000g durante 2 horas. Para la identificación de los virus aislados se preparó antígenos por este mismo método y fueron tipificados por radioinmunoensayo (8), utilizando un antisero de referencia (M.A.Bioproducts).

Para la determinación de las inmunoglobulinas M y G específicas para el CMV en los sueros de los pacientes, se utilizó la técnica de ELISA (11,22), desarrollada en nuestro laboratorio y que se describe a continuación: se cubrieron placas de poliestireno (Nunc) durante 48 horas a 4°C en cámara húmeda con 200 µl de antígeno de citomegalovirus y el control de células no infectadas diluidas 1:25 en bórfer de carbonatos pH 9.6 en pozos alternos. Luego de aspirar, se colocan 200 µl de polivinilpirrolidona al 2 por ciento diluido en el mismo bórfer durante 6 horas a 4°C; las placas fueron lavadas y quedaron listas para usar. Se colocó las 200 µl de las diluciones de los sueros y de los controles positivos y negativos en los pozos cubiertos con el antígeno y el control de células, y fueron incubados a 40°C por una hora. Después de lavar con PBS con 0.5 por ciento de Tween-20, se agregó 200 µl de suero de conejo anti IgM (cadenas u) o anti IgG (cadenas g) (DAKO) conjugadas a fosfatasa alcalina diluida 1:1000 en PBS, con 10 por ciento de suero fetal bovino y 0.5 por ciento de Tween-20. Después de incubar las placas a 40°C durante una hora, se lavaron, y se agregó 200 µl de solución de sustrato (p-nitrofenilfosfato disódico) disuelto en un bórfer de dietanolamina pH 9.8. Se dejó que la reacción ocurriera a 4°C durante toda la noche. La lectura se realizó a 405 nm en un contador de ELISA automático (Dynatech MR-580). Se consideró como positivo aquel suero que duplicó la absorbancia de su respectivo control. Todos los demás reactivos utilizados fueron de Sigma Chemical Co.

RESULTADOS

Durante el estudio, se obtuvo el 100 por ciento

de los sueros del grupo de niños y 135 (95.7%) muestras de orina, de las cuales sólo 114 (81%) pudieron ser examinados por CMV satisfactoriamente. Se logró aislar el virus en 10 casos (7%). La sintomatología y la patología presentada por los niños con citomegaloviruria se observa en el Cuadro 1. Los pacientes 0036, 0066, 0077 y 0124 ingresaron al hospital durante la primera semana de vida, momento en que se tomaron las muestras clínicas para el aislamiento del virus y detección de la IgM específica para el CMV. En estos casos, se confirmó por medio del laboratorio la infección congénita. Como se puede observar, todos presentaron la sintomatología clásica de Torch, con excepción del caso 0124 que sólo presentó microcefalia.

Los seis niños restantes ingresaron al estudio después de la primera semana de vida, unos durante su primer ingreso al hospital y otros en ingresos posteriores. Por lo tanto, en estos casos no se pudo determinar certeramente en que momento ocurrió la infección, ya que tanto los marcadores de laboratorio como el aislamiento del virus y la detección de IgM en el suero del paciente, son iguales después de la primera semana de vida. Es decir, no se puede diferenciar una infección congénita de una adquirida durante el nacimiento o postnatal. Por ello, el análisis de los expedientes se hizo primordial para ver la evolución en cada caso y poder llegar a una conclusión más certera del tipo de infección. El paciente 0002 fue estudiado durante el segundo ingreso a los 55 días de nacido, presentando insuficiencia respiratoria, malformaciones múltiples y retardo en el desarrollo sicomotor. La información procedente del expediente demostró que su primer internamiento fue a los 5 días de nacido, presentando ictericia, convulsiones, conjuntivitis y malformaciones múltiples. En los meses posteriores registró varios ingresos más al hospital por insuficiencia respiratoria y bronconeumonía, hasta que falleció a los 5 meses de edad. Debido a la patología presentada por este niño a la hora del nacimiento y habiéndose determinado un retraso sicomotor a los 2 meses de edad, se hace evidente que se trate de una infección congénita. El paciente 0132 también da pruebas de ser una infección *in utero*, ya que este niño de 106 días de edad presentó coriorretinitis, microcefalia y calcificaciones craneanas. Estas dos últimas anomalías denotan procesos crónicos que se llevaron a cabo durante los primeros meses del desarrollo del feto.

El paciente 0063 es de pretérmino que tiene su primer ingreso a los 24 días de nacido, presen-

tando bronconeumonía derecha, vómito, tos, hepatomegalia y los pulmones con ronos y crépitos. Un mes después vuelve a ser internado presentando insuficiencia respiratoria, acidosis metabólica, microcefalia, coriorretinitis y opistótonos. Dos meses después vuelve a ingresar por una bronconeumonía bilateral y acidosis metabólica, muriendo de paro cardiorespiratorio. Por otro lado, el paciente 0122 fue también de pretérmino que se estudió al ser referido de otro hospital a los 67 días de nacido. Ingresó presentando anemia, microcefalia, distensión abdominal y bronconeumonía. A los cuatro días de estancia intrahospitalaria presentó ictericia y petequias. Estos dos últimos casos sugieren ser infecciones *in utero*, aunque cabe la posibilidad que fuera una infección postnatal sintomática, especialmente en niños debilitados por su bajo peso al nacer.

El paciente 0129 ingresó al Servicio de Neumología a los tres meses de edad, presentando bronconeumonía bilateral, hepatoesplenomegalia y adenopatía inguinal bilateral, lo cual acusa, sin duda, una infección aguda postnatal. La paciente 0127 era una niña pequeña para su edad gestacional, que ingresó al hospital al mes de nacida, con diarrea y otitis media. Dos días después de internada tuvo un problema respiratorio con atrape aéreo, que se resolvió rápidamente. El primer suero se tomó a su ingreso y no fue posible detectar la IgM específica para CMV. Un mes después se visitó en su hogar y se extrajo sangre, detectándose esta vez la IgM con un título de 1:200. En este caso, se demostró la seroconversión, tratándose claramente de una infección postnatal temprana.

En todos los casos en que se aisló el CMV, se detectó una inmunoglobulina M específica en el suero del paciente. No se detectó IgM en los niños con cultivo negativo, lo cual indica una sensibilidad y especificidad del 100 por ciento de la técnica de ELISA empleada.

Se examinaron por IgG específica los sueros de los 105 neonatos que ingresaron al hospital durante la primera semana de vida, para determinar la inmunidad de la madre. Se encontró que el 89 por ciento de ellas tenían anticuerpos específicos contra el CMV.

Los hogares de los niños con enfermedad citomegálica se caracterizaron por ser casas pequeñas con un promedio de dos aposentos y un número de 5.6 personas por casa. Además, el seguimiento que se realizó a los niños que vivían en el Valle Central permitió observar que la mayoría de las casas estaban deterioradas. Este hecho, más los factores ya mencionados, indi-

can una situación de hacinamiento y de bajos recursos económicos en estas familias.

En el Cuadro 1 se muestran algunas características de las madres. La mayoría de los pacientes con enfermedad congénita fueron producto del primer parto. La madre del paciente 0077 reportó haber tenido 3 abortos espontáneos antes del nacimiento de su hijo. Ninguna de las mujeres admitió haber tenido otros hijos con defectos o síntomas a la hora del nacimiento. La edad de las madres de los niños infectados *in utero* se encuentra entre los límites normales de la población en general, aunque hay dos primíparas muy jóvenes, de 16 y 17 años de edad.

Este estudio incluyó niños de todo el país, ya que el Hospital de Niños es un centro de referencia nacional. Aún así, el 43.2 por ciento de ellos provenían de San José.

DISCUSIÓN

El CMV es la causa más frecuente de infecciones congénitas, con una incidencia que varía del 0.2 al 3 por ciento de todos los nacidos vivos en diferentes poblaciones (9,18). En el estudio de TORCHS realizado por nosotros (L. Herrero et al, información no publicada) demostramos que el CMV es el agente más común en los problemas congénitos en Costa Rica. Se detectó este agente en el 7 por ciento de los niños estudiados, lo que representa el 50 por ciento de los agentes identificados como agentes etiológicos.

Las infecciones congénitas aparentes se caracterizan por afectar varios órganos, en particular el sistema reticuloendotelial y el sistema nervioso (28). Una combinación de petequias, púrpura, trombocitopenia y neumonía fue el signo más frecuente en estos niños, seguido de hepatoesplenomegalia y defectos oculares. El 87.5 por ciento de los niños infectados *in utero* presentó microcefalia, lo que es una secuela muy común en Costa Rica. Stagno y colaboradores (21), en un estudio de recién nacidos sintomáticos, observaron microcefalia en el 70 por ciento de ellos.

La neumonía ha sido descrita comúnmente como una manifestación clínica de infección citomegálica en las personas transplantadas, y usualmente no se ha tomado como parte del síndrome congénito (21). Sin embargo, en este estudio se observó en el 62 por ciento de los neonatos infectados *in utero*. La neumonía ha sido descrita comúnmente como la manifestación clínica más importante después de una infección primaria por CMV en niños de muy tem-

prana edad (15, 29). En los dos casos en que se demostró infección postnatal, encontramos el sistema respiratorio afectado.

Todavía no ha sido posible implicar al CMV como un agente teratogénico (21); sin embargo, dos de nuestros pacientes presentaron varias malformaciones congénitas, tales como: cráneo con occipital prominente, orejas de implantación baja, cuello corto y piel laxa, con dedos de las manos en donde el índice es igual o mayor al dedo medio, pelvis estrecha, luxuración de muñeca y otros.

Existen dos mecanismos para la infección intrauterina (24). La primera ocurre cuando hay una primoinfección en la mujer embarazada y la otra ocurre cuando hay una reactivación o una reinfección durante el embarazo. Este estudio y el de Serra y colaboradores (información no publicada) en los cantones de San Ramón y Palmares demostraron que el 90 por ciento de las mujeres a la hora del parto tenían anticuerpos séricos contra el CMV, lo cual indica que la infección primaria, como mecanismo de transmisión en Costa Rica, parece poco importante, aunque eventualmente ocurra. La vía más importante por la cual ocurre infección congénita en este país sería entonces la reactivación o reinfección durante el embarazo. Se ha demostrado en varios estudios que ocurren reactivaciones en el orden del 50 al 82 por ciento de las embarazadas (19). Por razones que no se conocen en este momento, la infección intrauterina ocurre más frecuentemente en las mujeres inmunes de bajos recursos económicos, que en aquellas de niveles sociales más altos. Esto se debe posiblemente a factores como el hacinamiento, la edad en que contrajo la primoinfección o factores genéticos del huésped.

Serra et al (información no publicada) demostraron que el 40 por ciento de una cohorte de niños de San Ramón y Palmares tuvo su primoinfección durante los primeros tres meses de vida. Esto es una indicación importante de la alta tasa de reactivación en esa zona, que bien se puede extrapolar al país en general. Ha sido bien demostrado que cuando ocurre una reactivación, la madre excreta el virus por la leche, y las secreciones orales y vaginales, haciendo la transmisión del virus al recién nacido relativamente fácil (14,16).

Tomando en cuenta todos estos factores, sugerimos que el mecanismo más importante de infección congénita en Costa Rica es por reactivación del virus durante el embarazo, ya que sólo el 10 por ciento de las mujeres en edad de concebir son seronegativas, y porque la primoinfec-

ción del niño es en etapas muy tempranas de su vida (Serra et al, información no publicada). Este trabajo y el de Serra y colaboradores (información no publicada) han demostrado que existe una gran circulación del CMV en esta población: por lo tanto, se podría asumir que coexisten varias cepas del virus. Esto lleva a la posibilidad que existan las reinfecciones en menor o mayor grado. Para lograr dilucidar este punto, deben hacerse varios estudios, pero por el momento queda la incógnita de cuán importante es esta forma de infección intrauterina. Los factores de riesgo más importantes para la infección *in utero* es la seronegatividad, la paridad, la edad y el estatus económico de la madre (19). Así pues, hemos demostrado en este trabajo que las madres son de escasos recursos, que viven en hacinamiento y que la mayoría eran de primer parto, cumpliendo así con los factores de alto riesgo.

La infección intrauterina por CMV es muy importante desde el punto de vista de salud pública, ya que ocurren secuelas graves como lo son el retardo en el crecimiento sicomotor, sordera, disminución de la capacidad intelectual, dificultades de aprendizaje, problemas de comportamiento y otros (5,28).

Desgraciadamente por el momento, no existe ningún mecanismo efectivo para prevenir la infección intrauterina. Hay una vacuna viva contra CMV (Thowne) que ha sido utilizada exitosamente en personas seronegativas, que habrían de ser trasplantadas (4). El inconveniente que existe es que la cepa vacunal puede también establecer infecciones latentes y, por lo tanto, pueden ocurrir reactivaciones, de manera que el feto no estaría a salvo de infectarse *in utero* a la hora del parto o temprano en su vida.

CUADRO 1
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DE LABORATORIO Y DE
LA MADRE DE LOS NIÑOS CON CMV

SIGNOLOGÍA Y/O	PACIENTES										
PATOLOGÍA											
	0036	0066	0077	0124	0002	0132	0063	0122	0127	0129	%
Edad (días) ¹	1	1	3	1	55	106	62	67	27	102	
T. Gestación (RN)	Pre	T	T	T	Pre	T	Pre	Pre	T	T	
Peso al nacer (g)	3220	2950	2930	2800	1760	2865	2350	1850	2340	3480	
Índice Rohrer ²	10-90	10-90	< 10	10-90	< 10	10-90	10-90	10-90	< 10	10-90	
Microcefalia											80
Hepatomegalia											60
Esplenomegalia											40
Petequias											40
Púrpura											40
Trombocitopenia											40
Anemia											40
Neumonía											60
Ictericia											40
Malformaciones											20
Calcificaciones											20
D. oculares											30
Retardo crecimiento sicomotor											10
Muerte											30
LABORATORIO											
Aislamiento CMV											
IgM específica											
Título IgM	1600	6400	6400	NSH	NSH ³	800	6400	6400	200	800	
MADRE											
Edad (años)	22	24	22	17	16	25	28	22	38	NSC ⁴	
Paridad	1	3	3	1	1	1	3	1	8	NSC	
Abortos espontáneos											
	0	0	3	0	0	1	0	0	0	NSC	

¹ Momento en que el niño fue reclutado en el estudio
² Indicado en paréntesis

³ No se hizo
⁴ No se conoce

AGRADECIMIENTO

Este estudio se realizó gracias al financiamiento N° 430-8440 otorgado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Agradecemos el entusiasmo y el apoyo del Dr. Jorge Piza Escalante. Las largas discusiones y revisión del manuscrito al Dr. Jaime Serra y al personal de Laboratorio del INCIENSA por su valiosa colaboración.

ABSTRACT

Urine cultures for cytomegalovirus (CMV) and samples of blood for specific antibody were obtained from 141 neonates presenting one or more of the classic symptoms of the TORCH syndrome. Cytomegalovirus was determined in 10 of them (7%) and specific IgM and IgG were detected in their sera. Congenital infection was reported in eight patients. Four of them were examined during the first week of life, and thus were easily diagnosed. The other four were older, but the signs, pathology and evolution of the clinical process tended to favor an in utero infection. Characteristics of the mothers such as parity, age, seropositivity, and others, and the most important CMV type of infection (primary or recurrent) in Costa Rica is discussed.

BIBLIOGRAFÍA

- Cremer, N.J., Jensen, F., Hoffman, M., Oshiro, L.S., Lennette, E.H. Complement-fixing antibody in human sera reactive with viral and soluble antigens cytomegalovirus. *J. Clin Micro.* 1975; 1:262-267.
- Chandler, S.A., Alexander, E.R., Holmes, K.K. Epidemiology of cytomegalovirus infection in a heterogeneous population of pregnant women. *J. Inf. Dis.* 1985; 152:249-256.
- Dowling, J.N., Saslow, A.R., Armstrong, I.K., Ho, M. Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *J. Inf. Dis* 1976; 133:399-408.
- Friedman, A.D., Furukawa, T., Plotkin, S.A. Detection of antibody to cytomegalovirus early antigen in vaccinated, normal volunteers and renal transplant candidates. *J. Int. Dis.* 1982; 146:255-259.
- Gehr, R.C., Christianson, W.R., Linner, K.M., Conroy, M.M., McCue, S.A., Balfour, H.H. Jr Cytomegalovirus-specific humoral and cellular immune responses in human pregnancy. *J Int Dis.* 1981; 143:391-393.
- Gold, E., Nakervis, G.A. Cytomegalovirus. En: *Viral Infections in Humans*, Evans, A.S. (ed). New York, Plenum, 1976; 143-161.
- Hanshaw, J.B. Congenital and acquired cytomegalovirus infection. En: *The Pediatric Clinics of North America*. Mayo, 1966; 226-241.
- Kangro, H.O., Griffiths, P.D., Huber, T.J., Heath, R.B. Specific IgM class antibody production following infection with cytomegalovirus. *J Med Virol.* 1982; 10:203-212.
- Kinney, J.S., Onorato, I.M., Stewart, J.A., Pass, R.F., Stagno, S., Cheeseman, S.H., Chin, J., Kumar, M.L., Yaeger, A.S., Herrman, K.L., Hurwitz, E.S., Schonberger, L.B. Cytomegalovirus infection and disease *J Inf Dis.* 1985; 151:772-774.
- Lang, D.T. The epidemiology of cytomegalovirus infections: interpretations of recent observations. En: *Infections of the Fetus and Newborn Infant*. Vol. 3. Krugman, S. y Gershon, A.A. (eds). Alan R. Liss, New York, 1975; 35-46.
- Middledorp, J.M., Jongsma, J., Haar, A., Schirm, J., The, T. H. Detection of immunoglobulin M and G antibodies against cytomegalovirus early and late antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microb* 1984; 20:763-771.
- Melish, M.E., Hanshaw, J.B. Congenital cytomegalovirus infection: developmental progress of infants detected by routine screening. *Am. J. Dis Child.* 1973; 126:190-194.
- Pass, R.F. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Inf Dis.* 1985; 152:242-248.
- Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T.S., Tiller, M., Alford, C.A. Jr. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N. Engl J. Med.* 1973; 289:1-5.
- Smith, S.D., Chao, C.T., Brahmachari, N., Lenahan, M.F. Pulmonary involvement with cytomegalovirus infections in children. *Arch Dis Child.* 1977; 52:441-446.
- Stagno, S., Reynolds, D.W., Pass, R.F., Alford, C.A. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 1980; 302:1073-1076.
- Stagno, S., Reynolds, D.W., Huang, E.S., Thames, S.D., Smith, R.J., Alford, C.A. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in an immune population. *N Engl J Med.* 1977; 296:1254-1258.
- Stagno, S., Pass, R.F., Alford, C.A. Perinatal infections and maldevelopment. En: *The Fetus and the Newborn*, Annual Review of Birth Defects. 1980. Bloom, A.D. y James, L.S. (eds). Alan R. Liss, New York. 1981; 31.
- Stagno, S., Pass, R.F., Dworsky, M.E., Hendersson, R.E., Moore, G.G., Walton, P.D., Alford, C.A. Congenital cytomegalovirus infection the relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med.* 1982; 306:945-949.
- Stagno, S., Pass, R.F., Dworsky, M.E., Alford, C.A. Jr. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol.* 1982; 25:563-576.
- Stagno, S., Pass, R.F. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. *Sem Perinat* 1983; 7:31-42.
- Stagno, S., Tinker, M.K., Elrod, C., Fuccillo, D.A., Cloud, G., O'Beirne, A.J. Immunoglobulin M antibodies detected by Enzyme-Linked Immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of Cytomegalovirus infections in pregnant and newborn infants. *J Clin Micro.* 1985; 21:930-935.
- Stem, H., Tucker, S.M. Prospective study of cytomegalovirus infection, in pregnancy. *Br. Med J.* 1973; 2:268-270.

24. Stem, H. Cytomegalovirus infection in the neonate and its prevention. *Postgrad Med J.* 1917; 53:588-591
25. Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T.S., Tiller, M., Alford, C.A. Jr. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med.* 1973; 289:1-6.
26. Reynolds, D.W., Stagno, S., Stubbs, K.G., Dahle, A.J., Livingston, M.M., Saxon, S.S., Alford, C.A. Jr. Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM levels. *N Engl J Med.* 1974; 290:291-296.
27. Reynolds, D.W., Stagno, S., Alford, C.A. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. En: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infections.* Lennette, E.D., Schmidt, N.J. (eds). American Public Health Association, Inc. 1979; 399-440.
28. Weller, T. H. The cytomegaloviruses: Ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med* 1971; 285:203-241.
29. Whitley, R.J., Brasfield, D., Reynolds, D.W., Stagno, S., Tiller, R.E., Alford, C.A. Protracted pneumonitis in young infants associated with perinatally acquired cytomegaloviral infection. *J Pediatr.* 1976; 89:16-22.