

## INFECÇÃO PERINATAL PELO CITOMEGALOVÍRUS EM HOSPITAL PÚBLICO DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO: ESTUDO PROSPECTIVO

Clarisse Martins MACHADO (1, 2), Maria Cristina D. S. FINK (2), Lucy S. VILAS BOAS (2),  
Laura Massami SUMITA (2), Adriana WEINBERG (2), Kenji SHIGUEMATSU (3), Ibiracy C. SOUZA (3),  
Lucy D. CASANOVA (3) & Cláudio Sérgio PANNUTI (2)

### RESUMO

Com o objetivo de se avaliar a magnitude da infecção perinatal pelo citomegalovírus em hospital público do município de São Paulo, os autores acompanharam prospectivamente 98 recém-nascidos até o quarto mês de vida. Amostras de urina foram coletadas ao nascimento e posteriormente a cada mês, para inoculação em tubos contendo fibroblastos humanos. Amostras de sangue foram coletadas ao nascimento, no segundo e quarto mês de vida para pesquisa de anticorpos IgM específicos para o CMV, pelo método de imunofluorescência indireta. Dos 37 recém-nascidos que foram acompanhados até o quarto mês de vida, 9 se infectaram neste período, com diagnóstico feito pelo isolamento do CMV. O risco de aquisição da infecção pelo citomegalovírus no período perinatal estimado pela tábua de sobrevivência foi de 30,9%. A pesquisa de anticorpos IgM por imunofluorescência indireta só permitiu tal diagnóstico em 2 casos (8,1%). A diferença observada entre os dois métodos foi estatisticamente significativa ( $p = 0,015$ ). O estudo da prevalência de anticorpos IgG pelo ensaio imunoenzimático nas mães das crianças mostrou taxas de 92,7%. Não se isolou CMV nas amostras de leite materno, coletadas mensalmente até o terceiro mês de lactação. O acompanhamento clínico evidenciou que as crianças infectadas apresentaram-se de forma assintomática e com desenvolvimento neuropsicomotor normal até o quarto mês.

**UNITERMOS:** CMV; Infecção perinatal.

### INTRODUÇÃO

A infecção perinatal pelo citomegalovírus (CMV) é muito comum. Em vários países onde tal incidência foi avaliada, as taxas variam de 5 a 38%, sendo maior nos locais onde a prevalência de anticorpos para o CMV é maior, o que corresponde geralmente a populações de baixo nível sócio-econômico<sup>1, 10, 12, 13, 20, 22, 24, 29</sup>.

A soropositividade materna evidencia infecção pregressa pelo CMV e a possibilidade de excreção viral. A mãe excretora é a principal fonte de infecção no período perinatal<sup>20, 22</sup>.

Segundo se acredita atualmente, os sítios de excreção do CMV mais importantes na trans-

(1) Mestranda do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Escola Paulista de Medicina. São Paulo, SP, Brasil.

(2) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (LIM-52 HC FMUSP). São Paulo, SP, Brasil.

(3) Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira" (Serviço de Neonatologia). São Paulo, SP, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Dra. Clarisse Martins Machado. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Virologia. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470. CEP 05403 São Paulo, SP, Brasil.

missão perinatal da infecção, são o leite materno e o cervix uterino<sup>7, 10, 18, 20, 22</sup>.

Embora a maioria das crianças infectadas naturalmente pelo citomegalovírus apresente-se de forma assintomática, existem relatos de casos com quadros pulmonares de longa evolução. Alguns autores sugerem ainda que a infecção perinatal pelo CMV possa predispor ou agravar o curso de uma infecção bacteriana<sup>9, 32</sup>.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a magnitude da infecção perinatal pelo citomegalovírus em nosso meio e dimensionar o impacto deste tipo de infecção através do acompanhamento clínico prospectivo das crianças infectadas.

## CASUÍSTICA E METODOLOGIA

### 1. Definição de infecção perinatal.

Infecção perinatal pelo citomegalovírus se definiu quando o recém-nascido que não apresentava virúria antes da segunda ou terceira semana de vida, passou a apresentá-la após a quarta semana. É impossível se estabelecer com certeza, se congênita ou perinatal, a infecção diagnosticada pela presença de virúria entre a terceira e a quarta semana de vida<sup>22</sup>.

Da mesma forma, anticorpos classe IgM específicos para o CMV presentes após a quarta semana de vida e ausentes ao nascimento, foram o critério para o diagnóstico sorológico de infecção perinatal pelo citomegalovírus.

### 2. Critérios para inclusão no estudo.

Para inclusão no estudo foram obedecidos os seguintes critérios:

- Coleta de uma amostra de sangue ou urina até o sétimo dia de vida.
- Ausência de infecção congênita.
- Comparecimento ao primeiro retorno.
- Anuência materna.

### 3. População estudada.

O presente estudo foi realizado no Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Mora-

to de Oliveira" que atende uma população já estudada anteriormente<sup>19</sup> e caracterizada como de médio nível sócio-econômico. Na ocasião, os autores demonstraram que a prevalência de anticorpos específicos para o CMV, pesquisados por reação de fixação de complemento, nas mulheres que davam a luz neste hospital, era de 66,5%. Encontraram ainda incidência de infecção congênita pelo citomegalovírus de 0,5%.

Durante três meses, a partir de 13 de agosto de 1986, 98 recém-nascidos dos quais se pode obter uma amostra de urina e/ou sangue até o sétimo dia de vida, com o objetivo de se excluir os casos de infecção congênita pelo CMV, foram convocados para acompanhamento ambulatorial<sup>22</sup>.

Foi coletada também no período pós-parto imediato, uma amostra de sangue das mães que concordaram em participar do estudo, para avaliar o estado imunitário com relação a CMV.

O seguimento se realizou no ambulatório do HSPEFMO e as consultas marcadas com intervalo de um mês, até o quarto mês de vida. Nos meses 1, 2, 3 e 4 colhia-se uma amostra de urina e, nos meses 2 e 4 era coletada uma amostra de sangue das crianças incluídas no estudo. Nos meses 1, 2 e 3 colhia-se ainda uma amostra de leite materno.

### 4. Metodologia

As amostras de urina eram transportadas em gelo a 4°C até sua inoculação no laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Chegando ao laboratório eram tratadas com antibiótico (amikacina 500 µg/ml) e mantidas a 4°C por 60 minutos. Inoculava-se então 0,1 ml de urina em tubos de cultura com fibroblastos humanos, após decantação do meio de manutenção (meio de Eagle suplementado com 2% de soro fetal). Os tubos eram mantidos em estufa a 37°C por uma hora após o que adicionava-se 1 ml do meio de manutenção.

As amostras de leite materno também eram transportadas em gelo e mantidas a 4°C até sua inoculação. Destas amostras, após centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos para separação da fase gordurosa, era transferida a fase intermediária para tubos estéreis contendo antibiótico

(amikacina 500 µg/ml) e mantidos a 4°C por uma hora. Inoculava-se então 0,1 ml do leite em tubos com fibroblastos humanos que eram mantidos por uma hora a 37°C. A seguir desprezava-se o inóculo e adicionava-se 1 ml do meio de manutenção.

A leitura dos tubos de cultura era feita diariamente para observar o aparecimento de efeito citopático<sup>8, 11, 19, 25</sup>. As linhas celulares empregadas foram PF20 e PF21 em passagens diversas, obtidos a partir de prepúcio de crianças postectomizadas, preparadas e mantidas no laboratório de virologia do IMTSP. Foi também utilizada a linha celular WB em passagens diversas, obtidas comercialmente (CULTILAB Campinas-SP), a partir de pulmão fetal.

As amostras de sangue eram centrifugadas e o soro estocado a -20°C até seu processamento. Nas amostras de sangue das crianças foi pesquisada presença de anticorpos classe IgM específica para o CMV pela reação de imunofluorescência indireta, empregando-se como sistema celular as linhas de fibroblastos obtidos de prepúcio de crianças postectomizadas e de pulmão de feto. A fonte de antígeno foi a amostra do citomegalovírus Ad 169 e o conjugado fluorescente anti-IgM humano foi obtido comercialmente (bioMérieux)<sup>17, 21, 25, 28</sup>.

Nas amostras de sangue materno foram pesquisados anticorpos classe IgG específicos para o CMV pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Para a reação foram utilizadas microplacas (HEMOBAG Campinas-SP) sensibilizadas com o CMV e o antígeno controle, nas diluições padronizadas<sup>31</sup>. Uma vez sensibilizadas as placas foram estocadas a -20°C. No momento da reação, após lavagem com PBS-Tween-80, procedeu-se o bloqueio das placas com albumina bovina a 1% por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram incubadas por trinta minutos a 37°C com amostras de soro diluídas a 1:20 em PBS, albumina bovina a 1% e 0,0005% de Tween 80. Após lavagem com PBS-T foi adicionado o conjugado anti-IgG humano com peroxidase na diluição 1:1000, incubados por trinta minutos a 37°C e novamente lavado. A seguir procedeu-se à última etapa da reação pela adição de 100 µl do revelador OPD (SIGMA, St. Louis-USA) (ortofenilenodiamina em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tampão citrato pH

5.0). As placas foram mantidas em local escuro por 10 a 30 minutos e a reação foi interrompida adicionando-se 10 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorbância foi medida com filtro de 492 nm em leitora automática modelo Titertek Multiskan MKII (FLOW, McLean, Vi). O resultado foi considerado positivo para a diferença de densidade óptica entre antígeno e antígeno controle maior ou igual a 0,1<sup>31</sup>.

## 5. Métodos estatísticos

O risco de aquisição da infecção perinatal foi calculado aplicando-se a tábua de sobrevivência<sup>9</sup>.

Na análise das tabelas de dupla entrada foi utilizado o teste exato de Fisher na comparação das proporções envolvidas<sup>23</sup>. Na comparação das médias encontradas entre os infectados com as médias dos não infectados utilizou-se o test "t" de Student. Como não havia evidência anterior de homogeneidade das variâncias o referido teste foi empregado sem a suposição de igualdade das mesmas<sup>2</sup>.

Os testes foram realizados sempre ao nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Dentre os 98 recém-nascidos estudados clínica e laboratorialmente ao nascimento, havia 59 homens e 39 mulheres; 79 eram brancos, 6 negros, 11 pardos e 1 amarelo. Em 1 caso não foi anotada a característica racial da criança. O peso ao nascimento variou de 2470 g a 4770 g (média = 3321,25 g) e apenas 2 foram considerados pequenos para a idade gestacional (PIG). Dos restantes, 79 foram considerados TAIG (de termo, com peso adequado para a idade gestacional), 9 eram TGIG (de termo, grandes para a idade gestacional) e 7 eram PTAIG (pré-termo, adequados para a idade gestacional).

O boletim de Apgar mais baixo foi de 6 no primeiro minuto e 8 aos cinco minutos, e o mais alto foi de 9 e 10 no primeiro e quinto minutos, respectivamente (média = 8,1 no primeiro minuto e 8,9 no quinto minuto).

O estudo das puérperas revelou que das 82 amostras de soro testadas, 76 (92,7%) eram posi-

tivas para o CMV pelo ELISA. Houve 57 partos cesáreos e 41 partos normais e o tempo de rotura de bolsa variou de 0 (no ato) a 26 horas. Em três partos não foi anotado o tempo de rotura de bolsa. Das 96 gestantes em que se anotou o número de gestações, 24 (25%) eram múltíparas (4 ou mais partos).

Trinta e sete crianças compareceram ao primeiro retorno e de acordo com os critérios de inclusão no estudo, foram matriculadas para acompanhamento clínico e laboratorial até o 4º mês de vida. Nove crianças se infectaram neste período e aplicando-se a tábua de sobrevivência, a probabilidade de infectar-se neste período foi de 30,9%, quando o diagnóstico da infecção foi feito pelo isolamento do CMV em cultura de células. Quando o diagnóstico era feito por sorologia (IFI-IgM), a probabilidade caía para 8,1% (tabela 1).

TABELA 1

Distribuição dos casos de infecção perinatal pelo CMV de acordo com o método diagnóstico.

Isolamento CMV	Imunofluorescência indireta		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	03	06	09
Negativo	00	24	24
TOTAL	03	30	33

(p = 0.015)

Não se isolou CMV de nenhuma amostra de leite coletada no 1º, 2º e 3º mês de lactação. As crianças infectadas pelo CMV no período perinatal apresentaram-se assintomáticas durante todo o seguimento. Os dados das crianças infectadas e não infectadas com relação à idade materna, peso ao nascimento e tempo de rotura de bolsa foram analisados pelo teste "t" de Student. A comparação das médias observadas entre os infectados e os não infectados não mostrou significância estatística<sup>2</sup>.

Os dados das crianças infectadas e não infectadas com relação ao tipo de parto, multiparidade materna, adequação, peso e idade gestacional, ordem de nascimento e sexo foram analisados pelo teste exato de Fisher. Não houve significância estatística nos resultados encontrados<sup>23</sup>.

## DISCUSSÃO

O risco de aquisição da infecção perinatal pelo citomegalovírus estimado em 30,9% neste estudo é considerado alto. Tal achado, entretanto, era de certa forma esperado uma vez que a prevalência de anticorpos específicos para o CMV nas mães das crianças incluídas no estudo era de 92,7% pelo ensaio imunoenzimático. A mãe soropositiva é a principal fonte de infecção no período perinatal, transmitindo o vírus para seu filho pelo aleitamento natural ou pelo contato com secreção cervical (no canal de parto)<sup>7, 10, 20, 27</sup>. A presença do vírus na saliva ou urina materna é pouco relevante na transmissão do CMV no período perinatal<sup>13</sup>.

Por outro lado, vários estudos demonstraram que mulheres soronegativas não apresentaram excreção viral em local algum e não tiveram seus filhos infectados no período perinatal<sup>7, 10, 15</sup>. Neste estudo apenas duas mães que participaram do seguimento eram soronegativas e seus filhos não apresentaram infecção perinatal pelo CMV.

Na tentativa de correlacionar-se infecção perinatal e aleitamento materno, foi pesquisada a presença do vírus no leite materno no primeiro, segundo e terceiro mês de lactação. Não se conseguiu isolar CMV no leite em amostra alguma provavelmente devido a problemas técnicos de coleta. Outro estudo, feito paralelamente a este pelo nosso grupo, com o objetivo de avaliar a presença do CMV no leite materno de puérperas, o tempo decorrido entre a coleta e a inoculação não foi superior a 1:30 h e a coleta era feita do jato inicial, após assepsia da região mamilar. Isolou-se CMV em 29,8% das amostras<sup>30</sup>. No presente estudo, o tempo decorrido entre coleta e inoculação variou de 3 a 24 h e a coleta era feita, após assepsia, desprezando-se o jato inicial e inoculando-se o jato médio, na tentativa de se evitar as perdas por contaminação bacteriana. A amostra que se perdia não era passível de reinoculação porque no leite, diferentemente do que se observa com a urina, o CMV não mantém sua infectividade a 4°C por período maior que 7 dias<sup>6</sup>. Estas modificações técnicas podem explicar a falha no isolamento do CMV no leite materno neste estudo.

Outro local de excreção viral importante na transmissão perinatal é o cervix uterino. Essa excreção é maior no terceiro trimestre da gestação e pós-parto. REYNOLDS et al demonstraram que 37% das crianças nascidas de mães que excretavam vírus no colo uterino no terceiro trimestre, se infectaram no período perinatal. STAGNO et al encontraram 57% de crianças infectadas nascidas de mães excretando CMV no cervix no mesmo período<sup>22, 27</sup>.

A presença do citomegalovírus no cervix uterino no final da gestação, frente à rotura precoce das membranas fetais, poderia aumentar a probabilidade da criança se infectar pelo maior tempo de exposição ao agente. Entretanto, tal fato não ocorre. Para determinar se rotura de bolsa prolongada estaria associada com aquisição de infecção por via ascendente, REYNOLDS et al compararam tempo de rotura de bolsa em crianças que adquiriram infecção com crianças não infectadas, ambas nascidas de mães excretando CMV no parto. Demonstrou desta forma que, em ambos os grupos, o maior tempo de rotura de bolsa não aumentava a chance de aquisição de infecção<sup>22</sup>. Também neste estudo, não observamos diferenças entre as crianças infectadas e não infectadas, quanto ao tempo maior de rotura de bolsa.

Da mesma forma, o fato da criança ter nascido por parto cesárea teoricamente excluiria o contato com secreção cervical, uma das fontes de infecção neste período. Nestes casos, o aleitamento natural seria o maior incriminado caso a transmissão ocorresse. Os poucos trabalhos que estudaram as possíveis correlações entre os diversos sítios de excreção do CMV e aquisição ou não de infecção, não avaliaram em profundidade cada fator separadamente ou se a soma deles aumentaria as chances de infecção, como é o esperado. Assim sendo, embora seja conhecido que a transmissão pelo leite materno é a principal forma de se adquirir a infecção no período perinatal, não está bem estabelecido se a excreção em múltiplos locais aumentaria a incidência de infecção neste período.

Em nosso estudo, observando as crianças nascidas de parto cesárea, não houve menor taxa de infecção neste grupo quando comparada às crianças nascidas de parto normal.

O método estatístico empregado no presente estudo, a tábua de sobrevivência, permitiu avaliar o risco de se adquirir a infecção nos quatro primeiros meses de vida. Tal risco foi estimado em 30,9%, comparável às maiores taxas de incidência já detectadas em outros países no período perinatal.

O diagnóstico da infecção perinatal pelo citomegalovírus, como na maioria dos estudos, foi feito pelo aparecimento de virúria detectada a partir da 4ª semana de vida. Entretanto, como método auxiliar, foi realizado o diagnóstico pela pesquisa de anticorpos classe IgM por IFI. Por este método, o risco de se adquirir a infecção pelo CMV nos quatro primeiros meses de vida foi de 8,1%. Esta diferença era esperada pois o diagnóstico de infecção pelo citomegalovírus pela detecção de anticorpos IgM é considerado, como método, inferior ao isolamento na urina, tanto em relação à sensibilidade quanto à especificidade. Não se tem detectado IgM específico em 25 a 50% de crianças comprovadamente infectadas<sup>17, 26</sup>.

A diferença observada entre os dois métodos foi estatisticamente significativa ( $p = 0,015$ ), demonstrando mais uma vez que, como na infecção congênita, o diagnóstico de infecção perinatal deve ser realizado, sempre que possível, pelo isolamento em cultura de tecido. O teste sorológico realizado isoladamente, não se presta ao diagnóstico de infecção pelo CMV no período perinatal devido a grande porcentagem de falsos negativos.

Embora a infecção pelo CMV adquirida no período perinatal tenha sido por vezes associada com pneumonite, ela é raramente sintomática, como confirmaram vários autores<sup>3, 10, 20, 29</sup>. KUMAR et al, observaram sintomas coincidindo com o início da infecção pelo citomegalovírus em 1/3 das crianças infectadas. Os sintomas observados incluíam: hepatoesplenomegalia, exantema, pneumonite, atipia linfocitária, anemia, linfadenopatia<sup>13</sup>. Em nossa amostra pudemos observar que nenhuma criança infectada apresentou qualquer achado que pudesse ser considerado sintoma ou sinal de infecção pelo citomegalovírus.

Com relação a outros achados nas crianças infectadas no período perinatal, os dados variam

muito de autor para autor e a escassez de estudos não permite postular associações significantes. GRANSTROM, por exemplo, encontrou entre crianças com idade gestacional maior ou igual a 37 semanas e peso ao nascimento menor que 3000 g, incidência maior de infecção perinatal quando comparada com crianças de peso maior. Na opinião do autor, tal fato apoia o parecer de que o risco de infecção perinatal pelo citomegalovírus é maior nos recém-nascidos classificados como pequenos para a idade gestacional (PIG)<sup>10</sup>. O mesmo foi observado por LEVIN-SOHN em 1969<sup>16</sup>.

Já KUMAR et al. em 1984, observaram que a média de peso ao nascimento, no grupo dos infectados, não diferia significativamente dos não infectados<sup>13</sup>. No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com relação à média de peso ao nascimento no grupo dos infectados e não infectados. Também com relação à adequação peso/idade gestacional não se observou significância estatística nas diferenças encontradas nos dois grupos.

GRANSTROM et al. em 1977 na Finlândia, observaram que o risco de aquisição de infecção perinatal pelo CMV seria maior para o primeiro filho, refletindo talvez uma diferença no processo de reativação de infecção latente em gestações consecutivas<sup>10</sup>. Com relação a este fato, não observamos na nossa amostra que o risco de aquisição da infecção fosse maior para o 1º filho.

A menor idade materna é outro fator de risco para excreção cervical de CMV em mulheres soropositivas, e conseqüentemente, maior chance para o recém-nascido de infecção pelo CMV no período perinatal. Assim, MONTGOMERY et al. e posteriormente CHANDLER et al, demonstraram que as mães com idade inferior a 21 anos excretavam CMV em proporção maior que as mulheres de faixa etária maior<sup>4, 18</sup>. Em nossa amostra não houve diferença estatisticamente significativa entre crianças infectadas e não infectadas com relação à idade materna.

Todas as possíveis associações descritas acima carecem, em nosso meio, de estudos em maior profundidade, com casuística maior, a fim de dimensionar o real papel de cada fator isoladamente e de suas associações.

Dentro do proposto neste estudo, demonstramos que o risco de aquisição de infecção pelo citomegalovírus no período perinatal é alto (30,9%). A grande maioria das crianças infectadas naturalmente pelo CMV apresenta-se de forma assintomática, sem comprometimento do desenvolvimento normal da criança nos primeiros meses de vida. Em raros casos a infecção perinatal pode se apresentar com quadros pulmonares de longa evolução ou predispor ou agravar o curso de uma infecção bacteriana<sup>9, 32</sup>.

A longo prazo, o aparecimento de algum tipo de seqüela, como surdez e deficiência intelectual descritos para a infecção congênita, parece pouco provável para a infecção perinatal, de acordo com os raros estudos de seguimento prolongado<sup>14</sup>. Esta definição, entretanto, depende de novas pesquisas, com maior número de casos e acompanhamento por vários anos, para se estabelecer com precisão a magnitude das conseqüências da infecção perinatal pelo citomegalovírus

## SUMMARY

### **Cytomegalovirus perinatal infection in a public hospital of São Paulo City: a prospective study.**

In order to demonstrate the occurrence of CMV perinatal infection in a middle socioeconomic class population, the authors conducted a 8-month prospective study in 37 children, not infected congenitally, born in a public hospital of São Paulo city. Prevalence of CMV-IgG antibodies in mothers, detected by immunoenzymatic assay (ELISA), was 92.7%. Survival analysis showed that the risk of acquiring CMV perinatal infection diagnosed by virus isolation in human fibroblasts was 30.9%. When the diagnostic method was detection of IgM class antibodies by indirect immunofluorescence the risk was 8.1% ( $p < 0.05$ ). Milk samples inoculated in human fibroblasts failed to demonstrate the presence of virus. The infected children did not present any signal of disease in a 4-month follow-up.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Aduino Castelo Filho, docente da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Escola Paulista de Medicina, pelas sugestões metodológicas.

Ao Prof. Jair Lício Ferreira Santos, professor associado do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela análise estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFORD Jr., C.A. — Cytomegalovirus infection. *Ala. J. med. Sci.*, 22: 169-189, 1985.
2. BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P. & GOTLIEB, S. L. D. — Bioestatística. São Paulo, E. P. U. 1960.
3. BRASFIELD, D. M.; STAGNO, S.; WHITLEY, R. J.; CLOUD, G.; CASSEL, G. & TILLER, R. E. — Infant pneumonia associated with cytomegalovirus, Chlamydia, Pneumocystis, Ureaplasma: follow-up. *Pediatrics*, 79: 76-83, 1987.
4. CHANDLER, S. H.; ALEXANDER, E. R. & HOLMES, K. K. — Epidemiology of cytomegalovirus infection in a heterogeneous population of pregnant women. *J. infect. Dis.*, 152: 249-256, 1985.
5. CHIANG, C. L. — Medical follow-up studies. In: CHIANG, C. L. — *Introduction to stochastic processes in biostatistics*. New York, John Wiley & Sons, 1982.
6. DWORSKY, M.; STAGNO, S.; PASS, R. F.; CASSADY, G. & ALFORD, C. — Persistence of cytomegalovirus in human milk after storage. *J. Pediat.*, 101: 440-443, 1982.
7. DWORSKY, M.; YOW, M.; STAGNO, S.; PASS, R. F. & ALFORD, C. — Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics*, 72: 295-299, 1983.
8. GEHRZ, R. C.; LINNEN, K. M.; CHRISTIANSON, W. R.; OHM, A. E. & BALFOUR Jr, H. H. — Cytomegalovirus infection in infancy: virological and immunological studies. *Clin. exp. Immunol.*, 47: 27-33, 1982.
9. GRANSTROM, M.-L & LEINIKKI, P. — Illnesses during the first two years of life and their association with perinatal cytomegalovirus infection. *Scand. J. infect. Dis.*, 10: 257-264, 1978.
10. GRANSTROM, M.-L, LEINIKKI, P.; SANTAVUORI, P. & PETTAY, O. — Perinatal cytomegalovirus infection in man. *Arch. Dis. Child.*, 52: 354-359, 1977.
11. HO, M. — Characteristics of cytomegalovirus. In: HO, M. — *Cytomegalovirus: biology and infection*. New York, Plenum Medical Book Company, 1982. p. 32.
12. HO, M. — Cytomegalovirus infections and diseases. *Dis. Mth. (Chic.)*, 24: 4-58, 1978.
13. KUMAR, M. L.; NANKERVIS, G. A.; COOPER, A. R. & GOLD, E. — Post-natally acquired cytomegalovirus infections in infants of CMV-excreting mothers. *J. Pediat.*, 104: 669-673, 1984.
14. KUMAR, M. L.; NANKERVIS, G. A.; JACOBS, J. B.; ERNHART, C. B.; GLASSON, C. E.; McMILLAN, P. M. & GOLD, E. — Congenital and post-natally acquired cytomegalovirus infections: long-term follow-up. *J. Pediat.*, 104: 674-679, 1984.
15. LEINIKKI, P.; GRANSTROM, M.-L & PETTAY, O. — Epidemiology of cytomegalovirus infections during pregnancy and infancy. *Scand. J. infect. Dis.*, 10: 165-171, 1978.
16. LEVINSON, E. M.; FOY, H. M.; KENNY, G. E.; WENTWORTH, B. B. & GRAYSTON, J. T. — Isolation of CMV from a cohort of 100 infants through the first year of life. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 132: 957-962, 1969.
17. MELISH, M. E. & HANSHAW, J. B. — Congenital cytomegalovirus infection. Developmental progress of infants detected by routine screening. *Amer. J. Dis. Child.*, 126: 190-194, 1973.
18. MONTGOMERY, R.; YOUNGBLOOD, L. & MEDEARIS Jr., D. N. — Recovery of cytomegalovirus from the cervix in pregnancy. *Pediatrics*, 49: 524-531, 1970.
19. PANNUTI, C. S. — *Infecção congênita pelo citomegalovírus. Estudo em dois hospitais públicos do município de São Paulo*. São Paulo, 1983. (Tese de doutoramento — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
20. PECKHAM, C. S.; JOHNSON, C.; ADES, A.; PEARL, K. & CHIN, K. S. — Early acquisition of cytomegalovirus infection. *Arch. Dis. Child.*, 62: 780-785, 1987.
21. REYNOLDS, D. W.; STAGNO, S. & ALFORD, C. A. — Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. In: LENNETTE, E. H. & SCHMIDT, N. J., ed. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infection*. 5 th. ed, Washington, American Public Health Association, 1979. p. 72.
22. REYNOLDS, D. W.; STAGNO, S.; HUSTY, T. S.; TILLER, M. & ALFORD Jr, C. A. — Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *New Engl. J. Med.*, 289: 1-5, 1973.
23. SIEGEL, S. — *Estatística não paramétrica*. São Paulo, McGraw-Hill, 1975.
24. STAGNO, S.; PASS, R. F.; DWORSKY, M. E. & ALFORD Jr, C. A. — Maternal CMV infection and perinatal transmission. *Clin. Obstet. Gynec.*, 25: 563-576, 1982.
25. STAGNO, S.; PASS, R. F.; REYNOLDS, D. W.; MOORE, M. A.; NAHMIAS, A. J. & ALFORD, C. A. — Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*, 65: 251-257, 1980.
26. STAGNO, S.; REYNOLDS, D. W.; HUANG, E.-E.; THAMES, S. D.; SMITH, R. J. & ALFORD Jr, C. A. — Congenital CMV infection. Occurrence in an immune population. *New Engl. J. Med.*, 296: 1254-1258, 1988.
27. STAGNO, S.; REYNOLDS, D. W.; PASS, R. F. & ALFORD Jr, C. A. — Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *New Engl. J. Med.*, 302: 1073-1076, 1980.

28. STAGNO, S.; REYNOLDS, D. W.; TSIANTOS, A.; FOCILLO, D. A.; LONG, W. & ALFORD, C. A. — Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and nately acquired cytomegalovirus infections. *J. infect. Dis.*, 132: 568-577, 1975.
29. STERN, H. — Isolation of cytomegalovirus and clinical manifestations of infection at different ages. *Brit. med. J.*, 1: 665-669, 1968.
30. VILAS BOAS, L. S.; PANNUTI, C. S.; SUMITA, L. M.; SILVA, M. C. D. & GODOY, C. V. F. — Isolamento de citomegalovírus em 83 amostras de leite materno. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 23. & CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 4., Curitiba, 1987. Programa e resumos. Curitiba, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 1987. p. 115.
31. WEINBERG, A.; BASHAM, T. & MERIGAN, T. C. — Regulation of guinea-pig immune functions by interleukin 2: critical role of natural killer activity in acute HSV-2 genital infection. *J. Immunol.*, 137: 3310-3317, 1986.
32. WHITLEY, R. J.; BRASFIELD, D.; REYNOLDS, D. W.; STAGNO, S.; TILLER, R. E. & ALFORD, C. A. — Protacted pneumonitis in young infants associated with perinatally acquired cytomegaloviral infection. *J. Pediat.*, 89: 16-22, 1976.
- Recebido para publicação em 08/8/1990.  
Aceito para publicação em 21/8/1990.