

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE GENERALI E DEI
SERVIZI**

CICLO XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/H1

Settore Scientifico-Disciplinare: MED/40

**OUTCOMES FETO-NEONATALI
DELL'INFEZIONE MATERNA NON PRIMARIA
DA CYTOMEGALOVIRUS**

Presentata da:

Dott.ssa PUCETTI CHIARA

Relatore:

Chiar.mo Prof. NICOLA RIZZO

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. NICOLA RIZZO

Esame finale anno 2015

INDICE

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. INTRODUZIONE | |
| 1.1 Informazioni generali | 4 |
| 1.2 Epidemiologia | 4 |
| 1.3 Aspetti clinici e patogenesi | 6 |
| 1.4 Diagnosi materna | 8 |
| 1.5 Diagnosi sul feto | 12 |
| 1.6 Diagnosi nel neonato | 15 |
| 1.7 Misure di prevenzione e terapia | 16 |
| 1.8 Background | 18 |
| | |
| 2. MATERIALI E METODI | 19 |
| 3. RISULTATI | 21 |
| 4. DISCUSSIONE | 25 |
| 5. BIBLIOGRAFIA | 31 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Informazioni generali

Il Citomegalovirus (CMV) è uno degli otto virus, appartenenti alla famiglia degli *Herpesviridae*, patogeni per la specie umana.

Il termine “citomegalovirus” coniato da Weller nel 1960, ne riflette i caratteristici effetti citopatici indotti (citomegalia) ed evidenzia il suo ruolo eziologico nella malattia citomegalica da inclusioni (CID, cytomegalic inclusion disease).

I virioni maturi di CMV hanno forma rotondeggiante con un diametro di circa 200nm e sono formati da un involucro lipoproteico, da un tegumento e da un capside icosaedrico. Il genoma virale è rappresentato da DNA bicatenario che contiene più di 200 sequenze in grado di essere trascritte. Il CMV è caratterizzato dall’aver uno spettro d’ospite ristretto, dal replicarsi *in vitro* in fibroblasti della specie ospite naturale, dall’aver *in vivo* un ciclo replicativo lento, dall’indurre inclusioni intranucleari e intracitoplasmatiche e dalla capacità di indurre latenza nelle cellule mononucleate del sangue (CD14+) e nei progenitori midollari (CD34+ e CD33+) ⁽¹⁾.

1.2 Epidemiologia

Nel corso dell’esistenza dal 40 all’80% degli individui nei Paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei Paesi in via di sviluppo, va incontro ad infezione da CMV che di norma evolve senza sintomi e si traduce in una infezione latente. In Italia circa il 70-80% della popolazione adulta risulta provvista di anticorpi CMV specifici.

Si ritiene che gli esseri umani siano l’unico reservoir per il CMV umano. La trasmissione avviene per contatto interumano diretto e più raramente indiretto. Le fonti di infezione includono: secrezioni oro-faringee, urina, secrezioni cervicali e vaginali, sperma, latte materno, lacrime, feci, sangue. La propagazione dell’infezione è favorita

dalla eliminazione molto prolungata del virus e dal fatto che la maggior parte delle infezioni decorre in modo asintomatico o paucisintomatico compatibile, quindi, con una normale vita di relazione del soggetto infetto. Nella popolazione adulta, in particolare nelle donne in età feconda, oltre alla via sessuale, il contatto molto stretto e quotidiano con i bambini gioca un ruolo importante per la diffusione dell'infezione ⁽²⁾.

L'infezione da CMV può essere il risultato di un'infezione primaria o non primaria (riattivazione e reinfezione). Si ritiene che, durante la gravidanza, circa l'1% delle gravide non immuni acquisisca per la prima volta l'infezione e il 5% di coloro con immunità pregressa vada incontro ad una reinfezione/riattivazione da CMV.

CMV è un'importante causa di patologie fetali anche gravi se trasmesso *in utero*, infatti risulta essere la principale causa di infezione congenita nei paesi sviluppati con un'incidenza compresa tra lo 0.3 e il 2.3% di tutti i nati vivi. In Italia l'incidenza è variabile tra lo 0.57 e l'1% ⁽³⁾.

L'incidenza di infezione congenita da CMV è strettamente correlata alla sieroprevalenza materna e al rate di trasmissione che è differente tra infezione materna primaria e non primaria ⁽⁴⁾. In particolare, dove la sieroprevalenza materna è relativamente bassa, l'incidenza di infezione congenita è variabile tra lo 0.6-0.7% dei nati vivi (1 in ogni 100-150 neonati) ⁽⁵⁾. Invece, nei paesi dove la sieroprevalenza materna è più alta sono riportate percentuali di incidenza variabili tra lo 0.9% e il 2.1% ⁽⁶⁻⁹⁾.

Le infezioni materne primarie hanno un impatto clinico globale molto più importante rispetto alle infezioni non primarie ^(10,11).

La trasmissione materno-fetale è legata infatti principalmente all'infezione materna primaria che presenta un rischio di trasmissione variabile tra il 14.2% e il 52.4% (prevalenza combinata 32.4%) ⁽³⁾, percentuali più basse sono osservate nel primo trimestre (~36%) e più alte nel terzo trimestre (~78%) ⁽¹²⁾. I tassi di trasmissione verticale conseguenti ad infezioni non primarie sono stati riportati nello 1-2.2% dei casi, con un rischio di trasmissione quindi, molto più basso di quello delle infezioni primarie ^(3,10).

Dei neonati infettati congenitamente solo il 10-15% circa viene alla luce con sintomatologia evidente; in questi pazienti la mortalità perinatale è del 10% ed importanti sequele neurologiche (prevalentemente difetti dello sviluppo psicomotorio e ipoacusia neurosensoriale) si osservano in circa il 70-80% di quanti sopravvivono ⁽¹³⁾.

L'85-90%, invece, pur essendo infetto, non presenta alla nascita alcuna sintomatologia. L'8-15% di questi, però presenterà segni tardivi in particolar modo difetti uditivi ^(13,14).

L'entità dei danni fetoneonatali, in particolare le severe compromissioni cerebrali, appaiono correlabili prevalentemente all'epoca gestazionale in cui si verifica la trasmissione verticale con un rischio di prognosi fetoneonatale più grave se l'infezione primaria materna è contratta nel primo trimestre di gravidanza ⁽¹⁵⁾. Lo stato sierologico materno e il periodo di gestazione durante il quale viene acquisita l'infezione sono pertanto i fattori che condizionano la possibilità e la severità di infezione congenita da CMV.

1.3 Aspetti clinici e patogenesi

La maggior parte delle infezioni da CMV nelle donne gravide sono asintomatiche. I sintomi, quando presenti, sono aspecifici: febbre persistente (60.2% dei casi), l'astenia (48.8%), la cefalea (26.6%), e la mialgia (15.1%) ⁽¹⁷⁾. Le alterazioni laboratoristiche in fase acuta sono rappresentate da una linfocitosi atipica e da una lieve ipertransaminasemia.

CMV è la causa principale di sordità non genetica nell'infanzia: più del 50% dei nati con infezione sintomatica e circa il 10% degli asintomatici alla nascita svilupperà sordità neurosensoriale variabile tra forme lievi e profonde, con deterioramento progressivo in circa il 50% dei casi. La perdita dell'udito è bilaterale nel 50% dei casi e produce deficit del linguaggio e nell'apprendimento tanto maggiori quanto più la diagnosi risulti ritardata, venendo meno le possibilità riabilitative precoci.

Nei neonati infetti che presentano sintomi alla nascita, il quadro clinico può essere rappresentato da gravi sindromi polivisceritiche caratterizzate da ittero (con quota rilevante di bilirubina diretta), porpora trombocitopenica, epatosplenomegalia,

polmonite ed encefalite. Le forme clinicamente più attenuate includono di solito manifestazioni epatiche con epatosplenomegalia (60% dei casi) ed ittero, trombocitopenia (53-77% dei casi), e ritardo di crescita intrauterino con basso peso neonatale.

Le anomalie strutturali riguardano principalmente il sistema nervoso centrale (ventricolomegalia, calcificazioni intracraniche, atrofia cerebrale, ipoplasia cerebellare, microcefalia), meno frequenti gli altri apparati. Sono riportati in associazione anche difetti visivi e uditivi di varia entità. Il CMV è segnalato anche causa di idrope non immunologica.

Anche i nati asintomatici presentano sequele a distanza in una quota variabile tra l'8 e il 15%, consistenti prevalentemente in difetti dello sviluppo psicomotorio e ipoacusia neurosensoriale di grado variabile e, tipicamente, ad insorgenza anche tardiva.

La trasmissione verticale avviene durante la fase di viremia materna, con colonizzazione della placenta e successiva disseminazione ematogena fetale. Il CMV si replica negli organi fetali bersaglio ed in particolar modo nel rene, venendo successivamente escreto con l'urina nel liquido amniotico che poi verrà ingerito dal feto con conseguente colonizzazione dell'orofaringe.

Non è ancora chiaro come il CMV infetti la placenta e alcune ipotesi sono state formulate sia per quanto riguarda il passaggio transplacentare nell'infezione primaria che nell'infezione non primaria ⁽¹⁸⁾.

In particolare, in caso di infezione primaria un primo modello ipotizza che i leucociti materni veicolanti il virus infettino le cellule endoteliali dei vasi uterini e che queste cellule possano quindi infettare i citotrofoblasti dei villi di ancoraggio. I citotrofoblasti infettati a loro volta possono trasmettere CMV ai fibroblasti e alle cellule endoteliali dei capillari fetali, raggiungendo quindi il sangue fetale ⁽¹⁸⁾. Un secondo modello ipotizza che il virus veicolato dai leucociti materni circolanti nello spazio intervilloso possa raggiungere lo stroma dei villi attraverso delle brecce presenti nello strato di sinciziotrofoblasto. Infine un'ultima ipotesi riguarda la possibile trasmissione del CMV nella forma di immunocomplesso (virione coattato all'anticorpo

materno) attraverso lo strato di sinciziotrofoblasto con un processo di transitosi, simulando il trasporto di IgG materne nel sangue fetale ⁽¹⁸⁾.

Nel caso in cui invece l'infezione è un'infezione non primaria, le ipotesi più accreditate sostengono che il virus latente nei macrofagi della parete uterina può riattivare con ripresa della fase replicativa e neoproduzione di patogenie virale. A questo punto il virus può infettare i citotrofoblasti invasivi e quindi per via inversa raggiungere lo stroma dei villi, le cellule endoteliali fetali e quindi infettare il feto. Questo ipotetico modello evidenzia comunque come la placenta sia una complessa struttura morfo-funzionale che probabilmente induce a livello dell'utero immunosoppressione e in conseguenza a ciò molto frequenti possono essere le riattivazioni in questa sede.

Alcuni studi sulle placente hanno dimostrato che vi sono modificazioni istologiche specifiche quali: fibrosi dei villi, calcificazioni, infiltrazione leucocitaria. I depositi di fibrina ed i danni al sinciziotrofoblasto, provocano un minor contatto con il sangue materno. La vasculopatia trombotica e la conseguente avascolarizzazione villare, porta ad un minor apporto di sostanze nutritive ed ossigeno alla circolazione fetale ⁽¹⁵⁾.

L'effetto diretto del CMV sulla placenta comporterebbe pertanto un'insufficienza placentare che spiegherebbe anche come alcuni sintomi dell'infezione congenita da CMV, in particolar modo i danni cerebrali, possano essere non solo conseguenza diretta di replicazione del virus in organo ma anche correlati all'ipossia fetale.

1.4 Diagnosi materna

Il Decreto Ministeriale DPR 245 del 10.09.1998 attualmente in vigore, non prevede la partecipazione del SSN ai costi delle prestazioni specialistiche riferibili all'infezione da CMV da eseguire pre e durante la gravidanza.

Le linee guida sulla gravidanza fisiologica pubblicate nel novembre 2010 e revisionate a settembre 2011 (Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità e CeVEAS) non prevedono l'offerta dello screening sierologico per CMV a tutte le

donne in gravidanza, ma solo a quelle in condizioni di rischio, cioè alle donne che sviluppano una malattia simil-influenzale durante la gravidanza, alle lavoratrici sieronegative che hanno in custodia dei bambini, alle donne in gravidanza che hanno un bambino in asilo nido o dopo il rilevamento dei segni ecografici indicativi di infezione da CMV.

Tuttavia, esiste di fatto uno “screening” spontaneo e disomogeneo nelle varie realtà regionali che implica un corretto iter di gestione delle gravidanze complicate dall’infezione da CMV.

A tal fine nel 2012 una consensus di esperti italiani ha espresso un documento in cui si trovano delineati i percorsi diagnostico assistenziali per una corretta gestione di alcune infezioni in gravidanza inclusa l'infezione da CMV. ⁽⁴⁴⁾

1.4.1 Diagnosi sierologica

Diagnosi sierologica prima del concepimento. In caso di assenza di anticorpi CMV-specifici (IgG neg e IgM neg), la paziente risulta suscettibile all’infezione pertanto deve essere informata relativamente a semplici norme comportamentali ed igieniche che sono in grado di ridurre la possibilità di contagio. La presenza nel siero di anticorpi IgG specifici e l’assenza di anticorpi IgM sono indicative di infezione pregressa e non prevedono ulteriori accertamenti.

Donne sieronegative per CMV almeno 6 mesi prima del concepimento. Se al primo controllo la gravida presenta anticorpi IgG e IgM anti CMV negativi, essa risulta suscettibile all’infezione e perciò a rischio di acquisire l’infezione primaria. La gravida, pertanto, deve innanzitutto essere informata relativamente a semplici norme comportamentali ed igieniche che sono in grado di ridurre la possibilità di contagio. La gravida sieronegativa dovrebbe quindi essere sottoposta ad indagini sierologiche periodiche. Pur non esistendo linee guida al riguardo, sembra ragionevole il controllo mensile fino a 18-20 settimane di età gestazionale per consentire, in caso di sieroconversione, la messa in atto degli accertamenti sul feto. Se la sieronegatività materna persiste, i controlli sierologici possono essere dilazionati o ridotti ad un solo

controllo a 35-37 settimane di età gestazionale per consentire, in caso di sieroconversione tardiva, di selezionare i neonati a rischio di infezione congenita.

Donne sieropositive per CMV prima del concepimento. Se invece al primo prelievo gli anticorpi IgG specifici risultano positivi con contemporanea assenza di anticorpi IgM, il quadro sierologico è indicativo di infezione pregressa e non prevede ulteriori accertamenti. Infatti, anche se non completamente protettiva, l'immunità acquisita mette al riparo dall'infezione primaria in gravidanza che comporta il maggior rischio per il feto, mentre l'eventualità di reinfezione o riattivazione -pur non escludibile nel corso della gravidanza stessa- comporterebbe un rischio prospettico di danno fetale non superiore a quello insito nello stato gravidico di per sé.

Donne sieropositive per IgM e sieronegative per IgG anti-CMV. Nel caso il cui il primo esame mostri una positività per le IgM con una negatività per le IgG, è consigliato ripetere il controllo sierologico nello stesso laboratorio a distanza di 10-15 giorni per valutare una eventuale sieroconversione delle IgG che insieme alla conferma delle IgM è sufficiente alla diagnosi di infezione primaria in atto. Al contrario, la persistenza di positività delle IgM con IgG negative equivale ad una falsa positività o una reazione crociata ad altre infezioni (*Parvovirus*, *Toxoplasma gondii*, Virus Epstein-Barr, ecc) o stimolazioni aspecifiche del sistema immunitario indotte da malattie autoimmuni. Pertanto la paziente risulta suscettibile al CMV e quindi deve essere informata relativamente a semplici norme comportamentali ed igieniche atte ad evitare il contagio e continuare i controlli sierologici periodici.

La sieroconversione rappresenta certamente la situazione di più facile interpretazione diagnostica. Gli ulteriori test sulla madre mirano alla conferma della diagnosi di infezione primaria materna.

Donne sieropositive per IgG e IgM anti CMV e che non conoscono il loro stato sierologico pre-gravidico. Più complicato è invece l'inquadramento clinico nel caso il primo prelievo in gravidanza mostri una positività sia per le IgG sia per le IgM in donne che non conoscono il proprio stato sierologico pregravidico. La maggior parte delle infezioni sono asintomatiche anche durante la fase acuta e quindi, l'unica soluzione per distinguere le gravide con infezione primaria da quelle con infezione

non-primaria è quella di sottoporle durante la gestazione (più precocemente possibile) ad una serie di esami specifici.

I test di approfondimento sono rappresentati da:

- **Indice di Avidità delle IgG (IgG avidity)**. L'avidità di un anticorpo indica la sua funzionale affinità per l'antigene. Visto che l'avidità delle IgG per il reagente di laboratorio aumenta con il tempo trascorso dal primo contatto con il virus, una bassa avidità è indice di infezione recente, viceversa un'alta avidità indica un'infezione pregressa. Occorrono in media circa 18-20 settimane dall'inizio dell'infezione primaria da CMV affinché il sistema immunitario produca anticorpi IgG completamente maturi e quindi ad alta avidità^(19,20). L'efficacia diagnostica del test di avidità per escludere una infezione primaria nella prima parte della gravidanza è ottimale qualora la determinazione avvenga precocemente, non oltre le 12-16 settimane di età gestazionale, in relazione ai valori di riferimento del saggio utilizzato^(20,21). La presenza di una bassa-moderata avidità degli anticorpi IgG specifici per il CMV è sempre suggestivo di infezione primaria recente indipendentemente dall'epoca gestazionale.

- **Western Blot (WB)**. Rappresenta il test di eccellenza per la conferma degli anticorpi specifici IgM. Questo test immunoenzimatico, che utilizza quattro proteine virali (vp150, vp82, vp65, vp28) purificate da particelle virali e quattro proteine ricombinanti (rp150, rp130, rp32, rp38) purificate da E. Coli, permette di confermare la presenza degli anticorpi sia di tipo G che di tipo M e, inoltre, di distinguere tra infezione primaria e non primaria per la diversa reattività che gli anticorpi presentano verso le singole proteine strutturali e non del virus^(22,23). Mentre il test di avidità è ormai entrato nell'uso corrente e ha ormai un'ampia diffusione, il WB resta a tutt'oggi ad appannaggio di pochi laboratori di riferimento.

1.4.2 Diagnosi virologica

La ricerca del virus e/o dei suoi componenti nel sangue o in altri liquidi biologici nelle donne in gravidanza rivestono un ruolo secondario per la diagnosi di infezione primaria da CMV⁽¹⁶⁾.

Nelle donne in gravidanza con accertata infezione primaria da CMV il virus nel sangue materno può essere ritrovato come non esserlo. In caso di positività nel sangue il risultato conferma la diagnosi di infezione primaria. In caso di negatività il risultato non esclude l'infezione primaria ^(16,24). La presenza del virus nel sangue mediante test dell'antigenemia e/o Real Time PCR non correla né con l'andamento clinico dell'infezione, né con un maggior rischio di trasmissione intrauterina e neppure con la severità di compromissione del feto/neonato ^(16,24).

1.5 Diagnosi sul feto

Per lo studio del compartimento fetale ci si può avvalere della diagnostica prenatale invasiva e dell'esame ecografico. In relazione al più alto rischio di trasmissione madre-feto e di danno fetale, la diagnosi prenatale viene proposta alle donne che hanno contratto l'infezione primaria da CMV nella prima metà della gravidanza (documentata da sieroconversione anticorpale o da test sierologici avanzati) e in caso di anomalie fetali suggestive di infezione.

Amniocentesi

La diagnosi prenatale invasiva viene effettuata mediante amniocentesi e prevede un prelievo di liquido amniotico a non meno di 20 settimane di gestazione e comunque ad almeno 6-8 settimane dal presunto contagio materno. Essa è finalizzata a documentare l'eventuale interessamento del feto attraverso l'individuazione del virus e/o del DNA virale nel liquido amniotico ^(25,26). Viene in tal modo data l'opportunità di proseguire la gestazione con tranquillità in caso di risultato negativo o eventualmente di optare per l'interruzione volontaria di gravidanza qualora si ravvisino le condizioni di alto rischio fetale. Si tratta di una tecnica invasiva con un rischio aggiuntivo di aborto <1%.

CMV è un virus a lenta replicazione e si calcola che occorrono circa 6-8 settimane dopo l'infezione materna affinché il virus infetti la placenta, arrivi al sangue fetale e tramite il sangue invada e si replichi produttivamente negli organi bersaglio. Sede elettiva di replicazione è il rene e il virus viene così eliminato con la diuresi

fetale nel liquido amniotico; dopo le 20 settimane di età gestazionale il feto produce quantità sufficienti di urina tali da permettere di rilevare il virus nel liquido amniotico. Quando la diagnosi prenatale è stata eseguita in epoche gestazionali più precoci, sono stati osservati frequentemente risultati falsi negativi dovuti alla scarsa eliminazione del virus attraverso il rene fetale, a causa proprio della ridotta diuresi ⁽²⁷⁾.

Sul liquido amniotico si eseguono due analisi:

- isolamento virale per la ricerca diretta del virus infettante;
- PCR per la ricerca e quantificazione del genoma virale (PCR Real Time).

La positività ad uno o più test eseguiti su liquido amniotico indica infezione congenita (valore di predittività positiva = 100%) ^(27,28). La negatività a tutti i test eseguiti non esclude un risultato falso negativo (valore di predittività negativa = 94.2%) ^(28,29).

Quantità elevate di virus nel liquido amniotico non associate ad anomalie ecografiche (ad esempio quantità superiori a 10^5 - 10^6 copie/ml) tendenzialmente sono riferibili a feti/neonati affetti da severe infezioni. Questa correlazione però non è assoluta in quanto nel 40-50% dei casi le infezioni congenite risultano asintomatiche alla nascita e durante il follow up neonatale nonostante l'elevato carico virale nel liquido amniotico ⁽³⁰⁾. Quantità elevate di virus nel liquido amniotico, se associate ad esami ecografici francamente patologici, assumono invece validità prognostica nell'individuare i feti/neonati infetti a rischio di sintomatologia clinica severa.

Il ruolo della cordocentesi a scopo diagnostico sembra essere secondario, mentre può avere una valenza in termini prognostici ^(31,32). I test sierovirologici (CMV-IgM e CMV-DNA) e biochimici (conteggio piastrine, transaminasi e gamma GT) eseguiti sul sangue fetale raggiungono la loro massima sensibilità prognostica se il prelievo di sangue viene eseguito dopo le 30 settimane di gestazione ⁽³²⁾.

Recentemente alcuni dati in letteratura hanno osservato come una valutazione di più parametri sierovirologici, ematologici e biochimici del sangue fetale, prelevato in 20-21 settimane di età gestazionale, acquisisca maggiore predittività prognostica ⁽³³⁾. Tuttavia, sono necessarie casistiche più ampie per validare la sensibilità e l'efficacia

prognostica di questa particolare valutazione condotta in un precoce periodo gestazionale.

Esame sonografico

L'esame ecografico può evidenziare anomalie strutturali (ventricolomegalia, iperecogenicità cerebrale, alone ecogeno periventricolare, cisti subependimali, sinechia intraventricolare, calcificazioni intracraniche, lissencefalia, ipoplasia cerebellare, microcefalia, intestino iperecogeno, calcificazioni epatiche, oligoidramnios, polidramnios, epatosplenomegalia, ascite e meno frequentemente anomalie cardiache)⁽³⁴⁾ e/o dell'accrescimento riconducibili all'infezione da CMV, ma a fronte del vantaggio della non invasività ha il limite di una bassa sensibilità anche in mani esperte. Ormai è correntemente accettato che l'ecografia, eseguita a 20-21 settimane di età gestazionale, identifichi non più del 20% dei feti infetti⁽³⁵⁻³⁸⁾

Un'anomalia strutturale può essere evidenziata tardivamente dopo precedenti controlli negativi e viceversa anomalie strutturali borderline riscontrate precocemente in gravidanza possono essere del tutto transitorie. Un reperto ecografico normale è certamente rassicurante per la gravida ma non predittivo di normalità alla nascita; un reperto francamente patologico (ad esempio calcificazioni cerebrali multiple, ventricolomegalia, idrocefalia, idrotorace, ascite ect.) correla significativamente con una prognosi sfavorevole⁽³⁵⁻³⁸⁾, in particolare quando sia noto lo stato di infezione del feto.

Il primo controllo ecografico non dovrebbe essere eseguito prima di 6 settimane dal presunto contagio materno. In generale, per le infezioni del primo trimestre è fondamentale l'ecografia delle 20-21 settimane di età gestazionale, epoca in cui vengono studiate le strutture fetali con particolare attenzione al sistema nervoso centrale, all'apparato gastro- enterico e ad alterazioni del liquido amniotico in quanto sedi delle più frequenti anomalie riferibili all'infezione da CMV⁽³⁶⁻³⁹⁾. Oltre al controllo morfologico a 20-21 settimane di età gestazionale sono indicati controlli ecografici successivi (a 27-29 e 30-32 settimane di età gestazionale) per identificare

alterazioni dell'accrescimento intrauterino fetale (IUGR) e/o sviluppo tardivo di anomalie strutturali ⁽³⁹⁻⁴²⁾.

1.6 Diagnosi nel neonato

Il metodo di riferimento per la diagnosi di infezione congenita da CMV nel neonato è l'isolamento del virus eseguito su colture di fibroblasti embrionali umani oppure la ricerca del DNA virale mediante PCR Real Time, ambedue eseguiti in campioni di urina raccolti entro le prime 2 settimane di vita. Particolare attenzione deve essere posta se per la diagnosi di infezione congenita viene utilizzato un campione di saliva al posto di quello delle urine in quanto elevato è il rischio di contaminazione da parte del latte materno potenzialmente infetto.

Per quanto riguarda la diagnosi sierologica, la presenza di IgM CMV-specifiche su siero neonatale identifica un'infezione congenita però si deve sottolineare che le IgM vengono ritrovate solo nel 20-70% dei neonati infetti in relazione proprio al test sierologico utilizzato ⁽¹⁶⁾.

In caso di risultato negativo sull'urine dell'isolamento virale o della PCR Real Time, considerando l'elevata sensibilità di questi test ed il carico virale generalmente elevato e protratto nel tempo, il paziente non è da ritenere infetto e l'esame non merita di essere ripetuto. Al contrario, in caso di positività dell'isolamento virale o della PCR Real Time, il neonato deve essere sottoposto ad accurata valutazione clinica, nonché ad una serie di accertamenti diagnostici strumentali e laboratoristici per definire se è sintomatico o asintomatico, condizioni con implicazioni terapeutiche e valenza prognostica notevolmente differenti. Per queste ragioni tutti i neonati infetti (anche se asintomatici) meritano di essere sottoposti a follow-up con controlli seriati e variamente modulati a seconda delle problematiche del caso indicativamente a 1, 3, 6, 12 mesi di vita, e poi annualmente e comunque fino all'età scolare. Questi controlli prevedono valutazioni clinico-auxologiche, audiometriche e dello sviluppo psicomotorio, *fundus oculi*, prelievi ematici per alcuni esami di laboratorio (transaminasi, emocromo con formula e piastrine, bilirubina totale e frazionata, PCR

Real Time per CMV) ed eventualmente raccolte di campioni di urina per la determinazione e quantificazione di CMV mediante isolamento virale e PCR Real Time, indispensabili in caso di terapia.

1.7 Misure di prevenzione e terapia

Un vaccino per CMV dovrebbe prevenire l'infezione primaria nelle donne in gravidanza e di conseguenza l'infezione congenita da CMV. A questo riguardo i primi dati su uno studio pubblicato nel 2009 da Pass et al.⁽⁴³⁾ sono incoraggianti, ma richiedono una maggiore numerosità di popolazione da studiare. Fino a quando non sarà disponibile un vaccino di provata utilità, la prevenzione dell'infezione nella gravida può avvalersi unicamente di alcune norme igienico-comportamentali volte ad evitare le possibili fonti di contagio rappresentate soprattutto dai bambini piccoli⁽⁴⁴⁾.

Per quanto riguarda la terapia prenatale, attualmente non sono ancora disponibili farmaci di comprovata efficacia utilizzabili al fine di ridurre il rischio di trasmissione verticale o curare il feto in utero.

Nel 2005 Nigro et al. hanno riportato che la somministrazione di Immunoglobuline iperimmuni CMV-specifiche (HIG) in donne gravide con infezione primaria da CMV era in grado di ridurre significativamente sia l'incidenza della trasmissione in utero (effetto preventivo) dal 40% al 16% ($P=0.04$) che delle infezioni congenite sintomatiche (effetto terapeutico) dal 50% al 3% ($P<0.01$)⁽⁴⁵⁾. Successivamente sono stati riportati altri casi di somministrazione di HIG a scopo terapeutico in gestanti con feti sintomatici⁽⁴⁶⁻⁵⁹⁾.

Per questo motivo a settembre 2009, ha preso avvio uno studio multicentrico prospettico, randomizzato, in doppio ceco, farmaco versus placebo, per la valutazione dell'efficacia e della sicurezza della somministrazione di immunoglobuline CMV-specifiche iperimmuni in donne gravide con infezione primaria (studio italiano C.H.I.P., Congenital HCMV Infection Prevention). Lo studio non ha tuttavia dimostrato una significativa riduzione della trasmissione verticale nelle donne che assumevano le immunoglobuline rispetto al gruppo di controllo⁽⁵⁰⁾.

Già da molti anni nelle donne in gravidanza con infezione da CMV, è stata esclusa la possibilità di utilizzo del ganciclovir per la sua potenziale tossicità e mutagenità. Sono in fase di studio altri farmaci antivirali (valaciclovir, profarmaco-estere dell'aciclovir) che potrebbero avere una bassa tossicità fetale ⁽⁵¹⁾.

Il management del bambino con infezione congenita da CMV si basa su una corretta e precoce diagnosi di infezione e sulla definizione dell'estensione della malattia. In base a questi dati viene valutata l'opportunità di intraprendere il trattamento antivirale dopo adeguata informazione della famiglia, che conduca alla raccolta di un consenso informato scritto ed alla pianificazione del follow-up.

Ad oggi non vi è indicazione al trattamento terapeutico in caso di infezione congenita da CMV asintomatica.

Nel 2003 uno studio di fase III randomizzato e controllato ⁽⁵²⁾ ha dimostrato che il trattamento ev con ganciclovir (GCV) (Cymevene® iv Fl+F 500mg/10ml RECORDATI, Citovirax iv FL 500mg/10ml, ROCHE) per 6 settimane delle infezioni congenite sintomatiche con coinvolgimento del SNC (microcefalia, calcificazioni intracraniche, anomalie del liquido cefalo-rachidiano, corioretinite e/o deficit uditivi) previene il deterioramento della funzione uditiva e psico-motoria dei bambini infetti. La terapia antivirale, inoltre, ha dimostrato migliorare anche l'outcome neurologico a distanza ⁽⁵³⁾. In questi casi, il trattamento deve essere iniziato precocemente e possibilmente entro il primo mese di vita. Attualmente non vi sono dati derivabili da trial clinici randomizzati circa il trattamento iniziato dopo il mese di vita in caso di infezione congenita, con sintomi (tipicamente l'ipoacusia) insorti dopo questa età o con diagnosi retrospettiva. Vi sono tuttavia a riguardo singole esperienze positive ⁽⁵⁴⁾. Nel trattamento dell'infezione congenita sintomatica sono stati usati al momento il GCV ev (6 mg/Kg ogni 12 ore per 6 settimane) e il suo pro farmaco Valganciclovir (V-GCV) per os (16 mg/kg ogni 12 ore per 6 settimane) sotto forma di sciroppo (Valcyte os polv fl 12g 50mg/ml, ROCHE); entrambi i farmaci agiscono inibendo la replicazione del virus *in vitro* ed *in vivo*. In corso di terapia con GCV o V-GCV sono stati segnalati vari effetti collaterali (comparsa di leucopenia, neutropenia, anemia, trombocitopenia, pancitopenia).

Alcuni esperti hanno opinioni divergenti sul fatto di considerare la sola ipoacusia come espressione del coinvolgimento del SNC ⁽⁵⁵⁾. Tuttavia sono riportate esperienze significative e molto incoraggianti ⁽⁵⁶⁾, di trattamento antivirale in bambini con infezione congenita da CMV che hanno manifestato clinicamente ipoacusia isolata ⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾: dunque, in questi casi vi è l'indicazione al trattamento con antivirali.

1.8 Background

Si stima che ogni anno, in Europa e in USA, circa lo 0,6-1% dei neonati nasca con infezione congenita da CMV ^(5,60). L'infezione congenita da CMV può essere conseguenza di una infezione acquisita per la prima volta in gravidanza oppure di una infezione non primaria, conseguenza di una riattivazione del virus latente o di una reinfezione con un virus di un ceppo diverso.

La trasmissione verticale è più frequente nell'infezione primaria con un rischio di circa il 32,4% dei casi mentre nell'infezione non primaria si attesta attorno all'1,4% (1,1-1,7%) dei casi ⁽³⁾.

Storicamente la preesistente immunità materna è stata considerata in grado di ridurre la probabilità di infezione congenita sintomatica (anomalie specie a carico del SNC e/o polivisceriti) e di sequele a distanza (es. difetti uditivi o ritardo psicomotorio); dati più recenti tuttavia indicano che anche l'infezione non primaria può essere causa di infezione congenita severa.

Lo scopo di questo studio è di valutare il rischio di trasmissione verticale e le conseguenze dell'infezione congenita in caso di infezione non primaria e di compararle con l'outcome delle gravidanze complicate da infezione primaria.

2. MATERIALI E METODI

Studio retrospettivo di coorte di 2882 gravide che si sono rivolte al nostro Ambulatorio di Malattie Infettive (Ostetricia e Medicina Età Prenatale, Ospedale Sant'Orsola Malpighi, Bologna), tra Gennaio 2000 e Dicembre 2013, per eseguire esami di approfondimento in seguito a sospetta infezione da CMV in gravidanza.

Il protocollo diagnostico è basato sulla rideterminazione delle IgG e IgM CMV-specifiche mediante enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e la conferma delle IgM mediante immunoblot combinato con la determinazione dell'avidità IgG anti-CMV^(24, 61).

La diagnosi di infezione primaria è stata effettuata in presenza di bassa o moderata avidità anti-CMV IgG associata alla positività delle IgM con immunoblot o in caso di sierconversione; in caso di alta avidità anti-CMV IgG e positività delle IgM con immunoblot è stata posta invece diagnosi di infezione non-primaria. In caso di negatività di entrambi gli anticorpi specifici la paziente è stata definita recettiva, in presenza di IgG positive ed IgM negative immune, mentre i risultati sono stati classificati come indefiniti quando la ricerca delle IgM mediante immunoblot non discriminava il tipo di infezione.

Le donne con diagnosi di infezione primaria e non primaria in gravidanza hanno eseguito un counselling riguardo il rischio di trasmissione verticale, i possibili danni feto-neonatali e la validità degli esami prenatali. Le pazienti che hanno scelto di sottoporsi alla diagnosi prenatale sono state informate sui risultati dell'amniocentesi e/o dell'esame ecografico e i risultati degli stessi sono stati discussi insieme alla coppia. Le donne che hanno scelto di proseguire la gravidanza sono state invitate a controllare i bambini durante la prima settimana di vita mediante l'isolamento del virus nelle urine mediante saggio di "shell vial".

A coloro che hanno scelto l'interruzione di gravidanza del secondo trimestre è stato chiesto il permesso di eseguire esami istologici sui tessuti fetali in sede di autopsia.

Tutte le donne con diagnosi sierologica di infezione primaria e non primaria sono state sottoposte ad esame ecografico morfologico di secondo livello a 20-21 settimane di gestazione e ad almeno 6 settimane dal presunto inizio dell'infezione con sonda settoriale 5 MHz transaddominale e transvaginale, per l'identificazione di anomalie associate alla probabile infezione in utero. Dopo aver dato consenso informato formulato per iscritto, tutte le donne che hanno scelto la diagnosi prenatale invasiva sono state sottoposte ad amniocentesi a mano libera sotto guida ecografica dopo la 20-21a settimana di gestazione e ad almeno 6 settimane dall'inizio dell'infezione con prelievo di 20 ml di liquido amniotico. Nei casi con risultati positivi sul liquido amniotico è stato eseguito un dettagliato esame ecografico ogni 4 settimane. La presenza di CMV nel liquido amniotico è stata determinata mediante isolamento rapido ("shell vial") ed evidenziazione di DNA virale (Real Time PCR). Il valore limite della metodica era di 500 copie/ml di liquido amniotico.

Informazioni sulle condizioni dei feti e dei neonati sono state ottenute direttamente quando le madri hanno interrotto la gravidanza o partorito nel Nostro Reparto. Se le madri hanno espletato il parto in altra sede le informazioni sono state ottenute mediante questionario che era stato consegnato loro prima del parto.

Lo stato infettivologico dei neonati è stato classificato in base all'isolamento virale nelle urine mediante saggio di "shell vial" durante le prime due settimane di vita. I neonati infetti sono stati classificati in sintomatici o asintomatici in base alla presenza/assenza di segni e/o sintomi legati all'infezione congenita.

I feti sono stati classificati non infetti se l'esame autoptico non riscontrava virus negli organi; positivi asintomatici se il virus era presente negli organi escluso il sistema nervoso centrale e positivi sintomatici in caso di interessamento virale cerebrale ⁽⁶²⁾.

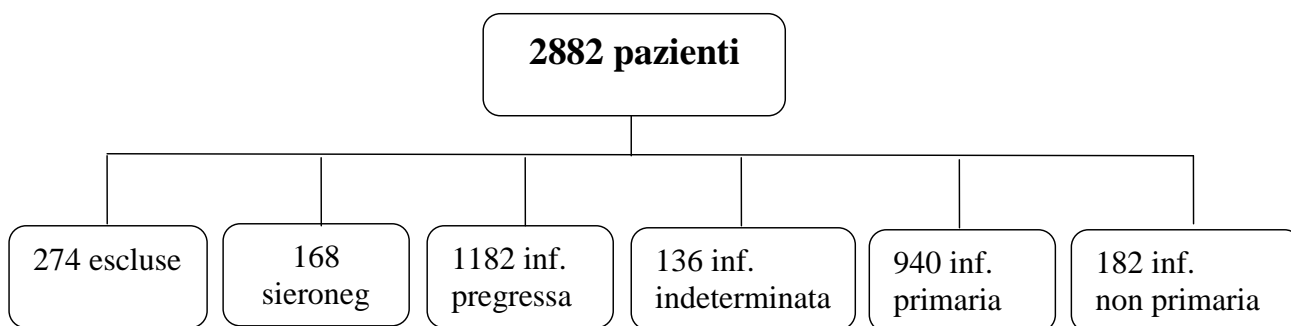
I risultati sono presentati come percentuale per le variabili categoriche. Le variabili categoriche sono state comparate usando il Wilcoxon e Fisher's exact test. E' stato definito statisticamente significativo in presenza di p-value <0,05.

3. RISULTATI

Su 2882 gravide con sospetta infezione da CMV, 274 sono state escluse dallo studio: 41 perchè trattate durante la gravidanza con immunoglobuline, 14 per aborto spontaneo, 51 per interruzione volontaria del primo trimestre, 6 per morte endouterina fetale e 162 sono state perse al follow-up (incusi i casi di interruzione volontaria di gravidanza del II trimestre che non hanno acconsentito all'esame autoptico).

Delle 2608 rimanenti, 168 sono risultate sieronegative alle indagini di approfondimento, 1182 con infezione pregressa, 136 con uno stato sierologico "indeterminato", 940 con infezione primaria e 182 con infezione non primaria (Fig. 1).

Figura 1. Pazienti con infezione sospetta da CMV

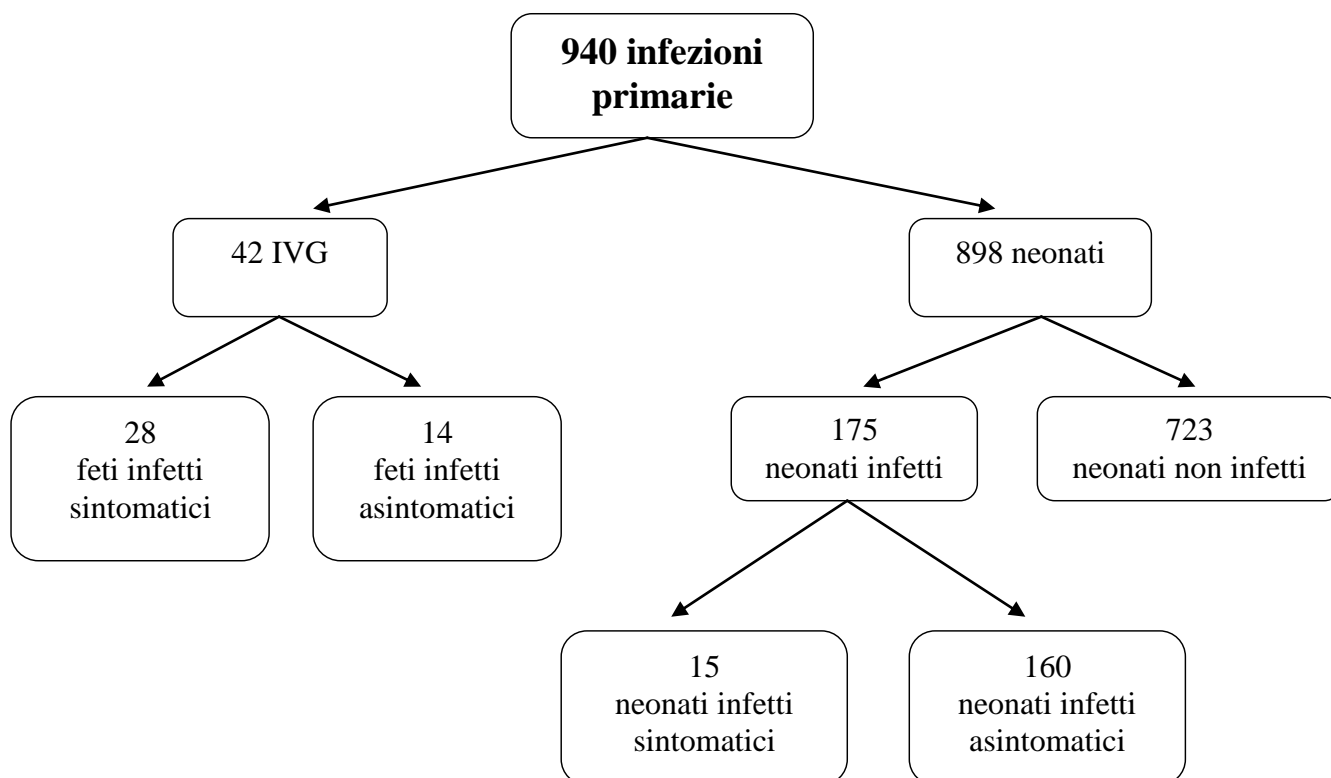


Un totale di 1122 pazienti incluso nello studio è stato diviso in due gruppi: 940 (83,7%) con infezione primaria e 182 (16,4%) con infezione non primaria.

L'infezione era stata contratta nel I trimestre nel 96,1% e nel 98,3% rispettivamente dei casi di infezione primaria e non primaria.

Tra i 940 casi di infezione primaria, 42 pazienti hanno deciso di terminare la gravidanza dopo gli esami di approfondimento. Duecentodiciassette feti/neonati (23%) sono risultati infetti all'autopsia o alla nascita e 43 (19,8%) di loro erano sintomatici (Fig. 2).

Figura 2. Infezioni primarie



In particolare, 28 (66,6%) dei 42 feti abortiti, all'autopsia presentavano interessamento cerebrale dell'infezione da CMV. Tra gli 898 neonati, 15 (8,5%) tra i 175 infetti erano sintomatici (Tab.1).

Tabella 1. Infezione primaria: neonati infetti sintomatici

| | Ecografia prenatale | Amniocentesi (isolamento virale, qPCR) | Follow-up neonatale |
|--------|----------------------------|---|----------------------------|
| Caso 1 | normale | Pos, 1.800.000 | Epatite alla nascita |
| Caso 2 | normale | Pos, 190.000 | Piastrinopenia |
| Caso 3 | normale | Non eseguita | Ipoacusia bilaterale |
| Caso 4 | normale | Pos, 1.000.000 | Corioretinite |
| Caso 5 | normale | Pos, 100.000 | Ipoacusia grave bilaterale |

| | | | |
|---------|---|----------------|---|
| Caso 6 | Ventricolomegalia cerebrale e iperecogenità intestinale | Pos, 100.000 | Diffuse aree di microcalcificazioni cerebrali, epatosplenomegalia, corioretinite, ritardo mentale |
| Caso 7 | normale | Non eseguita | Convulsioni |
| Caso 8 | Intestino iperecogeno e ventricolomegalia | Non eseguita | Sordità monolaterale |
| Caso 9 | normale | Pos, 1250000 | Sordità bilaterale |
| Caso 10 | normale | Non eseguita | Cicatrice oculare monolaterale |
| Caso 11 | normale | Pos, 550000 | Ipoacusia bilaterale |
| Caso 12 | normale | Pos, > 5000000 | Ipoacusia monolaterale |
| Caso 13 | normale | Pos, 5.500.000 | Ipoacusia monolaterale |
| Caso 14 | normale | Pos, 250000 | Lieve ipoacusia bilaterale |
| Caso 15 | normale | Non eseguita | Sordità bilaterale |

Per quanto riguarda i 182 casi con infezione non primaria, una paziente ha optato per l'interruzione di gravidanza dopo riscontro ecografico di agenesia del corpo calloso e il feto è stato considerato non infetto all'esame autoptico. Sette (3,8%) dei 182 casi sono risultati infetti alla nascita e tre di loro (42,8%) erano sintomatici (Fig.3). Di questi 3 sintomatici, due presentavano quadri ecografici prenatali patologici (Tab.2). La figura 4 mostra l'alone iperecogeno periventricolare cerebrale in sezione longitudinale e frontale e la banda aderenziale del corno posteriore del ventricolo cerebrale (intraventricular adhesion), riscontrata a 22 settimane di gravidanza nel secondo caso.

Considerando i nati vivi e i feti abortiti, la trasmissione verticale nell'infezione primaria era del 23% (217 feti/neonati su 940) mentre si attestava al 3,8% nell'infezione non primaria (7 su 182).

Tra gli infetti, erano sintomatici 43 (19,8%) e 3 (42,8%) rispettivamente nell'infezione primaria e non primaria.

Figura 3. Infezioni non primarie

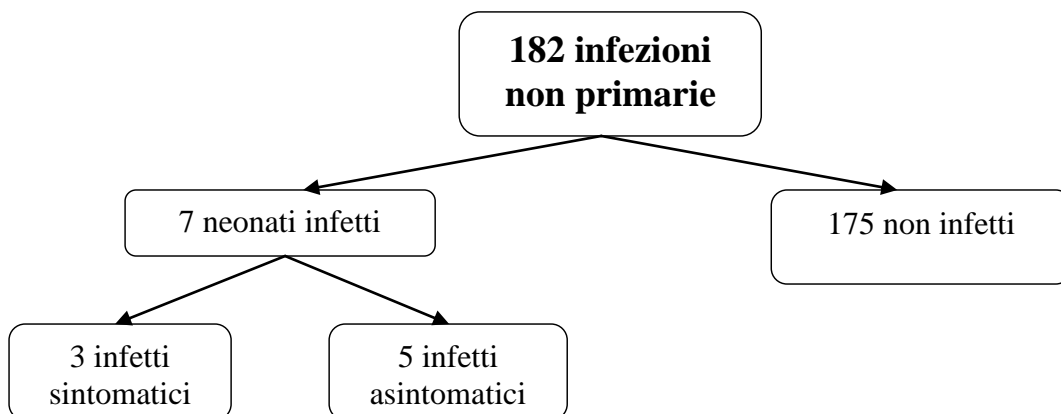
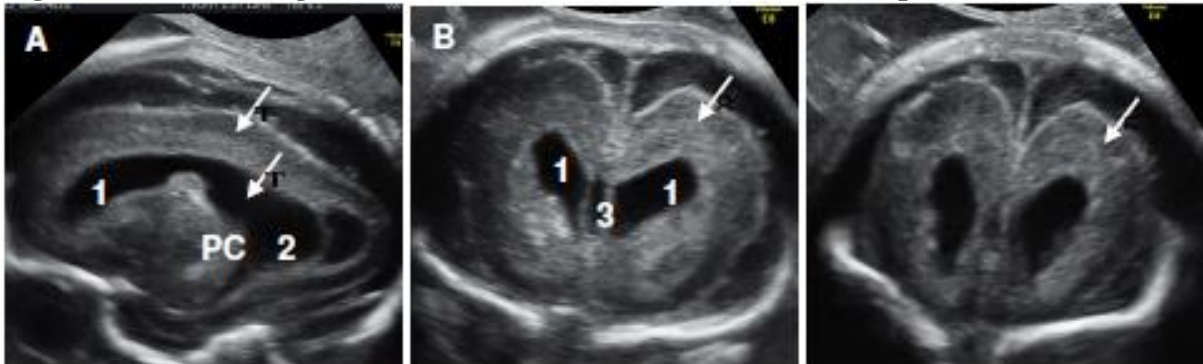


Tabella 2. Infezione non primaria: neonati infetti sintomatici

| | Ecografia prenatale | Amniocentesi (isolamento virale, qPCR) | Follow-up neonatale |
|--------|--|---|----------------------------|
| Caso 1 | Ventricolomegalia cerebrale bilaterale, iperecogenicità intestinale | Non eseguita | Ipoacusia bilaterale grave |
| Caso 2 | Iperecogenicità intestinale, alone iperecogeno periventricolare cerebrale, "intraventricular adhesion" | Non eseguita | Ipoacusia bilaterale grave |
| Caso 3 | Normale | Non eseguita | Ipoacusia bilaterale grave |

Figura 4. Quadro ecografico cerebrale del caso 2 di infezione non primaria materna



Legenda:

4.A: sezione parasagittale, che mostra il ventricolo laterale (freccia), alone iperecogeno (freccia), corno frontale (1), corno occipitale (2) e plesso corioideo (PC). Nel contesto del ventricolo, si apprezza la presenza di una sottile sepimentazione, compatibile con danno cerebrale da infezione da CMV.

4.B: piano coronale, che mostra entrambi i corni frontali (1), cavo del setto pellucido (3) e alone iperecogeno (freccia).

4.C: piano coronale, che mostra entrambi i corni frontali (1) e alone iperecogeno (freccia)

4. DISCUSSIONE

L'incidenza dell'infezione congenita da CMV aumenta con la sieroprevalenza materna. La correlazione tra l'alta sieroprevalenza materna e l'alta incidenza alla nascita potrebbe sembrare paradossale dato che il più alto numero di donne sieropositive in una popolazione dovrebbe significare meno gravide a rischio di infezione primaria.

Questo apparente paradosso potrebbe essere spiegato in vari modi ⁽⁵⁾. Un'alta sieroprevalenza nella popolazione significa che ci sono più gravide a rischio di riattivazione. Anche se la riattivazione è relativamente infrequente per ogni singola donna, all'interno di una popolazione il numero di donne affette potrebbe invece essere sostanziale. Inoltre la sieroprevalenza potrebbe essere alta perché sono frequenti i comportamenti a rischio all'interno della popolazione. A questo si aggiunge il fatto che, in una popolazione ad alta prevalenza, una donna gravida è più soggetta a contatti con soggetti infetti da CMV. Una donna immune potrebbe quindi avere un più alto

rischio di reinfeccarsi così come le gravide sieronegative un più alto rischio di infezione primaria.

La diagnosi sierologica di infezione non primaria da CMV è difficile e non sempre realizzabile per la frequente indisponibilità di metodi di diagnosi ottimali ⁽¹³⁾. Nelle gravide immuni, la diagnosi sierologica di infezione non primaria da CMV potrebbe essere documentata da un significativo aumento del titolo delle IgG con o senza aumento degli anticorpi IgM e alta avidità. Nelle donne il cui stato sierologico pregravidico è ignoto, un alto titolo delle IgG e IgM CMV-specifiche in associazione ad un'alta avidità nelle prime 12-16 settimane di gestazione potrebbero essere indicative di infezione non primaria da CMV. L'immunoblot con le proteine virali native e purificate e con le proteine ricombinanti purificate (strutturali e non strutturali) è utile per confermare la presenza nel siero delle IgM CMV specifiche con un'alta sensibilità (100%) e specificità (98.6%). Inoltre l'analisi della risposta delle IgM virus specifiche per individuare le proteine strutturali e non strutturali del CMV può rilevare i profili tipici di riattivazione per distinguere una infezione primaria da una non primaria ⁽⁶³⁾.

Storicamente, la preesistente immunità materna riduce le probabilità di infezione congenita sintomatica e il numero e la severità di sequele.

Fowler et al. hanno studiato l'associazione tra lo stato anticorpale materno e l'outcome in 197 bambini con infezione congenita da CMV nati tra il 1972 e il 1990 ⁽¹⁰⁾. Nessuno dei 64 neonati con infezione congenita nati da donne con infezione non primaria da CMV incluse nello studio avevano anomalie alla nascita mentre tutti i 24 neonati con infezione sintomatica erano nati dopo un'infezione materna primaria. Secondo gli autori la preesistenza degli anticorpi materni CMV-specifici proteggeva il feto da conseguenze severe dell'infezione congenita. Lo studio indicava che è il tipo di infezione materna ad essere il maggior determinante dell'outcome dell'infezione congenita da CMV. Successivamente lo stesso gruppo ha pubblicato risultati differenti che mostravano che l'infezione congenita sintomatica da CMV dopo infezione non primaria non era poi così infrequente come si pensava in precedenza. Gli Autori hanno esaminato l'incidenza delle anomalie cliniche e laboratoristiche nei bambini con

infezione congenita sintomatica nati da madri già immuni per verificare se questi avevano un decorso meno severo della malattia rispetto a quelli nati da madri con infezione primaria, dimostrando che la severità era simile nei due gruppi ⁽⁶⁴⁾.

Risultati simili sono stati pubblicati da un gruppo svedese in un follow-up di un ampio numero di neonati con infezione congenita da CMV ⁽⁶⁵⁾. Su 10328 neonati, 47 avevano l'infezione congenita e su 9 bambini con infezione congenita sintomatica, 2 erano nati da madri con infezione non primaria.

Boppana et al. hanno preso in considerazione i nati con infezione congenita da madre immuni per CMV che si sono reinfettate con un ceppo differente del virus ⁽⁶⁶⁾. In questo studio, 10 delle 16 madri di bambini infetti (62%) avevano acquisito nuovi anticorpi specifici contro la glicoproteina H contro solo 4 delle 30 madri di neonati non infetti (13%, $P < 0,001$). Gli Autori concludevano che tra le gravide con una preesistente immunità, la trasmissione verticale avveniva più frequentemente in coloro che avevano acquisito un differente ceppo di CMV in gravidanza.

Basandosi sui dati di Fowler et al., l'immunità acquisita naturalmente comporterebbe una riduzione del 69% del rischio di infezione congenita di CMV nelle future gravidanze e l'età materna dai 25 anni in su (ARR 0,19; 95% CU, 0,07-0,49) sarebbe protettiva contro l'infezione congenita da CMV ⁽⁶⁷⁾. Nessun altro fattore sembrerebbe associato ad una riduzione del rischio di infezione congenita da CMV. Questo studio probabilmente fornisce la più accurata stima del tasso di infezione congenita da CMV. L'infezione congenita era presente in 18 (3%) di 604 nati da madri sieronegative e in 29 (1%) nati da 2857 madri immuni.

I nostri risultati confermano che la preesistente immunità materna offre una protezione nei confronti della trasmissione intrauterina dell'infezione da CMV, ma non contro i sintomi. Tre dei 7 neonati infetti (42,8%) erano sintomatici dopo la nascita: in tutti i casi l'infezione materna era stata diagnosticata nel primo trimestre di gravidanza confermando un maggior rischio di infezione nella prima parte della gravidanza. Segni di infezione erano stati osservati ecograficamente in due casi. Nel primo l'ecografia morfologica a 20 settimane di gravidanza mostrava iperecogenicità intestinale e ventricolomegalia bilaterale cerebrale. Nel secondo caso erano presenti

iperecogenicità intestinale, una diffusa iperecogenicità del parenchima periventricolare cerebrale (alone iperecogeno) ⁽⁶⁸⁾ e bande aderenziali bilaterali dei corni posteriori dei ventricoli cerebrali. Entrambi i bambini hanno manifestato ipoacusia bilaterale.

Sono presenti in letteratura case reports che mostrano casi di infezione congenita sintomatica severa in nati da madri con infezione non primaria ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

In particolare Zalel et al., ⁽⁷¹⁾ descrivono sei casi di quadri ecografici patologici di gravide immuni a cui è stata attribuita successivamente la diagnosi di infezione congenita da CMV mediante amniocentesi. In tutti i sei casi la sierologia materna non aveva messo in evidenza alcuna alterazione compatibile con una reinfezione/riattivazione degli anticorpi CMV-specifici mostrando la frequente difficoltà di diagnosi materna di infezione non primaria.

In conclusione, in assenza di una terapia prenatale di approvata efficacia e di markers di infezione, il monitoraggio ecografico offre il più attendibile metodo di diagnosi nel predire l'infezione congenita sintomatica nell'infezione non primaria materna da CMV.

La nostra esperienza conferma inoltre che l'infezione congenita sintomatica dopo una reinfezione/riattivazione materna da CMV non è poi così infrequente come si pensava in passato. Studi su un più ampio numero di casi e maggiori follow up di nati con infezione congenita sono tuttavia necessari per meglio definire la frequenza e le conseguenze dell'infezione da CMV in gravide con preesistente immunità.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Mocarski ES, Shenk T et al. Cytomegalovirus. In Fields Virology, DM Knipe, PM Howley eds., 5th, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2007; 2:2701-72.
2. Marshall BC, Adler SP. The frequency of pregnancy and exposure to cytomegalovirus infections among women with a young child in day care. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:163.e1-5.
3. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007; 17:253-76.
4. Rahav G, Gabbay R et al. Primary versus nonprimary cytomegalovirus infection during pregnancy, Israel. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:1791-3.
5. Dollard SC, Grosse SD et al. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007;17:355-63.
6. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis* 2009; 49:522-28.
7. Van der Sande MA, Kaye S et al. Risk factors for and clinical outcome of congenital cytomegalovirus infection in a peri-urban West-African birth cohort. *PLoS One* 2007; 2:e492.
8. Kouri V, Correa C et al. Diagnosis and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital infection in newborns: 2007-2008. *Ped Infect Dis J* 2010; 29:1105-10.
9. Fang FQ, Fan AS et al. Incidence of cytomegalovirus infection in Shanghai, China. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16:1700-3.

10. Fowler KB, Stagno S et al. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326:663-7.
11. Ross SA, Fowler KB et al. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr*. 2006; 148:332-6.
12. Bodéus M, Beulné D et al. Ability of three IgG avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:248–52.
13. Boppana SB, Pass RF et al. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal and mortality. *Pediatr Infect Dis* 1992; 11:93–9.
14. Peckham CS. Cytomegalovirus infection: congenital and neonatal disease. *Scand J Infect Suppl* 1991; 78:82–7.
15. Pass RF, Fowler KB et al. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol* 2006; 35:216-20.
16. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:680-715.
17. Fisher S, Genbacev O et Al. Human cytomegalovirus infection of placenta cytotrophoblast in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* 2000, 74:6808-20
18. Adler SP, Finney JW et al. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr* 2004; 145: 485-491.
19. Lazzarotto T, Spezzacatena P et al. 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.

20. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis* 1997; 175:944-6.
21. Revello MG, Genini E et al. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol* 2010; 48: 255-9.
22. Lazzarotto T, Ripalti A et al. Development of a new cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) immunoblot for detection of CMV-specific IgM. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3337-41.
23. Eggers M, Bader U et al. Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. *J Med Virol* 2000; 60: 324-30.
24. Lazzarotto T, Gabrielli L et al. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol* 2004; 65: 410-5.
25. Liesnard C, Donner C. et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 881-8.
26. Azam AZ, Vial Y et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 443-8.
27. Donner C, Liesnard C et al. Accuracy of amniotic fluid testing before 21 weeks' gestation in prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 1994;14: 1055-9.
28. Barbi M, Calvario A et al. Documento elaborato dal gruppo di lavoro AMCLISIV "Infezioni da CMV in gravidanza" 2007, <http://www.amcli.it> & <http://www.sivvirologia.it/>.

29. Goegebuer T, Van Meensel B et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 660-5.
30. Lazzarotto T, Gabrielli G et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection and outcome in 598 pregnant women undergoing a primary CMV infection. OR#10.2 In abstracts of the 12th International CMV/BetaHerpesvirus Workshop. May 10-14 2009, Boston-USA.
31. Benoist G, Salomon LJ et al. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG* 2008; 115:823-9.
32. Romanelli RM, Magny JF et al. Prognostic markers of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Braz J Infect Dis* 2008; 12: 38-43.
33. Fabbri E, Revello MG et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG* 2011; 118: 448-456.
34. Malinger G, Lev D et al. Fetal cytomegalovirus infection of the brain: the spectrum of sonographic findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24: 28-32.
35. Guerra B, Simonazzi G et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 380.e1-380.e7.
36. Guerra B, Lazzarotto T et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 476-482.
37. Liesnard C, Donner C. et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 881-8.
38. Azam AZ, Vial Y et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 443-8.
39. Lipitz S, Achiron R et al. Outcome pregnancies with vertical transmission of primary cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2002; 100:428-33.

40. Ville Y. The cytomegalovirus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12:159-63.
41. Ornoy A, Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol* 2006; 21:399-409.
42. Malinger G, Lerman-Sage T et al. A normal second-trimester ultrasound does not exclude intracranial structural pathology. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 20:51-6
43. Pass RF, Zhang C, Evans A, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine* 2009; 360: 1191–1199. DOI: 10.1056/NEJMoa0804749
44. Gruppo multidisciplinare “ Malattie infettive in ostetricia-ginecologia e neonatologia” AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani), SIGO (Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia), SIMaST (Società Interdisciplinare delle Malattie Sessualmente Trasmissibili), SIMIT (Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali), SIN (Società Italiana di Neonatologia), SIP (Società Italiana di Pediatria). “Percorsi diagnostico-assistenziali di malattie infettive in ostetricia-ginecologia e neonatologia” <http://www.amcli.it/> ; <http://www.sigo.it/>
45. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2005;353:1350-62.
46. Buxmann H, Stackelberg OM, Schlösser RL, et al. Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *J Perinat Med* 2012;40:439-46.
47. Nigro G, Adler SP, Parruti G, et al. Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy – a case-control study of the outcome in children. *J Infect Dis* 2012;205:215-27.
48. Visentin S, Manara R, Milanese L, et al. Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clin Infect Dis* 2012;55:497-503.

49. The Japanese Congenital Cytomegalovirus Infection Immunoglobulin Fetal Therapy Study Group. A trial of immunoglobulin fetal therapy for symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Reproductive Immunol* 2012;95:73-9.
50. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N Eng J Med* 2014; 370:1316-1326
51. Jacquemard F, Yamamoto M et al. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG* 2007; 114:1113-21
52. Kimberlin DW, Lin CY et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial *J. Pediatr* 2003; 143: 16-25
53. Amir J, Wolf DJ et al. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long term oral valganciclovir; *Eur J Pediatr* 2010; 169:1061-7
54. Hilgendorff a, Daiminger A et al. Oral valganciclovir treatment in a CMV congenital infected infant with sensorineural hearing loss (SNHL) first detected at 4 months of age. *Klin Padiatr* 2009; 221:448-9. 97. Lombardi G, Garofoli F et al. Oral valganciclovir treatment in newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *European J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:1465-70
55. APP, Reedbook 2009, <http://aapredbook.aappublications.org/>
56. Kimberlin DW, Acosta AP et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 2008; 197: 836-45
57. Amir J, Wolf DJ et al. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long term oral valganciclovir; *Eur J Pediatr* 2010; 169:1061-7.

58. Hilgendorff a, Daiminger A et al. Oral valganciclovir treatment in a CMV congenital infected infant with sensorineural hearing loss (SNHL) first detected at 4 months of age. *Klin Padiatr* 2009; 221:448-9.
59. Acosta EP, Brundage RC et al. Ganciclovir population pharmacokinetics in neonates following intravenous administration of ganciclovir and oral administration of a liquid valganciclovir formulation. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81:867-72.
60. de Vries JJC, Vossen ACTM, Kroes ACM, van der Zeijst BAM. Implementing neonatal screening for congenital cytomegalovirus: addressing the deafness of policy makers. *Rev Med Virol* 2011;21:54-61.
61. Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, et al. Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. *Viral Immunol.* 2000;13(1):137-41.
62. Gabrielli L, Bonasoni MP, Lazzarotto T, Lega S, Santinin D, Foschini MP, Guerra B, Baccolini F, Piccirilli G, Chiereghin A, Petrisli E, Gardini G, Lanari M, Landini MP. Histological findings in fetuses congenitally infected by cytomegalovirus. *J Clin Virol.* 2009 Dec;46 Suppl 4:S16-21
63. Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Sep;17(9):1285-93.
64. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics.* 1999 Jul;104(1 Pt 1):55-60.
65. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of

prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis.* 1999;31(5):443-57.

66. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med.* 2001 May 3;344(18):1366-71.
67. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 2003 Feb 26;289(8):1008-11
68. Simonazzi G, Guerra B, Bonasoni P, et al. Fetal cerebral periventricular halo at midgestation: an ultrasound finding suggestive of fetal cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 Jun; 202(6):599.e1-5.
69. Michael A. Gaytant, G Ingrid JG Rours, Eric AP Steegers, Jochem MD Galama Ben A Semmekrot. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *eur j pediatr* (2003) 162: 248–253
70. Henrich W, Meckies J, Dudenhausen JW, Vogel M and Enders G. Recurrent cytomegalovirus infection during pregnancy: ultrasonographic diagnosis and fetal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 19: 608–611
71. Zalel Y, Gilboa Y, Berkenshtat M, Yoeli R, Auslander R, Achiron R and Goldberg Y. Secondary cytomegalovirus infection can cause severe fetalsequelae despite maternal preconceptional immunity. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 417–42

