

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA
MEDICINA MATERNO INFANTILE
E DELL'ETA' EVOLUTIVA**

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/38

**SIGNIFICATO PROGNOSTICO DELL'ECOGRAFIA
CEREBRALE NEI NEONATI CON INFEZIONE
CONGENITA DA CITOMEGALOVIRUS**

Presentata da: Dott.ssa Valentina Venturi

Coordinatore Dottorato

Prof. G.P. Salvioli

Relatore

Prof. G. Faldella

Esame finale anno 2008

ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	4
EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE CONGENITA	5
STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE INTRAUTERINA	6
MANIFESTAZIONI CLINICHE E SEQUELE DELL'INFEZIONE CONGENITA	8
PAZIENTI E METODI	13
RISULTATI	17
DISCUSSIONE	23
BIBLIOGRAFIA	28

ABSTRACT

Background: Congenital cytomegalovirus (CMV) infection may lead to cerebral injury and neurodevelopmental delay. Cranial computed tomography (CT) is currently the standard imaging technique for predicting the outcome of CMV infected patients. Ultrasound (US) is a safe means to assess the extent of cerebral injury due to CMV infection in neonates, and unlike CT, is readily available at the bedside.

Aim: To report the accuracy of US in predicting neurodevelopmental and sensorineural outcome in patients with congenital CMV infection.

Study design: 57 newborns with congenital CMV infection underwent brain US and were followed prospectively for motor skills, developmental quotient and hearing function.

Results: An abnormal US was found in 12/57 newborns. At least one sequela (Developmental Quotient \leq 85, motor delay, sensorineural hearing loss) was present in 10/11 surviving children with abnormal US (1 patient died in the neonatal period) vs 3/45 newborns with normal US (OR for death or poor outcome: 154, CI 17.3-1219.6, $p < 0.001$, positive predictive value 91.7%, negative predictive value 93.3%).

Conclusion: A good correlation is shown between ultrasound abnormalities and the prediction of outcome, suggesting that US may be used to study and follow CMV infected neonates. Our findings await confirmation in a larger population.

L'infezione congenita da citomegalovirus (CMV) può causare lesioni cerebrali e ritardo dello sviluppo psicomotorio. La tomografia computerizzata (TC) cerebrale è l'indagine correntemente utilizzata per formulare un giudizio prognostico sugli esiti neurologici nei bambini con infezione congenita da CMV. L'ecografia (US) è una metodica sicura per valutare l'estensione del danno cerebrale dovuto all'infezione da CMV nei neonati, e, diversamente dalla TC, è facilmente eseguibile al letto del paziente.

Scopo del presente studio è indagare l'utilità dell'ecografia cerebrale nel predire gli esiti neurologici e neurosensoriali nei pazienti con infezione congenita da CMV.

Sono stati studiati 57 neonati con infezione congenita da CMV, sottoposti ad ecografia cerebrale e successivamente seguiti in follow-up con valutazione prospettica dello sviluppo psico-motorio e della funzionalità uditiva.

12 neonati su 57 avevano un'ecografia cerebrale patologica; di questi, 10 hanno sviluppato almeno una sequela (quoziente di sviluppo ≤ 85 , deficit motorio, ipoacusia neurosensoriale), 1 è deceduto in epoca neonatale; per contro, hanno sviluppato sequele 3 neonati su 45 con ecografia cerebrale non patologica alla nascita (OR per decesso o sequele: 154, CI 17,3-1219,6, $p < 0,001$, valore predittivo positivo 91,7%, valore predittivo negativo 93,3%).

Il presente studio ha rilevato pertanto una buona correlazione fra i reperti ecografici in epoca neonatale ed il successivo sviluppo di sequele neurologiche, suggerendo che l'ecografia cerebrale è una metodica utile per formulare una prognosi nei neonati con infezione congenita da CMV.

Lista delle abbreviazioni:

CMV: citomegalovirus; US: ecografia; TC: tomografia computerizzata; RMN: risonanza magnetica nucleare; SNC: sistema nervoso centrale; VLS: vasculopatia lenticolo-striatale; QS: quoziente di sviluppo; VPP: valore predittivo positivo; VPN: valore predittivo negativo; OR: odds ratio; IC: intervallo di confidenza; DS: deviazione standard.

INTRODUZIONE

L'infezione congenita da citomegalovirus (CMV) può causare un ampio spettro di lesioni a carico del sistema nervoso centrale (SNC), attraverso processi neuropatologici di tipo infiammatorio e teratogeno; tale spettro include meningoencefalite, calcificazioni, microcefalia, difetti della migrazione neuronale, cisti della matrice germinativa, ventricolomegalia ed ipoplasia cerebellare (1).

La tomografia computerizzata (TC), la risonanza magnetica nucleare (RMN) e l'ecografia (US) sono metodiche ampiamente utilizzate per lo studio delle lesioni cerebrali e delle altre anomalie a carico del SNC (2-5). In particolare, nell'ambito della patologia CMV-indotta, la TC ha trovato il maggior impiego nella diagnosi delle lesioni cerebrali, nella previsione degli esiti neurologici (3, 6), nell'identificazione dei neonati a rischio di sordità neurosensoriale e nella selezione di quelli che beneficiano del trattamento con ganciclovir (7, 8). In epoca neonatale, l'ecografia presenta numerosi vantaggi rispetto alla TC: non espone a radiazioni, non richiede sedazione, è facilmente eseguibile anche al letto del paziente, può essere ripetuta a breve distanza di tempo. Tuttavia, il suo utilizzo per formulare una prognosi nei neonati con infezione congenita da CMV è stato sino ad ora poco studiato.

Nel presente studio, sono stati correlati i reperti ecografici neonatali con gli esiti neurologici e neurosensoriali in una coorte di neonati con infezione congenita da CMV, sottoposti precocemente ad ecografia cerebrale e successivamente seguiti in follow-up, per valutare il significato prognostico di tale metodica.

EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE CONGENITA DA CMV

Il CMV è la più importante causa di infezione congenita nel mondo e costituisce la prima causa di ritardo mentale e sordità neurosensoriale non geneticamente determinati.

Approssimativamente l'1% di tutti i neonati sono portatori di infezione congenita da CMV, con una prevalenza dell'infezione che va dallo 0,2 al 2,2% (9). In Italia, è stata stimata un'incidenza pari all'1.1%, vale a dire che ogni anno su 500.000 nati vivi approssimativamente 5500 sono infetti (10).

La trasmissione verticale può avvenire sia in seguito ad una infezione primaria materna, sia in seguito ad una infezione non primaria; lo 0.7-4 % delle donne contrae l'infezione primaria durante la gravidanza; una infezione non primaria avviene invece nello 0.15-1% delle gravide, essendo conseguente ad una riattivazione del virus o ad una reinfezione da parte di un ceppo virale diverso. La fonte di contagio per le donne in età fertile è generalmente intrafamiliare, spesso costituita da bambini conviventi; fattori di rischio per la sieroconversione in gravidanza sono l'appartenenza a ceti sociali bassi, un'età inferiore a 20 anni, una storia di malattie a trasmissione sessuale.

La trasmissione intrauterina, dopo una infezione materna primaria, avviene in media nel 40% dei casi (rischio di trasmissione variabile dal 24 al 75% nei vari studi); di questi, circa il 10-15% sarà sintomatico alla nascita, con una mortalità perinatale del 30% e sequele neurologiche nel 70% dei sopravvissuti. La restante quota di pazienti infetti (85-90%) si presenta asintomatica alla nascita, ma può sviluppare sequele neurologiche e neurosensoriali a distanza nel 5-15% dei casi.

In caso di infezione materna non primaria, la trasmissione al feto si aggira intorno all'1-2.2% dei casi; in uno studio prospettico condotto su donne sieropositive per CMV prima della gravidanza, l'incidenza di infezione congenita è risultata pari all'1.9%, del tutto simile a quella osservata nella popolazione generale (2.2%); tale dato ha messo quindi in evidenza l'importanza dell'infezione materna non primaria nell'ambito dell'epidemiologia dell'infezione congenita da CMV (11). Il ruolo dell'infezione materna primaria è proporzionalmente maggiore nelle popolazioni con una bassa prevalenza dell'infezione; viceversa, in popolazioni

con alto tasso di sieropositività, le infezioni materne ricorrenti possono costituire la principale causa di infezione intrauterina da CMV. E' controverso il ruolo dell'immunità materna nel mitigare la virulenza dell'infezione feto/neonatale; studi passati avevano suggerito che l'infezione congenita successiva ad infezione materna non primaria fosse solitamente asintomatica e raramente gravata da sequele (12, 13). Tuttavia, osservazioni successive hanno segnalato la possibilità di gravi manifestazioni cliniche alla nascita e di deficit neurologici permanenti anche nei casi di infezione congenita da infezione materna ricorrente (14, 15, 16).

STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE INTRAUTERINA

La trasmissione intrauterina del virus avviene per via transplacentare durante la fase di viremia materna; l'infezione della placenta costituisce infatti il primo passo verso l'infezione fetale, come dimostrato dalle alterazioni istopatologiche placentari che invariabilmente accompagnano l'infezione congenita: il reperto istopatologico tipico dell'infezione placentare è rappresentato da villite linfoplasmocitica cronica, associata a necrosi focale e vasculite.

E' stato attribuito alla placenta anche un ruolo di reservoir virale, nel quale il virus si replica prima di raggiungere il feto, condizionando il grado di compromissione feto/neonatale (17, 18).

Dato che la trasmissione verticale del virus si verifica solo nel 40% dei casi anche in presenza di infezione materna primaria, la placenta ha un'importante funzione di barriera, con modalità poco conosciute, tuttora oggetto di studio (17). Sono stati ritrovati piccoli quantitativi di DNA virale nel liquido amniotico associati a isolamento virale negativo sia su liquido amniotico che su urine neonatali (19, 20), a testimonianza di una trasmissione transplacentare che non ha comportato un'infezione congenita. Tutti questi casi avevano una carica virale su liquido amniotico estremamente bassa, probabilmente tale da essere eliminata dal sistema immunitario del feto.

All'infezione placentare consegue probabilmente una diffusione locale

dell'infezione alle cellule amniotiche, che vengono ingerite dal feto. Il virus si replica nell'orofaringe e penetra successivamente nel circolo ematico fetale.

L'infezione fetale è caratterizzata da una prima fase viremica; successivamente CMV si replica con un potente effetto citopatico in vari organi e tessuti, quali il sistema nervoso centrale (SNC), il fegato, l'orecchio interno, il rene; un ruolo importante nella penetrazione del virus nei vari organi è stato attribuito alla sua capacità di infettare e danneggiare le cellule endoteliali (21).

Nel rene, il virus si localizza e si replica all'interno delle cellule glomerulari e delle cellule dell'epitelio tubulare prossimale, giustificando l'elevata carica virale urinaria che si ritrova in tutti i neonati con infezione congenita. Gli infetti eliminano il virus con le urine per lungo tempo, da alcuni mesi fino a qualche anno. Tuttavia, il rene non subisce danni ad opera del virus; nel neonato infetto le manifestazioni cliniche riguardano sostanzialmente un numero limitato di organi, ovvero il SNC, il fegato, la milza, il midollo osseo ed il polmone.

A livello del SNC, l'infezione congenita comporta estese alterazioni del mantello subependimale e dei neuroni delle aree periventricolari. Cellule infette con il caratteristico aspetto a "occhio di gufo" sono state individuate fra numerose popolazioni cellulari ed in varie sedi del SNC: neuroni, cellule endodimali, plessi corioidei, meningi, endotelio vascolare, strutture dell'orecchio interno (organo del Corti, stria vascolare della coclea).

Si distinguono due tipi di processi neuropatologici: le lesioni flogistiche o distruttive e le alterazioni dello sviluppo o teratogene, da alterata proliferazione e migrazione dei neuroni. Le principali conseguenze sono la microcefalia e le calcificazioni periventricolari. Talora si verifica stenosi dell'acquedotto di Silvio con conseguente idrocefalo. Caratteristici dell'infezione da CMV sono i difetti di migrazione neuronale, che insorgono nel secondo trimestre di gravidanza e interessano la corteccia sia cerebrale che cerebellare. Essi sono dovuti sia all'azione teratogena che encefaloclastica del virus, e si manifestano con polimicrogiria, lissencefalia, pachigiria, schizencefalia ed eterotopie neuronali (1).

Non di meno possono essere colpite strutture dell'occhio, con conseguenti corioretinite, microftalmia, neurite ottica.

Altri organi che possono essere coinvolti nell'infezione congenita da CMV

sono il polmone, il fegato, il sistema emopoietico, le ghiandole endocrine e salivari.

Il virus, eliminato dal feto con le urine nel liquido amniotico, può essere nuovamente ingerito, replicarsi nell'epitelio oro-faringeo e passare nuovamente ad una fase di disseminazione ematica più estesa.

La trasmissione del virus dalla madre al feto può avvenire durante tutta la gravidanza con uguale frequenza. Una severa compromissione del feto sembra avvenire più frequentemente quando l'infezione primaria viene acquisita prima della 27^o settimana di gestazione, anche se non esistono studi conclusivi a riguardo (22).

MANIFESTAZIONI CLINICHE E SEQUELE DELL'INFEZIONE CONGENITA

Le manifestazioni cliniche in epoca neonatale possono essere distinte in neurologiche, neurosensoriali e non neurologiche.

Le **manifestazioni neurologiche** sono presenti nel 60-70% dei neonati sintomatici e comprendono:

- Microcefalia, definita come dimensione della circonferenza cranica inferiore a 2 deviazioni standard dalla media per l'età gestazionale, aggiustata con il peso del neonato (poiché frequentemente associata a IUGR); è presente in circa il 50% dei casi di infezione congenita sintomatica. E' fra i fattori predittivi più specifici di severo deficit dello sviluppo psicomotorio (6).
- Ipotonia, letargia.
- Convulsioni.
- Meningoencefalite.

Le **manifestazioni neurosensoriali** includono:

- Danni oculari: si tratta prevalentemente di corioretinite, che colpisce circa il 10-15% dei neonati sintomatici ed è spesso associata a manifestazioni neurologiche. All'esame oftalmoscopico è patognomonica la presenza di aree bianco-giallastre di necrosi retinica, frammiste a stravasi emorragici;

generalmente è risparmiata la regione maculare ed il nervo ottico, il quale può andare incontro ad un processo degenerativo solo in fasi più avanzate. Quando interessa la retina periferica, l'acuità visiva è conservata e la sintomatologia è caratterizzata da fosfeni. Sono invece manifestazioni molto più rare strabismo, atrofia o ipoplasia del nervo ottico, cataratta, microftalmo, necrosi retinica, cecità, malformazioni della camera anteriore e della papilla ottica.

- Ipoacusia neurosensoriale: il CMV è la più importante causa di sordità nell'infanzia; in uno studio condotto su 130 bambini con sordità neurosensoriale ad eziologia sconosciuta, è stata riconosciuta retrospettivamente un'infezione congenita da CMV nel 10% dei casi con sordità esordita nei primi due mesi di vita e nel 34% dei casi con sordità diagnosticata successivamente, nel corso della prima infanzia (23). Il danno all'udito può essere già presente alla nascita, ma più spesso si sviluppa dopo l'età neonatale, rientrando fra le sequele dell'infezione congenita: circa il 5% di tutti i bambini con infezione congenita presenta un deficit uditivo alla nascita (24), mentre fino al 56% dei nati con infezione sintomatica sviluppa sordità neurosensoriale dopo i primi mesi di vita (25), indicando la natura evolutiva del danno.

Le **manifestazioni non neurologiche** sono più frequenti nel caso di infezione fetale tardiva e comprendono:

- IUGR, generalmente non isolato; nella patogenesi del ritardo di crescita intrauterino, è stato valorizzato il ruolo della villite cronica da CMV, responsabile di un quadro di insufficienza placentare.
- Prematurità.
- Petecchie e porpora, secondarie a trombocitopenia (da effetto diretto sui megacariociti midollari), sequestro splenico per splenomegalia e danno vascolare.
- Ittero protratto a bilirubina diretta ed ipertransaminasemia.
- Epatosplenomegalia, dovuta alla risposta del sistema reticoloendoteliale all'infezione cronica.
- Idrope fetale non immune.
- Oligo-poliidramnios.

- Iperecogenicità delle anse intestinali, già riscontrabile in epoca prenatale.
- Polmonite interstiziale.
- Trombosi aortica: il potenziale trombogenico di CMV è noto da tempo; gli herpesvirus in generale possono alterare la normale tromboresistenza della superficie endoteliale attraverso vari meccanismi. In particolare CMV può direttamente indurre una attività procoagulante, visto che sulla superficie espone dei fosfolipidi necessari per la cascata della coagulazione che porta alla generazione di trombina. Il nostro gruppo ha descritto un caso di trombosi congenita dell'arco aortico molto probabilmente causata da una severa infezione congenita da CMV con coinvolgimento multiorgano (26).
- Difetti dello smalto dentario.

L'infezione congenita da CMV è stata associata anche a morte fetale e a NEC; è stato inoltre osservato un aumento di aborti spontanei dopo infezione materna primaria.

I reperti di neuroimaging osservabili nei neonati con infezione congenita da CMV includono (6):

- Calcificazioni cerebrali: costituiscono il reperto più frequente (3). Sono per lo più localizzate in sede subependimale e a livello dei nuclei della base; possono essere associate a immagini a candelabro a livello talamico, segno di vasculite dei vasi lenticolo-striatali.
- Radiolucenza periventricolare alla TC (iperecogenicità periventricolare all'ecografia).
- Ventricolomegalia, legata ad ostruzione dei forami di Luska e Magendie.
- Cisti.
- Disordini della migrazione neuronale (pachigiria, lissencefalia, displasia corticale): possono interessare sia la corteccia cerebrale sia la cerebellare e sembrano dovuti ad azione teratogena del virus. CMV è considerato il principale agente infettivo coinvolto nella eziologia di differenti disordini della migrazione neuronale. Alla luce delle conoscenze di embriologia, analizzando le immagini neuroradiografiche di neonati con infezione congenita da CMV acquisita in età gestazionali diverse, è stato suggerito che la presenza di lissencefalia è correlata ad un insulto verificatosi prima della 16°-18° settimana di gestazione, mentre la polimicrogria è compatibile con un danno avvenuto fra la 18° e la 24° settimana (2).

– Ipoplasia cerebellare.

Passando a considerare le **sequele neurologiche e neurosensoriali**, occorre differenziare fra infezione congenita sintomatica e asintomatica.

Se l'infezione da CMV è stata sintomatica alla nascita, il rischio di sequele è molto elevato. In uno studio prospettico statunitense condotto su 106 neonati con infezione congenita sintomatica, il 90% circa ha riportato esiti a distanza: ritardo dello sviluppo psico-motorio, spesso associato a deficit neurologici e microcefalia, è stato osservato nel 70% dei casi, mentre un danno uditivo è stato riportato dal 58% dei bambini (25). In uno studio inglese su 65 bambini con infezione congenita sintomatica seguiti in follow-up fino a 3-4 anni di età, sono state osservate sequele nel 45% dei casi: sordità nell'11% dei bambini e deficit motori o psicomotori nel 34% dei casi (ritardo psicomotorio, diplegia, emiplegia, discinesie) (27).

Studi successivi hanno evidenziato, tuttavia, che in circa 1/3 delle infezioni congenite sintomatiche si può avere un normale sviluppo cognitivo (6); anche in presenza di un normale QI, sono comunque molto frequenti i disturbi del linguaggio e del comportamento (28).

Per quanto riguarda il danno uditivo, l'ipoacusia è bilaterale nel 50% dei casi e progressiva in oltre il 50% (29, 30). Un esordio tardivo (dopo il primo anno di vita) di sordità neurosensoriale è stato documentato nel 20% circa dei bambini (30).

Il meccanismo patogenetico responsabile dello sviluppo di sordità nei bambini con infezione congenita sintomatica da CMV è presumibilmente diverso da quello che conduce ai deficit cognitivi e motori, come suggerito dal fatto che la malattia disseminata alla nascita, piuttosto che i segni precoci di interessamento neurologico, è predittiva di ipoacusia neurosensoriale (29). Nella patogenesi sembra essere implicata anche la risposta immunitaria dell'ospite (31). Il virus si replica in molte strutture dell'orecchio interno; il danno è probabilmente determinato dall'effetto citopatico virale diretto e dal deposito di immunocomplessi a livello della membrana di Reissner, della stria vascolare, dei canali semicircolari, dell'organo del Corti e dei neuroni del nervo acustico.

Se l'infezione congenita è decorsa in modo asintomatico in epoca neonatale, la prognosi migliora notevolmente: generalmente, questi bambini avranno un

normale sviluppo cognitivo ed intellettuale (32, 33, 34).

Tuttavia, l'8% circa svilupperà un deficit uditivo neurosensoriale, essendo pertanto l'infezione da CMV un importante fattore di rischio di sordità anche fra i neonati con infezione congenita clinicamente silente. Uno studio statunitense condotto su 307 casi di infezione congenita accertata, asintomatica alla nascita, ha evidenziato una prevalenza di sordità neurosensoriale del 7,2% (35). In circa la metà dei casi il deficit uditivo era bilaterale; la severità del deficit variava da forme lievi a profonde, con un deterioramento progressivo in circa il 50% dei casi. Inoltre, in circa il 20% dei bambini seguiti, il deficit uditivo si evidenziava tardivamente, con una epoca media per la diagnosi intorno ai 27 mesi (range 25-62 mesi). Nello stesso lavoro, è stato anche descritto un quadro di sordità fluttuante legato all'infezione congenita da CMV; il meccanismo patogenetico non è noto, ma è possibile che la progressione e/o la fluttuazione del deficit uditivo siano dovute alla riattivazione e replicazione del virus e/o alla risposta infiammatoria locale.

Numerosi parametri sono stati studiati per valutare la capacità di predire l'outcome neurologico e neurosensoriale nei neonati con infezione congenita da CMV; sembrano condizionare negativamente la prognosi a distanza i seguenti fattori: un'elevata carica virale nel liquido amniotico (36, 37, 38), nel sangue fetale (39) e nel sangue neonatale (40); la presenza di sintomi alla nascita, soprattutto se a carico del SNC (6, 27); il riscontro di TC cerebrale patologica in epoca neonatale (6, 3, 29); la presenza alla nascita di segni di interessamento del sistema reticolo-endoteliale, limitatamente al rischio di sviluppare sordità (29), probabilmente in quanto espressione di infezione neonatale disseminata; durata più breve di escrezione urinaria del virus, sempre per il solo rischio di sordità (31), a suggerire un possibile ruolo della risposta immunitaria, che inibisce la replicazione del virus e quindi anche la sua escrezione, nella patogenesi del danno uditivo.

PAZIENTI E METODI

Fra il gennaio 1997 ed il settembre 2003, 57 neonati con diagnosi di infezione congenita da CMV sono afferiti al nostro reparto e sono stati inseriti in un follow-up multidisciplinare.

La diagnosi di infezione congenita da CMV è stata posta sulla base dell'isolamento virale su urine nelle prime 2 settimane di vita in neonati nati da madri con infezione da CMV sospetta o accertata durante la gravidanza, primaria o non primaria (40). Per l'isolamento virale è stata utilizzata la tecnica "shell vial", che identifica la proteina virale precocissima p72 su colture cellulari di fibroblasti.

L'infezione congenita è stata definita sintomatica in presenza di uno o più dei seguenti segni clinici e/o laboratoristici alla nascita: ritardo di crescita intrauterino, microcefalia, convulsioni, corioretinite, epato-splenomegalia, polmonite interstiziale, petecchie, ipertransaminasemia, neutropenia, piastrinopenia.

L'ecografia cerebrale è stata eseguita utilizzando un apparecchio Esaote AU5 con sonda settoriale da 7,5 Mhz. Tutti i neonati sono stati sottoposti ad ecografia cerebrale nella prima settimana di vita; se l'ecografia era negativa, veniva ripetuta a 1 e a 3 mesi di età; se risultava patologica, veniva ripetuta ogni settimana nel primo mese di vita, successivamente una volta al mese fino all'età di 6 mesi.

Per ecografia cerebrale patologica si è intesa la presenza di uno dei seguenti reperti: calcificazioni periventricolari/parenchimali, ventricolomegalia, cisti, lesioni cerebellari (iperecogenicità, ipoplasia), vasculopatia lenticolo-striatale (VLS) con immagini "a candelabro" (1, 4, 5) (sono riportati esempi nelle Figure 1 e 2). Le dimensioni dei ventricoli sono state valutate misurando il corpo dei ventricoli laterali in sezione sagittale. La ventricolomegalia è stata classificata come lieve, moderata o severa in accordo con la classificazione proposta da Allan (41) (Figura 3). Non è stata considerata come patologica un'ecografia che mostrasse esclusivamente una ventricolomegalia lieve (compresa fra 3 e 5 mm). Anche la vasculopatia lenticolo-striatale (VLS) isolata, intesa come iperecogenicità dei vasi dei gangli della base e del talamo, non è stata considerata patologica. Infatti, la VLS non è un marker specifico di

infezione intrauterina e viene riscontrata anche in neonati con altre patologie (trisomie, esposizione intrauterina ad alcool o farmaci, asfissia, cardiopatia, distress respiratorio), come pure in neonati sani (42, 43). Inoltre, studi longitudinali hanno mostrato che tale reperto ecografico non è di per sé associato ad una cattiva prognosi (44, 45).

Tutti i neonati sono stati sottoposti ad esame del fundus oculi.

La funzione uditiva è stata valutata mediante esecuzione dei potenziali evocati uditivi (ABR) in epoca neonatale, a 6 e a 12 mesi di età, e successivamente mediante prove audiometriche ripetute annualmente fino all'età scolare. La soglia uditiva determinata con gli ABR è definita come l'intensità di stimolo più bassa alla quale si riesce ancora a riconoscere l'onda V sul tracciato che registra l'attività elettrica delle strutture nervose esaminate. È stata definita come ipoacusia neurosensoriale una soglia agli ABR > 25 dB in almeno due distinte valutazioni o una soglia alla prova audiometrica > 20 dB per uno o più valori di frequenza. Gli ABR e le prove audiometriche sono state precedute da un esame impedenziometrico per escludere un'afezione a carico dell'orecchio medio; sono stati esclusi dal computo dei patologici i casi di ipoacusia trasmissiva non associata ad ipoacusia neurosensoriale.

Lo sviluppo psico-motorio è stato valutato a 6, 12 e 24 mesi di età, usando il test di Brunet-Lezine con valutazione, da parte di un pediatra, di postura, coordinazione, linguaggio e socializzazione (46). Il punteggio globale è stato ottenuto dal rapporto fra l'età di sviluppo osservata e l'età anagrafica (quoziente di sviluppo o QS). Un punteggio $\leq 0,85$ è stato considerato patologico, in accordo con Grossman (47).

Inoltre, a partire dai 3 mesi di età, i bambini sono stati sottoposti a periodiche visite fisiatriche, finalizzate allo studio complessivo dello sviluppo mediante l'utilizzo combinato del test di Milani-Comparetti per lo sviluppo neuroevolutivo (48), del test di Brazelton per le competenze relazionali (49) e della valutazione dei 'general movements' proposta da Prechtl (50). Questo metodo di valutazione globale ha permesso di individuare precocemente neonati e lattanti con disturbi dello sviluppo psico-motorio, avviandoli precocemente ad un trattamento di riabilitazione (prima dei 4-6 mesi di età). Si è definito come ritardo dello sviluppo motorio un deficit nelle abilità motorie che abbia richiesto un intervento riabilitativo.

Tutti i bambini con ecografia cerebrale patologica, inseriti in follow-up, sono stati sottoposti a TC e/o RMN cerebrale. La TC è stata effettuata entro il primo trimestre di vita; la RMN è stata eseguita in 2 casi nel periodo neonatale ed in 6 casi fra i 4 e i 12 mesi di età.

I dati sono stati raccolti in un database utilizzando il programma Excel e sono stati analizzati con il software SPSS 5.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). E' stato utilizzato il test CHI-quadrato per correlare i reperti ecografici agli esiti neurologici e neurosensoriali.

Figura 1. Immagini ecografiche di un neonato con infezione congenita da CMV. Sezione coronale mediana (a) e posteriore (b): ventricolomegalia, calcificazioni (frece bianche) ed ipoplasia cerebellare (*).

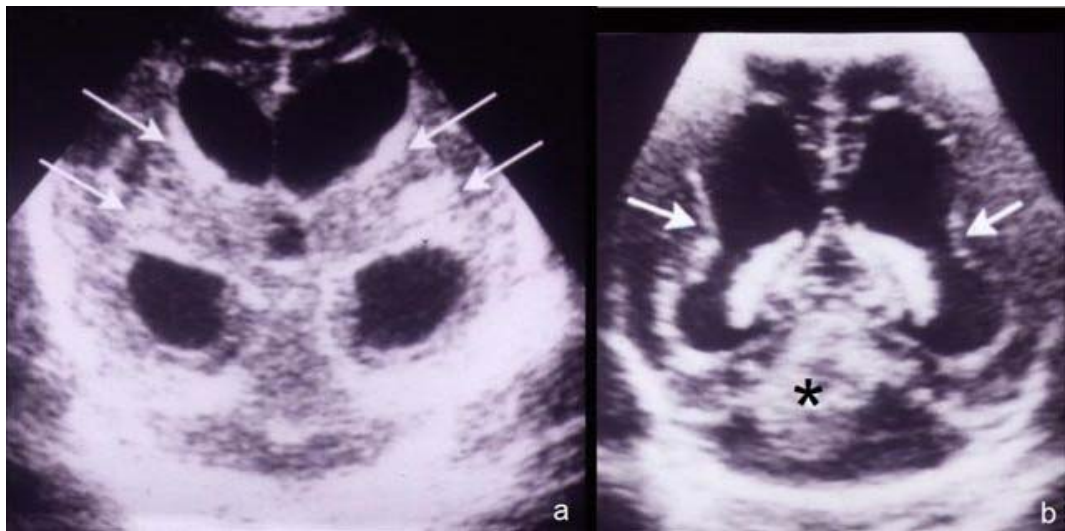


Figura 2. Immagini ecografiche di un neonato con infezione congenita da CMV.
Sezione coronale mediana (a) e posteriore (b): cisti subependimale (freccia grande) e microcalcificazioni (freccette sottili).

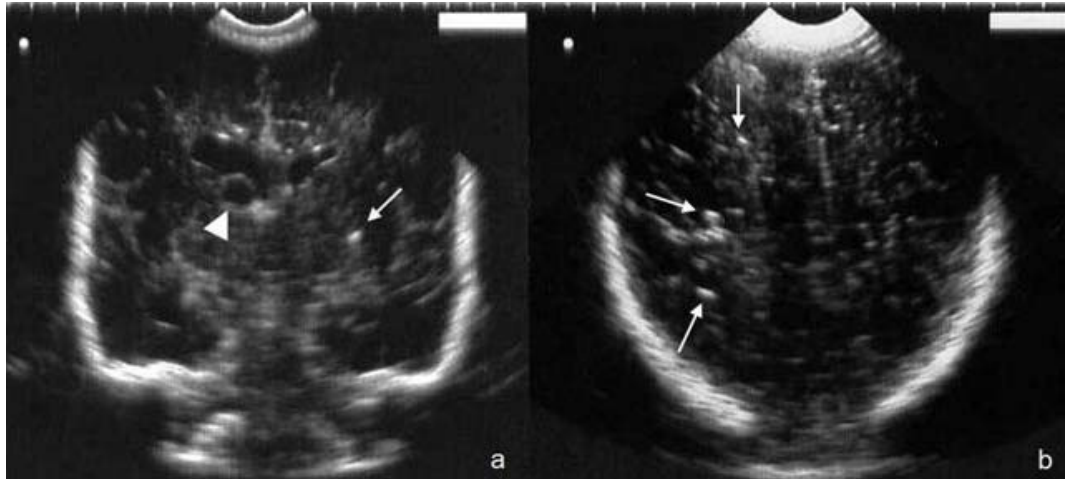


Figura 3. Immagine ecografica di un neonato con infezione congenita da CMV.
Sezione parasagittale. Le frecce grandi indicano i punti in cui viene misurato il ventricolo laterale. Si può osservare una pseudocisti a nido d'ape (freccia piccola).



RISULTATI

12 su 57 (21%) neonati afferiti al nostro Istituto con diagnosi di infezione congenita da CMV hanno presentato un'ecografia cerebrale patologica. 18 su 57 (31,6%) neonati avevano segni clinici o laboratoristici alla nascita (infezione congenita sintomatica).

Le anomalie all'ecografia cerebrale erano più frequenti nel gruppo dei neonati con infezione congenita sintomatica (10/18), rispetto al gruppo dei neonati asintomatici alla nascita (2/39) ($p < 0,005$). Le caratteristiche cliniche dei pazienti con US normali e patologici sono riassunte nella Tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei neonati con infezione congenita da CMV in relazione ai reperti ecografici cerebrali

	Ecografia cerebrale normale (n = 45)	Ecografia cerebrale patologica (n = 12)	p
Maschi/Femmine	18/27	5/7	ns
Età gestazionale media (DS): <i>settimane</i>	38.3 (2.5)	38.0 (2.2)	ns
Peso neonatale medio (DS): <i>g</i>	3054 (676)	2875 (767)	ns
Segni clinici e laboratoristici in epoca neonatale			
Ritardo di crescita intrauterino: <i>n (%)</i>	1 (2)	2 (17)	ns
Petecchie: <i>n (%)</i>	2 (4)	8 (67)	0.000
Epatosplenomegalia: <i>n (%)</i>	0	4 (33)	0.001
Microcefalia: <i>n (%)</i>	0	6 (50)	0.000
Corioretinite: <i>n (%)</i>	1 (2)	0	ns
Altri*: <i>n (%)</i>	5 (11)	8 (67)	0.000
Decesso: <i>n (%)</i>	0	1 (8)	ns
Almeno una anomalia: <i>n (%)</i>	8 (18)	10 (83)	0.000

ns: non statisticamente significativo

* Ipertransaminasemia, neutropenia, trombocitopenia

Nella maggior parte dei casi l'ecografia cerebrale mostrava l'associazione di due o più dei seguenti reperti: calcificazioni, ventricolomegalia, cisti, anomalie cerebellari e vasculopatia lenticolo-striatale, come mostrato in Tabella 2.

Le lesioni sono state rilevate in occasione della prima ecografia e sono rimaste stabili nei controlli successivi, con l'unica eccezione di una cisti periventricolare, aumentata di dimensioni nel corso della prima settimana di vita. Nessun neonato con ecografia cerebrale negativa alla nascita ha sviluppato lesioni cerebrali successivamente.

Tutti i bambini con ecografia cerebrale patologica, tranne il neonato deceduto in prima settimana di vita, sono stati sottoposti ad ulteriore valutazione di neuroimaging: 3 a TC cerebrale, 4 a RMN cerebrale, 4 ad entrambe. La TC ha fornito informazioni sovrapponibili all'ecografia, senza rilevare anomalie ulteriori. La RMN, pur non avendo individuato calcificazioni cerebrali in 2 casi, ha aggiunto informazioni all'ecografia cerebrale in 6 casi, mostrando difetti della migrazione neuronale, leucodistrofia e ritardi della mielinizzazione. In un caso, all'ecografia cerebrale è sfuggita una cisti del corno ventricolare temporale del diametro di 5 mm, resa successivamente evidente dalla RMN.

Tabella 2. Reperti patologici all'ecografia cerebrale in 12/57 neonati con infezione congenita da CMV.

Pz	Ventricolomegalia	Calcificazioni	Cisti	Ipoplasia cerebellare	Altri
1	Sì	Sì	Sì	No	No
2	Sì	Sì	No	No	No
3	Sì	No	Sì	Sì	Iperecogenicità periventricolare globulare parietale sinistra (diametro 12 mm) *
4	Sì	Sì	No	No	No
5**	Sì	Sì	Sì	Sì	No
6	Sì	No	No	No	Iperecogenicità globulare monolaterale a livello della matrice germinativa con evoluzione in cisti
7	Sì	Sì	No	No	No
8	Sì	Sì	Sì	No	No
9	No	Sì	No	No	No
10	Sì	Sì	No	No	No
11	Sì	Sì	No	No	No
12	Sì	No	No	No	Vasculopatia lenticolo-striatale
N. totale di lesioni	11	9	4	2	-

Pz: paziente

*L'RMN ha identificato un'area di eterotopia della sostanza grigia

** Deceduto in epoca neonatale

56 su 57 bambini con infezione congenita da CMV sono stati seguiti in follow-up per almeno 12 mesi (età media \pm DS all'ultima visita di follow-up: $42,3 \pm 11,3$ mesi); un bambino è deceduto in epoca neonatale per trombosi dell'aorta (26).

Degli 11 neonati con ecografia cerebrale patologica seguiti in follow-up, solo uno, che presentava una ventricolomegalia moderata ed una lesione iperecogena a livello della matrice germinativa ad evoluzione cistica, non ha manifestato sequele neurologiche o neurosensoriali. Un bambino con una calcificazione singola al nucleo caudato rilevata da ecografia e TC ha sviluppato strabismo, mentre un'altro bambino con calcificazioni multiple e ventricolomegalia ha sviluppato ipoacusia neurosensoriale e strabismo. Gli altri 8 bambini che presentavano reperti di ventricolomegalia, calcificazioni diffuse, ipoplasia cerebellare e cisti periventricolari, variamente associati fra loro, hanno tutti manifestato un ritardo dello sviluppo psico-motorio (quoziente di sviluppo o QS: mediana 76,8, range 67-79), associato ad ipoacusia neurosensoriale in 5 casi e a deficit motorio specifico in 6 casi (si trattava, per questi ultimi, dei bambini nei quali l'RMN cerebrale aveva individuato anomalie aggiuntive rispetto all'ecografia cerebrale) (Tabella 3).

Dei 45 neonati con ecografia cerebrale negativa, 42 hanno presentato un normale sviluppo psico-motorio ed una normale maturazione della funzione uditiva, mentre 3 bambini hanno sviluppato ipoacusia neurosensoriale, in un caso monolaterale e di media gravità, negli altri due bilaterale (Tabella 3).

Tabella 3. Sequele neurologiche e neurosensoriali nei neonati con infezione congenita da CMV in relazione ai reperti ecografici cerebrali.

	Ecografia cerebrale normale (n=45)	Ecografia cerebrale patologica (n=12)
Decesso	0	1
QS \leq 85 + deficit motori	0	3
QS \leq 85 + ipoacusia neurosensoriale	0	2
QS \leq 85 + ipoacusia neurosensoriale + deficit motori	0	3
Ipoacusia neurosensoriale + strabismo	0	1
Ipoacusia neurosensoriale isolata	3	0
Strabismo	0	1

QS: quoziente di sviluppo.

Dall'analisi statistica dei dati, è emerso che il 91,7% dei pazienti con ecografia cerebrale patologica in epoca neonatale ha sviluppato almeno una sequela o è andato incontro al decesso, contro il 6,7% nel gruppo con ecografia cerebrale negativa (OR 154, IC 95%: 17,3-1219,6, $p < 0,001$). In Tabella 4 è riassunto il singolo rischio per ciascun tipo di sequela.

L'analisi dei dati è stata condotta anche considerando separatamente i neonati con infezione congenita sintomatica ed i neonati con infezione congenita asintomatica alla nascita. Tutti i neonati sintomatici con ecografia cerebrale patologica hanno sviluppato almeno una sequela, mentre nessuno dei neonati sintomatici con ecografia cerebrale negativa è andato incontro ad esiti neurologici o neurosensoriali ($p < 0,001$). Nel gruppo dei neonati asintomatici alla nascita, 3 su 37 (8,1%) con ecografia cerebrale negativa hanno sviluppato ipoacusia neurosensoriale, mentre uno dei due neonati con ecografia cerebrale patologica ha manifestato sequele neurologiche (OR 11,3, IC 95%: 1,0-141,6, $p = 0,2$).

Tabella 4. Validità dell'ecografia cerebrale nel predire gli esiti neurologici e neurosensoriali in una popolazione di 57 bambini con infezione congenita da CMV.

	Numero (%) di neonati con sequele		Odds Ratio (95% CI)	p	VPP	VPN
	Ecografia cerebrale normale	Ecografia cerebrale patologica*				
QS < 85	0/45	8/11 (72.7%)	ND	<0.001	72.7%	100%
Deficit motorio	0/45	6/11 (54.5%)	ND	<0.001	54.5%	100%
Ipoacusia neurosensoriale	3/45 (6.7%)	6/11 (54.5%)	16.8 (3.2-89.0)	<0.001	54.5%	93.3%
Decesso o almeno una sequela	3/45 (6.7%)	11/12 (91.7%)	154 (17.3-1219.6)	<0.001	91.7%	93.3%

*Un neonato con ecografia cerebrale patologica è deceduto nel primo mese di vita. Sono stati pertanto disponibili dati di follow-up per i rimanenti 11 neonati. VPP: valore predittivo positivo; VPN: valore predittivo negativo; QS: quoziente di sviluppo; ND = non determinabile.

DISCUSSIONE

Il citomegalovirus è causa della più comune infezione intrauterina nei Paesi sviluppati, con una prevalenza dello 0,2-2,2% fra i nati vivi. I neonati con infezione congenita possono manifestare segni di interessamento del SNC, come meningoencefalite, calcificazioni cerebrale, microcefalia, difetti della migrazione neuronale, cisti della matrice germinativa, ventricolomegalia ed ipoplasia cerebellare. La gravità dei segni e sintomi neurologici in epoca neonatale correla con il rischio di sviluppare sequele, fra cui ipoacusia neurosensoriale, ritardo dello sviluppo psico-motorio, deficit motori e visivi (1).

La possibilità di identificare precocemente i neonati a rischio consente di fornire informazioni più precise ai genitori, di avviare un adeguato trattamento e follow-up. Come già riferito, la presenza di segni o sintomi in epoca neonatale peggiora la prognosi: fino all'80% dei neonati con infezione sintomatica svilupperà sequele, mentre i neonati con infezione asintomatica andrà incontro a deficit uditivo o a problemi minori dello sviluppo entro il primo anno di vita al massimo nel 30% dei casi (22, 35, 51, 52, 53). Tuttavia, questi dati indicano anche che la presenza o meno di sintomi alla nascita non discrimina nettamente fra bambini che svilupperanno sequele e bambini che non ne svilupperanno. La TC cerebrale migliora l'accuratezza prognostica nel gruppo dei neonati con infezione congenita sintomatica: infatti circa il 90% nei neonati sintomatici con lesioni cerebrali evidenziate dalla TC andrà incontro ad esiti neurologici o neurosensoriali (3). La TC si è dimostrata utile anche nella valutazione dei neonati con infezione congenita asintomatica: in questo gruppo è stata infatti dimostrata un'associazione fra anomalie cerebrali minori rilevate alla TC (calcificazioni, radiolucenza periventricolare) e maggior rischio di ritardo dello sviluppo psico-motorio e di ipoacusia neurosensoriale (52).

Benchè la TC sia la metodica più utilizzata ed unanimamente approvata per lo studio del SNC nei neonati con infezione congenita da CMV, sarebbe auspicabile disporre di un indicatore prognostico meno invasivo per seguire in follow-up questi bambini. L'ecografia cerebrale può riconoscere la maggior parte delle lesioni provocate da infezioni fetali, come le calcificazioni, la ventricolomegalia, le cisti della matrice germinativa e l'atrofia cerebellare (1, 4,

5). Inoltre, è la tecnica di neuroimaging più innocua per lo studio dell'encefalo neonatale. Può essere utilizzata come metodo di screening, facilmente disponibile al letto del paziente ed eseguibile anche nelle situazioni più critiche, diversamente dalla TC che non è solitamente disponibile all'interno dei reparti di Terapia Intensiva Neonatale e che richiede pertanto lo spostamento del neonato. Inoltre, l'ecografia è la stessa tecnica di imaging utilizzata nel periodo perinatale, per cui disporre di dati prognostici basati su di essa può essere utile anche per chi si occupa di cure prenatali.

Nel nostro studio, sono stati sottoposti ad ecografia cerebrale sia i neonati sintomatici che quelli asintomatici, poichè, come già detto, si possono individuare lesioni cerebrali anche nei bambini con infezione congenita da CMV asintomatica (52, 53). E' emersa una buona correlazione fra i reperti ecografici in epoca neonatale e gli esiti a distanza: il 91,7% dei neonati con ecografia patologica è andato incontro ad almeno una sequela o al decesso, contro il 6,7% dei neonati con ecografia negativa; l'odds ratio (OR) (IC 95%) è risultato pari a 154 (17,3-1219,6), $p < 0,001$. Quando i dati sono stati analizzati tenendo conto della presenza o meno di sintomi alla nascita, è emerso che tutti i neonati sintomatici con ecografia cerebrale patologica hanno sviluppato almeno una sequela, mentre nessun neonato sintomatico alla nascita con ecografia cerebrale negativa ha sviluppato esiti neurologici o neurosensoriali ($p=0,000$). Questi dati concordano con i risultati dello studio del 1997 di Boppana, che ha valutato il significato prognostico della TC cerebrale in una popolazione di neonati con infezione congenita sintomatica da CMV (3).

Proseguendo nell'analisi dei nostri dati, la correlazione fra i reperti ecografici cerebrali e lo sviluppo di sequele è risultata meno forte nel gruppo dei neonati asintomatici, dove non è stata raggiunta la significatività statistica: di questi, solo 2 su 39 (i pazienti 6 e 8 in Tabella 2) hanno presentato alterazioni all'ecografia cerebrale (OR 11,3, IC 95% 1,0-141,6, $p=0,2$). Nel primo caso, si trattava di un neonato nato a termine che presentava all'ecografia cerebrale una ventricolomegalia lieve associata ad iperecogenicità globulare della matrice germinativa: al momento della diagnosi, non era possibile differenziare fra emorragia della matrice germinativa (reperto aspecifico) o microinfarto della matrice germinativa secondario a infezione da CMV. Per questo motivo, l'ecografia è stata considerata patologica, ma il bambino non ha manifestato

alcuna sequela a carico del SNC. Nel secondo caso, si è trattato di un neonato con ventricolomegalia, calcificazioni e cisti all'ecografia cerebrale, che ha sviluppato un ritardo severo dello sviluppo psico-motorio ed un'ipoacusia neurosensoriale. In sintesi, 1 su 39 neonati (pari al 2,6%) con infezione congenita asintomatica è andato incontro a sequele neurologiche e neurosensoriali; l'ecografia aveva evidenziato precocemente le lesioni cerebrali che hanno condizionato la cattiva prognosi. Queste osservazioni suggeriscono di proseguire la valutazione dell'utilità dell'ecografia cerebrale su ampie casistiche di neonati con infezione congenita asintomatica da CMV.

Per quanto riguarda invece la stima del rischio di sordità neurosensoriale, l'ecografia cerebrale non si è dimostrata essere una metodica sensibile. Dei 37 neonati asintomatici con ecografia negativa, nessuno ha sviluppato deficit motori e dello sviluppo neuro-evolutivo, ma 3 sono andati incontro ad ipoacusia neurosensoriale isolata. Una possibile utilità della TC nel definire la prognosi a carico della funzione uditiva nei neonati asintomatici è emersa dallo studio di Williamson e collaboratori del 1992 (53); tuttavia i loro risultati non sono sufficienti per sancire l'introduzione routinaria della TC nel follow-up di questa popolazione di neonati a basso rischio di sequele, mancando per altro una valutazione estensiva del rapporto rischio-beneficio dell'esecuzione della TC cerebrale in epoca neonatale (54). Risultati più interessanti sono stati recentemente riportati sull'utilità di alcuni parametri laboratoristici virologici (CMV-DNAemia, viruria) nel predire la prognosi della funzione uditiva (40, 55).

Dai dati presentati nel nostro studio, emerge che l'ecografia cerebrale è una metodica utile nello studio dei neonati con infezione congenita da CMV e può essere considerata come la metodica di neuroimaging da usare in prima battuta per riconoscere le lesioni cerebrali di questi pazienti. In presenza di un'ecografia cerebrale negativa, il neonato, sia sintomatico che asintomatico alla nascita, andrà incontro con ogni probabilità ad un normale sviluppo psico-motorio, mentre in presenza di lesioni cerebrali tipiche per infezione da CMV viste all'ecografia è molto alto il rischio per lui di sviluppare un severo ritardo dello sviluppo psico-motorio. Questi risultati sono di grande importanza per la comunicazione della prognosi ai familiari del piccolo paziente e per la formulazione del piano terapeutico. L'assenza di lesioni all'ecografia cerebrale

non esclude però il rischio di sviluppare successivamente un'ipoacusia neurosensoriale. Pertanto grande attenzione deve essere posta nel follow-up audiologico di tutti i neonati con infezione congenita da CMV, indipendentemente dai reperti strumentali ottenuti in epoca neonatale.

Benchè non sia stata da noi osservata un'evoluzione nel tempo dei reperti ecografici (calcificazioni, ventricolomegalia, ipoplasia cerebellare, cisti subependimali), il follow-up ecografico di questi bambini può servire a monitorare lesioni come cisti poroencefaliche o emorragie. In nessun neonato con ecografia cerebrale negativa alla nascita sono state rilevate lesioni a controlli ecografici successivi, per cui non appare giustificata la ripetizione dell'esame in presenza di una prima valutazione non patologica.

La RMN cerebrale può essere una metodica utile per identificare lesioni della sostanza bianca o anomalie delle circonvoluzioni cerebrali, che sono piuttosto comuni nei bambini con infezione congenita da CMV dopo il periodo neonatale (2, 56, 57). E' inoltre considerata la tecnica di neuroimaging migliore per studiare le anomalie della migrazione neuronale (58). D'altra parte, l'ecografia cerebrale ha una bassa sensibilità nel riconoscere le alterazioni della corteccia cerebrale ed i difetti della mielinizzazione, poichè distingue con difficoltà la sostanza grigia dalla sostanza bianca e poichè la forma conica del fascio di ultrasuoni limita l'esplorazione delle regioni corticali (59). Nel nostro studio, la RMN ha permesso di riconoscere anomalie corticali e difetti della sostanza bianca non riconosciute dall'ecografia in 6 casi. Come esame complementare all'ecografia, la RMN cerebrale può essere più opportunamente eseguita dopo i primi sei mesi di vita, per meglio valutare le eventuali anomalie della mielinizzazione. Rimane ancora da stabilire se e quando sia indicata l'esecuzione di questa indagine nei neonati con infezione congenita asintomatica da CMV.

In conclusione, l'ecografia cerebrale sembra essere una metodica accurata per formulare una prognosi sugli esiti motori e neuroevolutivi dei neonati con infezione congenita da CMV. E' sicuramente la prima indagine di neuroimaging da eseguire in un neonato infetto; in caso di ecografia patologica alla nascita, sono opportuni un follow-up ecografico ed un approfondimento con RMN cerebrale; in tutti i casi invece, indipendentemente dall'esito dell'ecografia, deve essere avviata un'accurata valutazione audiologica per

riconoscere precocemente un'ipoacusia neurosensoriale.

BIBLIOGRAFIA

1. Volpe JJ. Viral, Protozoan, and Related Intracranial Infections. In: Volpe JJ, Neurology of the newborn. 3rd ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokio: Saunders Company, 1995. p.675-729.
2. Barkovich AJ, Lindan CE. Congenital cytomegalovirus infection of the brain: imaging analysis and embryologic considerations. *AJNR* 1994; 15:703-15.
3. Boppana SB, Fowler KB, Vaid Y, Hedlund G, Stagno S, Britt WJ et al. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1997; 99:409-14.
4. Malinger G, Lev D, Zahalka N, Ben Aroia Z, Watemberg N, Kidron D, et al. Fetal cytomegalovirus infection of the brain: the spectrum of sonographic findings. *AJNR* 2003; 24:28-32.
5. de Vries LS, Gunardi H, Barth PG, Bok LA, Verboon-Maciolek MA, Groenendaal F. The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics* 2004; 35:113-9.
6. Noyola DE, Demmler GJ, Nelson CT, Griesser C, Williamson WD, Atkins JT, et al. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2001; 138:325-31.
7. Whitley RJ, Cloud G, Gruber W, Storch GA, Demmler GJ, Jacobs RF, et al. Ganciclovir treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of a phase II study. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 1997; 175:1080-6.
8. Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, 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.
9. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME et al. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Semin Perinatol* 1983; 7: 31-42.
10. Lazzarotto T. Citomegalovirus. *Microbiologia Medica* 2000;15(1): 3-11.

11. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME et al. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol* 1982; 25:563-576.
12. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326: 663-67.
13. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Walton PD, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med* 1982; 306: 945-49.
14. Gaytant MA, Rours GIJG, Steegers EAP, Galama JMD, Semmekrot BA. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 248-253.
15. 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; 104: 55-60.
16. 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: 443-457.
17. Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* 2000; 74: 6808-20.
18. Gabrielli L, Losi L, Varani S, Lazzarotto T, Eusebi V, Landini MP. Complete replication of human cytomegalovirus in explants of first trimester human placenta. *J Med Virol* 2001; 64: 499-504.
19. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, Landini MP. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 476-82.
20. Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, Rumpianesi F, Banzi C, Bovicelli L, Landini MP. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3540-3544.
21. Persoons MCJ, Stals FS, Van Dam Mieras MCE, Bruggeman CA. Multiple organ involvement during experimental Cytomegalovirus infection is

- associated with disseminated vascular pathology. *J Pathol* 1998; 184: 103-109.
22. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 1986; 256: 1904-8.
 23. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Ambrosetti U, Corbetta C, Sergi P. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 39-42.
 24. Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening : will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed?. *J Pediatr* 1999; 135: 60-4.
 25. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11(2): 93-99.
 26. Lanari M, Lazzarotto T, Papa I, Venturi V, Bronzetti G, Guerra B et al. Neonatal aortic arch thrombosis as a result of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 2001; 108:E114.
 27. Ramsey MEB, Miller E, Peckhan CS. Outcome of confirmed symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child* 1991; 66: 1068-9.
 28. Conboy TJ, Pass RF, Stagno S, Alford CA, Mysers GJ, Britt WJ et al. Early clinical manifestations and intellectual outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 1987; 111: 343-8.
 29. Rivera LB, Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 2002; 110: 762-767.
 30. Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection: what is new? *Infezioni neonatali: attualità e novità*. Mantova, 12-13 settembre 2002. *Atti del congresso*: 115-127.
 31. Noyola DE, Demmler GJ, Williamson WD, Griesser C, Sellers S, Llorente A, Littman T, Williams S, Jarrett L, Yow MD and The Congenital CMV Longitudinal Study Group. Cytomegalovirus urinary excretion and long

- term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 505-10.
32. Kumar ML, Nankervis GA, Jacobs IB, Ernhart CB, Glasson CE, McMillan PM, Gold E. Congenital and postnatally acquired cytomegalovirus infections: long-term follow-up. *J Pediatr* 1984; 104: 674-679.
 33. Ivarsson SA, Lernmark B, Svanberg L. Ten-year clinical, developmental, and intellectual follow-up of children with congenital cytomegalovirus infection without neurologic symptoms at one year of age. *Pediatrics* 1997; 99: 800-803.
 34. Temple RO. Neuropsychological functioning in patients with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Dev Behav Pediatr* 2000; 21: 417-422.
 35. Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 1997; 130:624-30.
 36. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3350-52.
 37. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2000; 137:90–95.
 38. Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, Barjot P, Garbarg-Chenon A, Lebon P, Freymuth F. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1767-1772.
 39. Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Baldanti F, De Julio C, De-Giuli L, Nicolini U, Gerna G. Prenatal diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody response in blood of congenitally infected fetuses. *J Infect Dis* 1999; 180: 1320-23.
 40. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B et al. Neonatal Cytomegalovirus Blood Load and Risk of Sequelae in

Symptomatic and Asymptomatic Congenitally Infected Newborns. *Pediatrics* 2006; 117: e76-e83.

41. Allan WC, Hold PJ, Sawyer LR, Tito AM, Meade SK. Ventricular dilation after neonatal periventricular-intraventricular hemorrhage: natural history and therapeutic implications. *Am J Dis Child* 1982; 136:589-93.
42. Coley BD, Rusin JA, Boue DR. Importance of hypoxic/ischemic conditions in the development of cerebral lenticulostriate vasculopathy. *Pediatr Radiol* 2000; 30:846-55.
43. Cabanas F, Pellicer A, Morales C, Garcia-Alix A, Stiris TA, Quero J. New pattern of hyperechogenicity in thalamus and basal ganglia studied by color Doppler flow imaging. *Pediatr Neurol* 1994; 10:109-16.
44. Wang HS, Kuo MF, Chang TC. Sonographic lenticulostriate vasculopathy in infants: some associations and a hypothesis. *AJNR* 1995; 16:97-102.
45. Weber K, Riebel T, Nasir R. Hyperechoic lesions in the basal ganglia: an incidental sonographic finding in neonates and infants. *Pediatr Radiol* 1992; 22:182-6.
46. Brunet O and Lézine I. *Le développement psychologique de la petite enfance*. PUF, Paris (1965).
47. Grossman HJ, *Manual on terminology and classification*. American Association on Mental Deficiency, Washington (1973).
48. Milani-Comparetti A, Gidoni FA. Routine developmental examination in normal and retarded children. *Dev Med Child Neurol* 1967; 9:631-8.
49. Brazelton TB Nugent, JK. *Neonatal Behavioral Assessment Scale*. Ed. Mac Keith Press 3rd US edition 1995.
50. Prechtl HFR. State of the art of a new functional assessment of the young nervous system. An early prediction of cerebral palsy. *Early Hum Dev* 1997; 50:1-11.
51. Saigal S, Lunyk O, Larke B, Chernesky MA. The outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. *Am J Dis Child* 1982; 136:896-901.
52. Williamson W, Percy AK, Yow MD, Gerson P, Catlin FI, Koppelman ML et al. Asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. Audiologic, neuroradiologic, and neurodevelopmental abnormalities during the first year. *AJDC* 1990; 144:1365-8.
53. Williamson W, Demmler GJ, Percy AK, Catlin FI. Progressive hearing loss

- in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1992; 90:862-6.
54. Huda W, Chamberlain CC, Rosenbaum AE, Garrisi W. Radiation doses to infants and adults undergoing head CT examinations. *Med Phys* 2001; 28:393-9.
55. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RD, Lakeman FD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr* 2005;146:817-23.
56. Haginoya K, Ohura T, Kon K, Yagi T, Sawaishi Y, Ishii KK, et al. Abnormal white matter lesions with sensorineural hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection: retrospective diagnosis by PCR using Guthrie cards. *Brain Dev* 2002; 24:710-4.
57. van der Knaap MS, Vermeulen G, Barkhof F, Hart AA, Loeber JG, Weel JF. Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology* 2004; 230:529-36.
58. Barkovich AJ, Chuang SH, Norman D. MR of neuronal migration anomalies. *Am J Radiol* 1988; 150:179-87.
59. Pellicer A, Cabanas F, Perez-Higueras A, Garcia-Alix A, Quero J. Neural migration disorders studied by cerebral ultrasound and colour Doppler flow imaging. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995; 73:F55-61.

Ringrazio

per gli insegnamenti ricevuti durante gli anni di specializzazione e di dottorato

e per l'aiuto nel compimento del presente lavoro

il Prof. Gian Paolo Salvioli,

il Prof. Giacomo Faldella,

il Dott. Marcello Lanari,

la Dott.ssa Gina Ancora,

la Dott.ssa Tiziana Lazzarotto.