

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI
SERVIZI: PROGETTO N. 1
MEDICINA MATERNO INFANTILE E DELL'ETA'
EVOLUTIVA E FISIOPATOLOGIA DELLA FUNZIONE
SESSUALE**

Ciclo XXIII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: M40

**PROBLEMATICHE DELLE INFEZIONI DA
CMV IN GRAVIDANZA:
RUOLO DELL'ECOGRAFIA**

Presentata dalla Dott.ssa Rebecca Marconi

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. L. Bolondi Chiar.mo Prof. N. Rizzo

Esame finale anno 2011

INTRODUZIONE

I Citomegalovirus (CMV) sono un gruppo di agenti appartenenti alla famiglia degli herpesvirus, con distribuzione ubiquitaria nell'uomo e in numerosi altri mammiferi.

L'infezione da CMV, a seguito della diffusione del vaccino per la rosolia, rappresenta la più frequente causa di infezione congenita nei paesi sviluppati con conseguenze fetali anche gravi.

Ancora oggi non sono disponibili né vaccini né farmaci antivirali sicuri ed efficaci per prevenire o curare l'infezione in utero. Per questo motivo la gestione preconcezionale e/o prenatale attualmente disponibile mira essenzialmente all'identificazione precoce dell'infezione nella gravida e nel feto, presupposto da un lato per un pronto riconoscimento dell'infezione postnatale nell'ottica di attuare tempestivamente gli interventi terapeutici e/o riabilitativi disponibili, dall'altro per circoscrivere il numero delle perdite fetali generate da uno screening che non sia basato sulla disponibilità di validi interventi di prevenzione.

Il CMV è un virus endemico senza variazioni stagionali. La prevalenza aumenta con l'età⁽¹⁾ ed è più alta nelle popolazioni in via di sviluppo dove la sieropositività può raggiungere il 95-100% tra i bambini in età prescolare mentre studi su bambini della stessa età in G.Bretagna e certe zone degli USA hanno trovato meno del 20% di sieropositività. La sieropositività tra donne giovani varia dal 50% all'85% (1, 2, 3, 4, 5, 6).

La più alta prevalenza nelle popolazioni a basso tenore socio-economico è dovuta probabilmente a fattori che contano nell'aumentata esposizione al virus quali sovraffollamento, cattive

condizioni igieniche, pratiche sessuali più promiscue e maggiore contatto con i bambini.

Fonti di infezione sono le urine, le secrezioni orofaringee, il liquido seminale, il latte, le lacrime, gli emoderivati e gli organi utilizzati per omotraspianto. Il virus non viene facilmente trasmesso attraverso contatti casuali, ma richiede esposizioni intime ripetute o prolungate⁽⁷⁾.

La via di trasmissione dell' infezione da CMV tra i bambini che frequentano l'asilo, è rappresentata dalla saliva sulle mani e sui giochi. Questo meccanismo risulta importante in quanto il bambino escretore del virus diventa una fonte di infezione per il personale che lo cura e per i genitori sieronegativi. Esiste chiara evidenza del fatto che le donne sieronegative gravide che sono soggette ad un maggior rischio di infezione sono quelle che lavorano in asili nido⁽²⁾ e/o hanno figli che frequentano asili.

1. **INFEZIONE DA CMV IN GRAVIDANZA**

1-1 Trasmissione e patogenesi

L'infezione materna è l'origine delle infezioni congenite e della maggior parte di quelle perinatali.

Circa il 50% delle gravide sono sieronegative per CMV in Europa e USA ⁽⁸⁾ e il rischio di sieroconversione in gravidanza è stimato tra lo 0.7 e il 4.1%. Con un'incidenza dello 0.2-2.2% (media 1%)^(2, 9), l'infezione da CMV rappresenta la principale causa di infezione congenita nei paesi sviluppati.

L'infezione congenita è la conseguenza della trasmissione transplacentare. La placenta ha infatti un ruolo chiave nel proteggere o meno il feto dall'infezione, comportandosi come una "porta" nei casi di trasmissione e come barriera nei casi di non trasmissione^(10, 11). Tuttavia i meccanismi cellulari che regolano la permissività o non permissività non si conoscono ancora.

La trasmissione in utero del CMV può realizzarsi sia come conseguenza di una infezione primaria che di una infezione ricorrente^(2, 12, 13, 14) dovuta o ad una riattivazione del virus⁽²⁾ o a reinfezione esogena con un ceppo virale diverso⁽¹³⁾. Al momento è impossibile definire sia con markers sierologici che virologici in quale paziente si può realizzare una riattivazione dell'infezione durante la gravidanza.

Le due più importanti fonti di infezione nel periodo perinatale sono il latte infetto (63%) e il tratto genitale infetto (soprattutto in epoca gestazionale tardiva imputato del 26-57% delle infezioni, definite infezioni natali)⁽²⁾. L'escrezione virale da faringe e da tratto urinario

nella fase tardiva di gestazione e nei primi mesi del post-partum non è stata associata con la trasmissione perinatale.

Una volta trasmessa l'infezione, il primo impianto del virus avviene a livello orofaringeo e dei tessuti linfatici locali; segue poi una diffusione viremica e l'avvio dei fenomeni immunitari di tipo cellulare e umorale.

L'infezione primaria nell'adolescente e nel giovane adulto è spesso associata a una vivace risposta dei linfociti T che può contribuire allo sviluppo di una sindrome mononucleosica simile a quella che si osserva nell'infezione da virus di Epstein-Barr. Una volta acquisito, il CMV persiste indefinitamente nei tessuti dell'ospite e può riattivarsi se la risposta T-cellulare dell'ospite declina per malattie e/o immunodepressione iatrogena.

L'infezione intrauterina è il risultato della viremia materna con conseguente infezione placentare e disseminazione ematica nel feto. Dopo una prima fase viremica fetale (fase di disseminazione) il virus può invadere e replicarsi produttivamente negli organi bersaglio (sistema nervoso centrale, fegato, orecchio interno, rene ecc.) e, una volta eliminato con la diuresi fetale nel liquido amniotico, può essere nuovamente ingerito dal feto, replicarsi nell'epitelio oro-faringeo e passare quindi ad un'ulteriore fase di disseminazione ematica (Fig. 1).

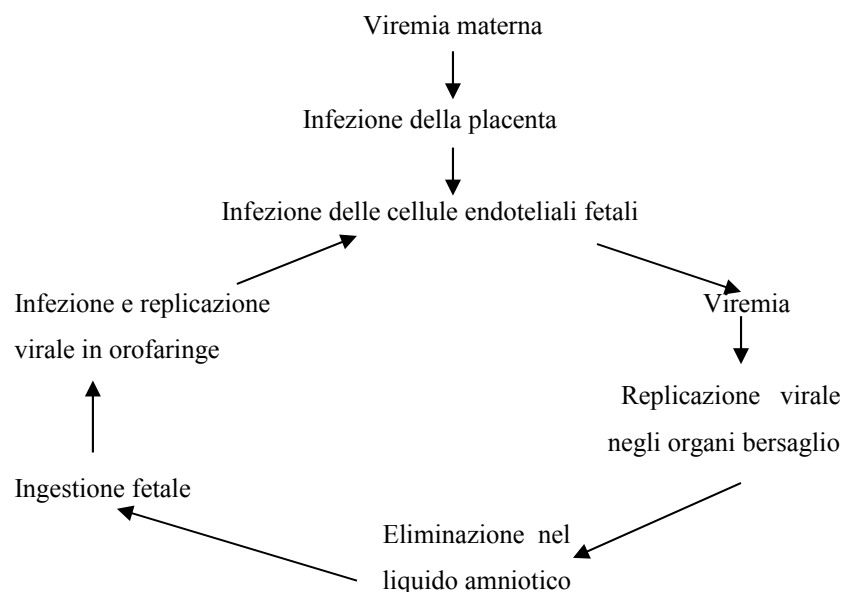
L'infezione congenita risulta più frequentemente il risultato di una infezione acquisita per la prima volta in gravidanza, con un tasso di trasmissione intrauterina nell'ordine del 30-40%. In questi casi le placente sono sempre positive alla ricerca degli antigeni e del DNA virale; tutti i tipi di cellule placentari sono permissive all'infezione e i fibroblasti sono le cellule numericamente maggiormente coinvolte⁽¹⁰⁾. Nel restante 60-70% dei casi quindi, un meccanismo ancora non chiarito ma che generalmente è noto come barriera placentare,

dovrebbe agire per prevenire l'infezione fetale. In questi casi, probabilmente i trofoblasti, che sono le cellule placentari a contatto con il sangue materno, non si infettano e quindi l'infezione non progredisce nello stroma placentare, il virus così non giunge alle cellule endoteliali dei capillari placentari e quindi al feto.

Casi di trasmissione da gravide già immuni sono invece riportati nello 0.5-2.2% dei casi con bassa probabilità di infezione congenita sintomatica grave. Non è chiaro come il virus evada il sistema immunitario in questi casi. Il CMV potrebbe diventare latente e riattivarsi in siti meno accessibili all'esame virologico, come l'endometrio o il miometrio, diffondendosi nel feto e causare l'infezione congenita al di là dell'immunità materna.

La trasmissione materno-fetale avviene con la stessa frequenza durante l'intero arco gestazionale, ma l'entità dei danni feto-neonatali, in particolare le severe compromissioni cerebrali, sembrano correlati pressoché esclusivamente all'infezione contratta nella prima metà della gravidanza, in particolare entro le prime 16 settimane⁽¹⁵⁾.

Fig.1 Possibile meccanismo patogenetico dell'infezione intrauterina da CMV :



1-2 Manifestazioni cliniche

L'infezione da CMV nelle gravide, così come in ogni ospite immunocompetente, è quasi sempre asintomatica anche durante la fase acuta. Talvolta le manifestazioni sono talmente modeste ed aspecifiche (febbricola, mialgie, astenia) da essere sottovalutate e solo eccezionalmente il quadro clinico (sindrome similmononucleosica o epatite) consente di sospettare l'infezione.

Il CMV assume particolare importanza se contratto in condizioni di immunodepressione e se trasmesso in utero. Nel primo caso il virus rappresenta un importante e frequente agente patogeno virale nei trapiantati d'organo e nei pazienti con AIDS dove spesso causa retinite o una malattia disseminata contribuendo alla letalità in modo determinante^(7, 16, 17).

Le conseguenze dell'infezione in utero sono rilevanti. Dei 44.000 bambini (1% delle nascite) nati annualmente con infezione congenita da CMV negli USA, circa il 10-15% sono sintomatici alla nascita. Le manifestazioni cliniche possono essere talmente gravi da comportare un tasso di mortalità perinatale del 30% ed importanti sequele neurologiche nel 90% di quanti sopravvivono.

Anche i nati asintomatici, in una quota variabile tra il 5 e il 15%, non sono esenti da sequele a distanza consistenti in ritardo psicomotorio, deficit neurologici, corioretinite, ipoacusia.

In sintesi circa il 30% dei neonati infettati congenitamente presenterà problemi di varia gravità alla nascita e/o nel corso della propria vita. In Italia su una quota media di 500.000 nati vivi/anno 5.500

acquisiscono l'infezione in utero e tra questi circa 1.700 sono destinati ad avere forme di handicap più o meno severo.

Il quadro clinico neonatale comprende: sindromi polivisceritiche (ittero protratto, petecchie, porpora trombocitopenica, epatosplenomegalia, polmonite interstiziale, encefalite, trombosi arteriose associate ad interessamento multiorgano e trombosi aortica), forme clinicamente attenuate (problemi epatici, con epatosplenomegalia e trombocitopenia e/o IUGR e prematurità), anomalie strutturali(a carico del SNC: microcefalia, idrocefalia, ventricolomegalia, calcificazioni cerebrali, disordini di migrazione neuronale, ipotonia, letargia, convulsioni; a carico dell'apparato gastroenterico; a carico dell'apparato cardiovascolare: cardiomegalia), manifestazioni neurosensoriali (danni oculari come la corioretinite che possono manifestarsi e/o progredire fino all'età di 10 anni⁽¹⁸⁾, ipoacusia neurosensoriale). Il CMV è la causa più importante di sordità nell'infanzia insieme alle forme geneticamente trasmesse. Il 58% di tutti i bambini con infezione congenita sintomatica presenta un deficit sensitivo alla nascita variabile tra forme lievi e profonde, con deterioramento progressivo in circa il 50% dei casi. La perdita dell'udito è bilaterale in un'alta percentuale di casi e produce deficit nel linguaggio e nell'apprendimento tanto maggiori quanto più la diagnosi risulta ritardata, venendo meno le possibilità riabilitative precoci.

Altre manifestazioni possono essere: idrope fetale non immune, oligoidramnios, polidramnios, edema della cute, ispessimento placentare, difetti dello smalto dentario.

Alterazioni laboratoristiche⁽¹⁹⁾ riscontrabili sono: elevazione transaminasi epatiche (ASP >80 U/L), iperbilirubinemia coniugata,

trombocitopenia ($<100.000/\text{mm}^3$), elevazione delle proteine nel liquor ($>120 \text{ mg/dl}$).

I nati asintomatici hanno una prognosi a lungo termine migliore rispetto ai neonati con infezione congenita sintomatica. Tuttavia anch'essi, in una quota variabile tra il 10 e il 15%, non sono esenti da sequele a distanza consistenti in ritardi psicomotorio e deficit neurologici (5% dei casi), corioretinite (2% dei casi), ipoacusia⁽¹⁹⁾. Queste anomalie normalmente diventano evidenti dopo i due anni di vita⁽²⁾. La patogenesi e il meccanismo con cui si instaurano le alterazioni dell'udito e neurologiche non è ancora chiaro, soprattutto nei nati infetti asintomatici.

La sordità neurosensoriale risulta essere il deficit osservato più comunemente (10% dei nati asintomatici), mentre da studi recenti emergono dati incoraggianti per quanto riguarda gli esiti neurocomportamentali che, in assenza del deficit uditivo, sembrano sovrapponibili a quelli trovati nella popolazione generale^(20, 21, 22). L'instaurarsi tardivamente della riduzione dell'udito, la progressione e la fluttuazione della perdita neurosensoriale ed il non aver ancora definito dei predittori di outcome avverso, indicano che i test fatti durante i primi giorni e nel primo anno di vita non escludono la possibilità della riduzione dell'udito in futuro. Di conseguenza, i bambini a rischio, sintomatici o no, devono essere sottoposti ad attenti e seriati esami audiometrici.

2. DIAGNOSI E GESTIONE DELL'INFEZIONE DA CMV IN GRAVIDANZA

L'infezione da CMV in gravidanza, come già detto, potrebbe esporre il feto a diversi danni. Visto che questo rischio diventa rilevante soprattutto in caso di infezione primaria materna non escludendosi, comunque, del tutto in casi di infezione secondaria (riattivazione), il primo passo diagnostico è l'inquadramento in questo senso dell'infezione materna. Successivamente, dopo una corretta diagnosi sierologica materna, si può fare diagnosi di infezione fetale.

2-1. Diagnosi di infezione materna

Dato che l'infezione da CMV nell'adulto è quasi sempre asintomatica, per l'identificazione della gravida a rischio di trasmettere l'infezione, l'unica via percorribile è lo screening sierologico.

A questo proposito va ricordato che, nonostante l'alta incidenza di infezione congenita, per l'impossibilità di attuare misure preventive, lo screening per l'infezione da CMV è a tutt'oggi oggetto di discussione e in generale non incluso nei programmi governativi a tutela della maternità. Qualora eseguite, le indagini sierologiche richiedono un'attenta interpretazione.

In seguito al primo contagio da CMV le IgM sono i primi anticorpi ad essere prodotti. Le IgG molto spesso compaiono quasi contemporaneamente con le IgM virus-specifiche tranne in un minor numero di casi dove vengono prodotte con lieve ritardo rispetto alle

IgM. Mentre le IgM permangono in circolo per un periodo massimo di 6-9 mesi dopo la fase acuta, le IgG rimangono positive per il resto della vita.

La presenza nel siero degli anticorpi specifici IgG e la negatività delle IgM specifiche è quindi indicativa di infezione pregressa e non prevede ulteriori accertamenti. Infatti, anche se non completamente protettiva, l'immunità acquisita esclude la possibilità di infezione primaria che è quella a maggior rischio per il feto mentre la pur non escludibile reinfezione (riattivazione) comporta un rischio prospettico di danno fetale non superiore a quello riscontrabile nella cosiddetta gravidanza fisiologica. Per gli stessi motivi, la disponibilità di un tale dato preconcezionale, elimina la necessità dello screening in gravidanza.

La gravida non immune (IgG e IgM specifiche negative), essendo a rischio di acquisire l'infezione primaria, oltre ad essere informata sulle norme comportamentali e igieniche (evitare le possibili fonti di contagio come il contatto stretto con bambini in età scolare⁽²³⁾) deve essere sottoposta ad indagini sierologiche periodiche.

In caso di sieroconversione (presenza dei soli anticorpi specifici IgM al primo controllo o rispetto ad un precedente dato negativo e positivizzazione delle IgG specifiche in un secondo campione prelevato dopo 2-3 settimane) si fa diagnosi di infezione primaria.

Se invece al primo controllo risultano positive sia le IgG che le IgM specifiche, da un lato si pone il sospetto di infezione in atto o recente, dall'altro potrebbe esprimere semplicemente una reazione specifica o uno stato di persistenza anticorpale possibile anche per 6-9 mesi dopo la fase acuta. Inoltre gli anticorpi specifici IgM sono riscontrabili anche in una quota rilevante (70%) di infezioni non primarie e pertanto a basso rischio per il feto. Grazie ai tests di approfondimento

a disposizione oggi questa distinzione è possibile. 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. Il test di avidità delle IgG rappresenta quindi un ottimo test di conferma come dimostrato da diversi studi^(24, 25, 26, 27). Per l'infezione da CMV in soggetti immunocompetenti la completa maturazione degli anticorpi avviene in circa 18-20 settimane dal momento del contagio. Per tale ragione l'affidabilità della tecnica nella diagnosi di infezione pregressa alla gravidanza è ottimale qualora la determinazione avvenga precocemente (non oltre la 18-20° settimana di gravidanza^(28, 29)), mentre ad una valutazione più tardiva la predittività positiva del test si riduce notevolmente.
- **Western Blotting (WB).** Rappresenta il test di eccellenza per la conferma degli anticorpi specifici IgM, potendo nel contempo differenziare l'infezione primaria da quella non primaria sulla base del diverso profilo anticorpale nei confronti delle singole proteine strutturali e non strutturali del virus. Più indaginoso e pertanto disponibile solo in centri di riferimento, il test viene di norma riservato ai casi in cui il solo test di avidità delle IgG può non essere sufficiente (epoca gestazionale tardiva).
- **Diagnosi virologica.** L'identificazione del virus o di parti di esso nel sangue materno è certamente un indicatore di infezione primaria, ma è condizionato dal periodo di tempo intercorso. La sensibilità di viremia e antigenemia risultano rispettivamente del 25% e del 50% nel primo mese dopo l'infezione, ma già dopo due

mesi solo il 25% dei pazienti risulta ancora positivo all'antigenemia e nessun paziente al test di viremia. Per quanto riguarda il riscontro del DNA virale, il test è positivo nel 100% dei casi nel primo mese dopo l'infezione e può rimanere positivo anche per 6 mesi, ma solo circa il 50% e 25% dei pazienti risultano positivi a 3-6 mesi dall'infezione⁽³⁰⁾. In sostanza gli esami virologici se positivi sono indicativi di infezione, ma non consentono di escluderla se negativi.

2-2. Diagnosi di infezione fetale

Oggi la diagnosi di infezione fetale da CMV si basa su due esami fondamentali: la diagnosi prenatale invasiva e il monitoraggio ecografico. La prima, a fronte dei rischi legati all'invasività della procedura⁽³¹⁾, consente di verificare o escludere l'infezione fetale; la seconda può evidenziare eventuali anomalie strutturali o dell'accrescimento riconducibili all'infezione citomegalica.

L'utilizzo dell'amniocentesi si consiglia alle donne che hanno contratto l'infezione primaria nella prima metà della gravidanza (sieroconversione o test di avidità basso e/o WB positivo) e in caso di anomalie fetali suggestive di infezione congenita sintomatica da CMV⁽³²⁾.

Nonostante i buoni risultati di alcune esperienze recenti sul sangue fetale^(32, 33, 34), il liquido amniotico resta di fatto il tessuto più idoneo per la ricerca del CMV⁽³⁵⁾. Risulta in pratica inutile l'abbinamento, usuale fino a non molti anni fa, dell'amniocentesi con la funicolocentesi, tecnica più indaginosa e gravata da un rischio fetale pressoché raddoppiato^(35, 36). Al vantaggio di poter disporre di una

tecnica meno invasiva, non ha però fatto seguito l'opportunità di anticiparne l'esecuzione che resta tardiva, pena la possibilità di risultati falsi negativi. Il CMV è infatti un virus a lenta replicazione e si calcola che occorrono da 6 a 9 settimane dopo il contagio materno perché il virus, che trova nell'epitelio tubulare del rene fetale la sede elettiva per la sua replicazione, venga eliminato con l'urina in quantità tale da poter essere rilevato nel liquido amniotico. Inoltre è solo dopo la 20a settimana che la diuresi fetale si stabilizza e diventa consistente^(37, 38). Dunque l'epoca gestazionale migliore per l'esecuzione dell'amniocentesi è almeno 6 settimane dopo il presunto contagio materno e in ogni caso non prima della 20a settimana.

Il rilevamento del CMV nel liquido amniotico si effettua attraverso l'isolamento del virus in coltura e la PCR qualitativa e quantitativa.

L'isolamento virale nel liquido amniotico è un marker certo di infezione congenita, ma la sensibilità della procedura risulta piuttosto bassa ed è variabile tra il 50 e l'80%. Spesso si osservano risultati falsi negativi⁽³²⁾ dovuti principalmente alla difficoltà di invio e mantenimento in condizioni ottimali del liquido amniotico in quanto le particelle virali devono essere infettanti per poter essere ritrovate nella coltura.

La PCR (Polimerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che sfrutta la capacità di autoduplicazione del DNA in presenza di adeguati inneschi della reazione immunitaria (primers) e dell'apposito enzima. La sensibilità della tecnica è prossima al 100% (95-100%)^(32, 10, 39, 40) ma il suo valore predittivo positivo si è dimostrato nella nostra esperienza di poco superiore al 60%^(32, 10, 39, 40).

Anche se l'accuratezza diagnostica di queste tecniche è da ritenersi ottimale⁽⁴¹⁾, la loro applicabilità clinica è comunque difficile.

Un passo avanti nella diagnosi prenatale di infezione fetale viene offerto dalla PCR quantitativa (qPCR), esame che consente di identificare un valore soglia della carica virale indicativo di infezione fetale⁽¹⁰⁾. In particolare, se la valutazione quantitativa del DNA virale è superiore al cut-off (10^3 GE/ml) l'infezione fetale è certa anche in caso di isolamento virale negativo, mentre una carica virale al di sotto di tale soglia può escludere l'infezione del feto con ampio margine di probabilità. E' stata inoltre evidenziata una correlazione significativa tra l'alta carica del virus (10^5 GE/ml) nel liquido amniotico e l'infezione congenita sintomatica (VPP: 66,7%), mentre con una carica virale più bassa l'infezione sintomatica, pur non escludibile, è poco probabile (circa il 3%).

In definitiva, oggi la diagnosi prenatale invasiva consente, se negativa, di escludere l'infezione congenita con una probabilità del 100%⁽⁴²⁾ scoraggiando eventuali interruzioni della gravidanza per la sola ansia di avere contratto l'infezione primaria materna ad alto rischio di trasmissione materno-fetale e permettendo così alla gravida di proseguire la gestazione con più serenità; al contrario, in caso di positività, permette di identificare i feti ad alto rischio di infezione sintomatica permettendo così un adeguato counselling della coppia.

Tuttavia questa metodica di diagnosi prenatale non è esente da limiti; conoscere preliminarmente l'infezione fetale ad esempio non significa prevederne l'evoluzione, considerando che non più di un terzo degli infetti ne porterà le conseguenze. Inoltre non sempre i risultati della diagnosi prenatale concordano con quelli postnatali⁽³⁷⁾. Resta infine il rischio legato all'invasività della procedura.

2. RUOLO DELL'ECOGRAFIA NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE

La diagnosi prenatale invasiva viene completata dall'esame delle alterazioni strutturali e/o dell'accrescimento correlate all'infezione fetale da CMV mediante ultrasonografia (ecografia).

Per il vantaggio della non invasività l'indagine ecografica può essere offerta a tutte le donne. In caso di infezione non primaria e quindi a basso rischio di trasmissione e danno fetale, viene proposta in alternativa all'approccio invasivo che può comportare un rischio di perdita fetale superiore a quello del danno fetale conseguente all'infezione stessa.

Il primo controllo ecografico avviene alla 20-22a settimana di gravidanza, epoca in cui vengono studiate tutte le strutture fetali con particolare attenzione al sistema nervoso centrale (ventricolomegalia⁽⁴³⁾, microcefalia, calcificazioni intracraniche, microftalmia), all'apparato gastro-enterico (iperecogenicità intestinale, malformazioni) e ad alterazioni del liquido amniotico (polidramnios, oligoidramnios) in quanto sedi delle più frequenti anomalie riferibili all'infezione da CMV. Oltre al controllo morfologico della 20-21a settimana di gravidanza sono indicati anche controlli ecografici seriati successivi (28-29a e 30-32a settimana di gravidanza) per identificare alterazioni dell'accrescimento intrauterino fetale (IUGR) e sviluppo tardivo di anomalie strutturali.

Purtroppo, a fronte della non invasività della tecnica, i limiti della ecografia sono ben noti. Le anomalie fetali infatti potrebbero rendersi evidenti tardivamente, cambiare o scomparire nell'arco della gravidanza⁽³⁹⁾. Inoltre non tutti i sintomi da infezione congenita

possono essere visualizzati come ad esempio corioretiniti o petecchie, o come i problemi di ritardo psicomotorio o neurosensoriali. E' infatti ormai universalmente accettato che l'ecografia non identifichi più del 15% dei feti infetti.

Abbiamo di recente pubblicato i risultati di uno studio retrospettivo di 10 anni sulla capacità dell'ecografia di predire l'infezione congenita sintomatica da CMV una volta comprovata sierologicamente l'infezione primaria materna⁽⁴⁴⁾. Il nostro studio ha evidenziato una sensibilità dell'ecografia del 15% ed una specificità del 94% nel predire l'infezione congenita da CMV

Quindi, mentre un reperto anormale è un marker prognostico di outcome clinico sfavorevole, un reperto ecografico normale è certamente rassicurante per la gravida ma scarsamente predittivo di normalità alla nascita.

E' utile sottolineare che l'approccio ecografico transvaginale fornisce un approccio migliore allo studio dell'encefalo fetale permettendo uno studio più dettagliato del parenchima periventricolare⁽⁴⁵⁾. Va quindi utilizzata l'ecografia transvaginale, posizione fetale permettendo, in tutti i feti di pazienti con diagnosi di infezione primaria da CMV per evidenziare reperti ecografici cerebrali indicativi di infezione fetale.

MATERIALI E METODI

Dal Febbraio 1989 al Settembre 2009 sono state sottoposte al nostro protocollo diagnostico tutte le pazienti che sono afferite all'Ambulatorio di Malattie Infettive in Gravidanza dell'U.O. Medicina Età Prenatale (Clinica Ginecologica ed Ostetrica, Policlinico Universitario S.Orsola, Bologna) per sospetta infezione da CMV in gravidanza, ottenuto, nella maggior parte dei casi, mediante lo screening spontaneo per CMV in altri laboratori di base esterni.

Il primo passo del nostro protocollo diagnostico si basa sulla rideterminazione degli anticorpi specifici IgG e IgM per CMV mediante la sierologia di base [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)], la conferma degli anticorpi IgM con l'immunoblot e il test di avidità delle IgG. In base a questi tests sierologici è stato possibile selezionare le pazienti a rischio di trasmissione materno-fetale.

Le donne con diagnosi di infezione primaria in gravidanza hanno eseguito un counselling riguardo il rischio di trasmissione verticale, i possibili danni feto-neonatali e la validità degli esami. 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 e/o nella saliva 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 sono state sottoposte ad esame ecografico morfologico a 20-21 settimane di gestazione per l'identificazione di anomalie associate alla probabile infezione in utero. Tale esame è stato condotto per via transaddominale e transvaginale per la valutazione neurosonografica da operatori esperti. Dopo aver dato consenso informato formulato per iscritto, tutte le donne che hanno scelto la diagnosi prenatale invasiva (721 di 793 pazienti) sono state sottoposte ad amniocentesi a mano libera sotto guida ecografica dopo la 20-21a settimana di gestazione. Nei casi con risultati positivi sul liquido amniotico è stato eseguito un dettagliato esame ecografico ogni 4 settimane.

Il virus è stato isolato nel liquido amniotico mediante:

- Saggio di “Shell Vial
 - PCR qualitativa.
 - PCR quantitativa competitiva eseguita in automatico (metodo COBAS AMPLICOR CMV MONITOR).

In accordo con il nostro protocollo, se è stata identificata un'alta probabilità di danno fetale (anomalie ecografiche e/o alta carica virale nel liquido amniotico), la coppia ha avuto la possibilità di optare per l'interruzione di gravidanza. Se è stata ritrovata una bassa carica virale nel liquido amniotico e non sono state evidenziate anomalie ecografiche, sono stati proposti controlli ecografici seriati a 28 e a 33 settimane ed una risonanza magnetica nel terzo trimestre.

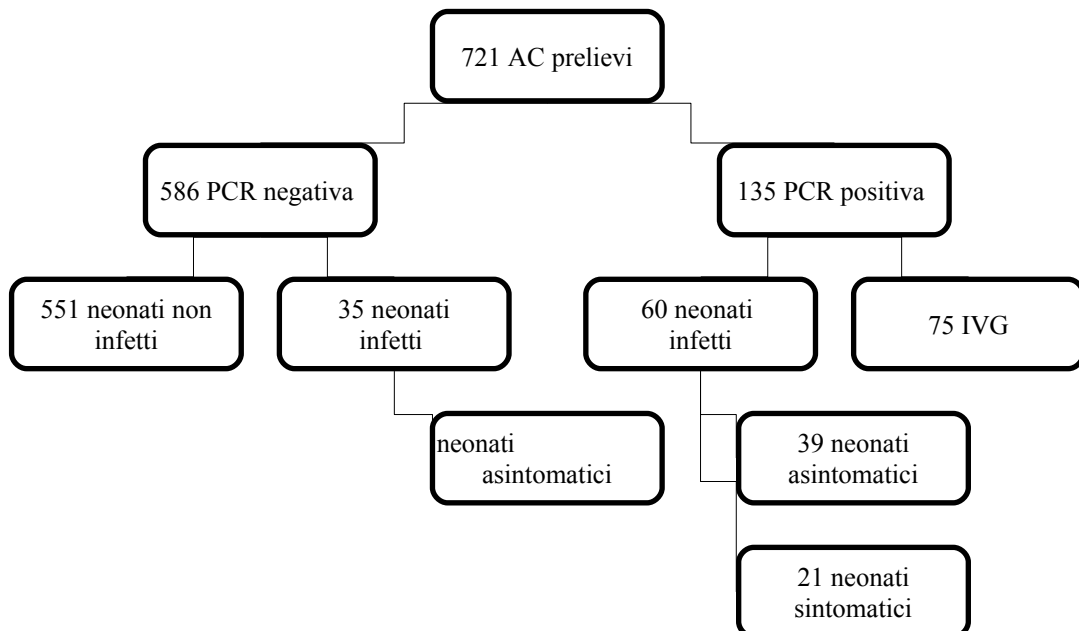
Informazioni sulle condizioni dei feti e dei neonati sono state ottenute direttamente quando le madri hanno interrotto la gravidanza o partorito nel nostro Reparto. Se le madri hanno espletato il parto in altra sede le informazioni sono state ottenute mediante intervista telefonica.

La sensibilità, la specificità e il valore predittivo positivo e negativo dei tests sono stati determinati considerando la correlazione tra i risultati dei test prenatali e la presenza di infezione e/o dei sintomi nei feti e neonati.

RISULTATI

Da febbraio 1989 a settembre 2009 sono afferite ai nostri ambulatori 3231 pazienti alle quali era stata sospettata un'infezione da CMV; in 793 casi è stata confermata la diagnosi di infezione primaria. Di questi 721 pazienti hanno deciso di eseguire l'amniocentesi per diagnosticare l'infezione fetale. Le amniocentesi che hanno fornito un risultato negativo sono state 586; di queste in 551 casi i neonati sono risultati non infetti, in 35 sono risultati infetti ma comunque asintomatici alla nascita. Le amniocentesi che hanno fornito un risultato positivo sono state 135. In 75 di questi casi le pazienti hanno optato per l'interruzione di gravidanza, nei restanti 60 casi sono nati neonati infetti, di cui 39 asintomatici e 21 sintomatici (Tab. 1).

Tabella 1



Anomalie ecografiche sono state evidenziate in 29 feti con infezione congenita (17%) e comprendevano ventricolomegalia cerebrale, ritardo di crescita, intestino iperecogeno, iperecogenicità cerebrale periventricolare, ascite, versamento pericardico, idrope, calcificazioni epatiche, oligoidramnios (Tab 2).

Tabella 2 Outcomes in 29 neonati sintomatici con PCR positiva per CMV nel liquido amniotico

Caso	Ecografia a 20-22 settimane	Shell vial	PCR quantitativa (GE/mL)	Outcome
1	Anomalie cerebrali, versamento pericardico	Pos	88.000	Epatosplenomegalia, microcalcificazioni diffuse cerebrali
2	IUGR	pos	400.000	Neonati di basso peso alla nascita, ritardo psicomotorio dopo il primo anno
3	Ventricolomegalia cerebrale, intestine iperecogeno	pos	1.000.000	Microcalcificazioni diffuse cerebrali, epatosplenomegalia, corioretinite e ritardo menatle dopo il primo anno
4	Ventricolomegalia cerebrale	pos	1.000.000	Sordità unilaterale
5	Severo IUGR, ventricolomegalia cerebrale	pos	1.800.000	Morte neonatale
6	Intestino iperecogeno	neg	3750	Ostruzione intestinale
7	Iperecogenicità intestinale e alone iperecogeno periventricolare	pos	550.000	Ipoacusia bilaterale
8	Ventricolomegalia cerebrale, intestino iperecogeno	pos	480.000	IVG: ventricolomegalia cerebrale, intestino iperecogeno, epatite, polmonite
9	Intestino iperecogeno	pos	650.000	IVG: infezione citomegalica disseminata

Caso	Ecografia a 20-22 settimane	Shell vial	PCR quantitativa (GE/mL)	Outcome
10	Iperecogenicità cerebrale periventricolare	pos	190.000	IVG infezione citomegalica disseminata
11	Ventricolomegalia cerebrale bilaterale, intestino iperecogeno, megacisterna magna	pos	190.000	IVG: infezione citomegalica disseminata
12	Oligoidramnios, ventricolomegalia cerebrale bilaterale, mega cisterna magna, intestino iperecogeno, ispessimento placentare	pos	1.900.000	IVG: infezione citomegalica disseminata + sindrome polimalformativa
13	Dilatazione dei corni frontali dei ventricoli cerebrali dei ventricoli laterali, ipoplasia del corpo calloso	pos	4.500.000	IVG: eseguito solo l'esame istologico della placenta: villite da CMV
14	Diffusa iperecogenicità intestinale	pos	10.000.000	IVG: villite, inclusioni in reni, pancreas, polmone, cervello (gem1)
15	Diffusa iperecogenicità intestinale	pos	10.0000	IVG: villite, inclusioni in reni, pancreas, polmone, cervello (gem2)
16	IUGR, oligoidramnios, iperecogenicità parete ventricolo cerebrale, cardiomegalia e versamento pericardico, ascite, intestino iperecogeno, ispessimento placentare	pos	8.200.000	IVG: infezione citomegalica disseminata

Caso	Ecografia a 20-22 settimane	Shell vial	PCR quantitativa (GE/mL)	Outcome
17	Idrocefalia, intestino iperecogeno, IUGR	pos	790.000	IVG: villite, inclusioni cerebrali, ipofisarie, epatiche
18	Ascite, versamento pleurico, ventricolomegalia cerebrale bilaterale, edema retronucleare	pos	94.000	IVG: infezione citomegalica disseminata
19	Lieve iperecogenicità della sostanza bianca periventricolare, ispessimento placentare	pos	>5.000.000	IVG: infezione polidistrettuale polmonare, pancreatica, surrenalica, epatica e cardiaca
20	Lieve iperecogenicità della sostanza bianca periventricolare	pos	5.000.000	IVG: persa
21	Oligoidramnios, iperecogenicità periventricolare, iperecogenicità intestinale con distensione delle anse, ispessimento placentare	pos	>5.000.000	IVG: non eseguita autopsia (per rifiuto della coppia)
22	Alone iperecogeno periventricolare cerebrale	pos	>5.000.000	IVG: non eseguita autopsia (per rifiuto della coppia)
23	Lieve alone iperecogeno periventricolare cerebrale	pos	>5.000.000	IVG: non eseguita autopsia (per rifiuto della coppia)
24	Alone iperecogeno periventricolare cerebrale	pos	5.000.000	IVG: infezione disseminate. encefalo pos
25	Alone iperecogeno periventricolare cerebrale	pos	>5.000.000	IVG: infezione disseminate. encefalo pos

Caso	Ecografia a 20-22 settimane	Shell vial	PCR quantitativa (GE/mL)	Outcome
26	Alone iperecogeno periventricolare cerebr	pos	1.552.000	IVG: infezione disseminate. encefalo pos
27	Alone iperecogeno periventricolare cerebrale	pos	2.287.232	IVG: persa
28	IUGR, idrope	pos	430.000	MEF: villite, emolisi diffusa con versamento pleurico e addominale, inclusione citomegalica nei polmoni vascolopatia fetale trombotica e ematoma placentare
29	Iperecogenicità cerebrale periventricolare ed epatica	pos	3.000.000	IVG: infezione disseminata

Anomalie ecografiche cerebrali sono state riscontrate in 22 casi, di cui 16 associati ad un'alta carica virale nel liquido amniotico; di queste anomalie cerebrali, 13 casi sono stati caratterizzati dal riscontro di un alone ecogeno periventricolare. Per alone ecogeno periventricolare si intende la presenza di aree ad ecogenicità diffusamente aumentata a margini ben definiti a livello del parenchima che circonda il margine ventricolare bilateralmente, diagnosticato a 20-22 settimane di gestazione. L'iperecogenicità periventricolare risulta particolarmente evidente in sezione coronale specialmente a livello dei corni frontali dei ventricoli laterali. Questo reperto può essere dimostrato chiaramente solo con l'approccio ecografico transvaginale (Fig. 2-3).

Figura 2



Figura 3

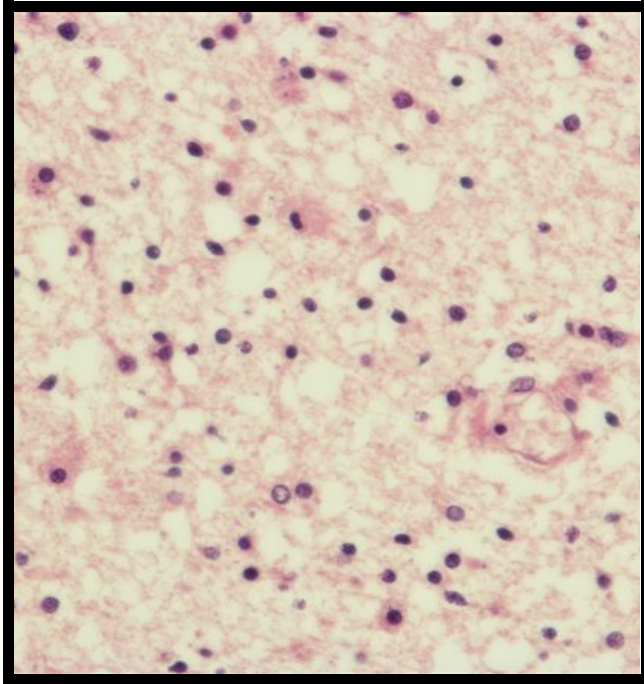


Dei 13 feti con diagnosi ecografica di alone ecogeno periventricolare 5 presentavano anche segni ecografici non cerebrali tra cui i più comuni sono stati l'iperecogenicità intestinale (3 casi su 5) e l'ispessimento placentare (3 casi su 5); altri il ritardo di crescita, l'oligoidramnios, la cardiomegalia e il versamento pericardico, l'ascite, l'iperecogenicità epatica.

Delle pazienti con diagnosi ecografica di alone ecogeno periventricolare 12 hanno deciso di interrompere la gravidanza. In 3 casi la coppia ha rifiutato di eseguire l'autopsia, in 2 casi è stata eseguita in altra sede e non è stato possibile recuperare l'esito. Negli altri 7 casi sono state ritrovate infezioni citomegaliche disseminate con inclusi in reni, pancreas, polmoni e quadri di villite. Di questi in 3 casi erano evidenti segni di infezione a livello cerebrale. Nel caso della paziente che ha proseguito la gravidanza, il sintomo alla nascita è stato l'ipoacusia bilaterale.

Di recente in nostro gruppo ha pubblicato uno studio dove l'esito anatomopatologico cerebrale è stato confrontato con l'aspetto ecografico in due casi⁽⁴⁶⁾. L'esame macroscopico ha evidenziato una correlazione eccellente con l'aspetto ecografico in uno dei due casi, nell'altro gli emisferi apparivano normali a livello macroscopico, ma non all'esame microscopico. L'esame microscopico ha evidenziato modificazioni compatibili con insulto subacuto della sostanza bianca cerebrale assimilabile a leucomalacia telencefalica (Fig. 4).

Figura 4



Nel primo caso è stata evidenziata una severa e diffusa meningoencefalite. Il danno è stato identificato solo istologicamente e consisteva in tipiche lesioni cerebrali da CMV come la laucomalacia periventricolare, la polimicrogiria e la necrosi corticale. Nel secondo caso l'encefalo esaminato appariva affetto meno severamente con solo lesioni focali consistenti in noduli microgliali contenenti cellule infettate da CMV; era comunque presente danno della sostanza bianca consistente in leucoencefalopatia telencefalica.

In entrambi i casi l'unica anomalia ecografica riscontrata in utero era l'alone ecogeno periventricolare.

DISCUSSIONE

Lo scopo della diagnosi prenatale in caso di infezione primaria da CMV in gravidanza è distinguere i feti infetti dai non infetti.

Il limite dell'esame ecografico è ormai noto. Diversi autori negli ultimi anni hanno dimostrato una sensibilità dell'ecografia nell'evidenziare i feti infetti non superiore al 25%. Liesnard et al⁽⁴⁷⁾ hanno avuto un riscontro ecografico in 14 di 55 feti infetti (25%); Enders et al⁽³⁸⁾ in 2 su 17 (12%), Azam et al⁽³⁵⁾ in 5 su 26 (19%), Lipitz et al⁽⁴⁸⁾ in 11 su 51 (21%). In uno studio di recente condotto nel nostro centro la sensibilità ecografica è stata del 15%⁽⁴⁴⁾.

In questo studio sono state identificate 29 anomalie ecografiche in feti con infezione da CMV documentata con una sensibilità del 17%; di queste, in 23 casi si è trattato di anomalie cerebrali, di cui 13 costituite dall'alone ecogeno periventricolare, risultato l'unico reperto ecografico in 7 casi, tutti associati ad un'alta carica virale nel liquido amniotico. Il riscontro di un'alone ecogeno periventricolare, in 2 dei nostri casi dove è stato raffrontato all'esito anatomopatologico, è apparso correlato ad un danno della sostanza bianca identificato istologicamente come una necrosi tipo leucoencefalopatia telencefalica. Dal punto di vista clinico è noto che l'ischemia diffusa della sostanza bianca è associata nei neonati ad insulto cerebrale che è una delle manifestazioni di danno neurologico nelle infezioni congenite da CMV⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹⁾. A quanto noto questo è il primo caso di riscontro ecografico di alone ecogeno periventricolare a margini ben definiti in feti con infezione da CMV a 20-22 settimane di gestazione. Malinger et al.⁽⁴⁵⁾ ha descritto lo spettro dei riscontri ecografici cerebrali nell'infezione da CMV; le anomalie cerebrali più comuni

includevano cisti periventricolari, aderenze intraventricolari, calcificazioni, anomalie delle circonvoluzioni, anomalie del corpo calloso e del cervelletto ed emorragie intracraniche. L'iperecogenicità della matrice germinale periventricolare a margini ben definiti è stata riportata in 4 dei 24 casi a 31 settimane di gestazione associata in tutti i casi ad altre anomalie ecografiche. Tutte queste pazienti hanno deciso di interrompere la gravidanza e gli esami sierologici ed autoptici hanno confermato la diagnosi, evidenziando la polimicrogiria in due casi. Poichè nei nostri casi le gravidanze sono state interrotte subito dopo la diagnosi, non sappiamo se l'alone ecogeno periventricolare descritto nel nostro studio possa essere considerato il predecessore dei danni cerebrali descritti da Malinger. Nel feto il CMV ha una speciale affinità per i neuroblasti metabolicamente attivi della matrice subependimale. La degenerazione subependimale dimostra un diretto o indiretto effetto citopatico del CMV nei neuroblasti e/o nella vascolarizzazione regionale. L'infiammazione associata può risultare in un edema localizzato ed in alterazioni vascolari che si manifestano con un'effusione ematica subependimale⁽⁵²⁾.

Nel nostro studio non è stata eseguita una RM che poteva fornire informazioni aggiuntive su eventuali anomalie dello sviluppo corticale. Recentemente Benoist et al⁽⁵³⁾ ha valutato in uno studio retrospettivo il contributo nella diagnosi di anomalie cerebrali dell'ecografia e della RM in feti con infezione da CMV evidenziando che l'utilizzo della RM aumenta il valore predittivo positivo dell'ecografia da sola. L'età gestazionale media della diagnosi di CMV di questo studio è stata di 31 settimane, mentre l'età gestazionale media di diagnosi dell'alone ecogeno periventricolare nei nostri casi è stata di 20 settimane.

Il riscontro ecografico, quindi, di alone ecogeno periventricolare nei casi di documentata infezione da CMV risulta essere un precoce ed attendibile segno di infezione fetale e di possibile danno della sostanza bianca cerebrale. Occorrono però studi aggiuntivi per valutare la possibile manifestazione clinica di questa anomalia cerebrale nei neonati con infezione da CMV.

BIBLIOGRAFIA

1. Gratacap-Cavallier B et al. *Citomegalovirus seroprevalence in French pregnant women: parity and place of birth as major predictive factors*. Eur J Epidemiol 1998 Feb; 14(2): 147-52
2. Stagno S in Remington and Klein. *Infectious Disease of Fetus and Newborn Infant*. Fifth edition. Ed. W.B. Saunders Company, 2001:389-424
3. Mustakangas P, Sarna S, Ammala P, Muttilanien M, Koskela P, Koskiniemi M. *Human citomegalovirus seroprevalence in three socioeconomically different urban areas during the first trimester: a population based cohort study*. Int J Epidemiol 2000 Jun; 29(3): 587-91
4. Gambarotto K, Ranger-Rogez R, Aubard Y, Piver P, Duffetelle B, Delpeyroux C, Roussanne MC, Nicot T, Denis F. *Primary cytomegalovirus infection and pregnant women: epidemiological study on 1100 women at Limoges*. Pathol Biol (Paris) 1997 Jun; 45(6): 453-61
5. Natali A, Valcavi P, Medici MP, Diaci E, Montali S, Chezzi C. *Citomegalovirus infection in an Italian population: antibody prevalence, virus excretion and maternal transmission*. New Microbiol 1997 Apr; 20(2): 123-33
6. Krech U, Jung M, Jung F. *Citomegalovirus infections of man*. Basel, S Karger, 1971: 28
7. Harrison. *Principi di medicina interna*. 14° edizione. Ed. Mc Grow-Hill, 1999; Vol 1: 1258-1262
8. Ville Y. *The megalovirus* Ultrasound Obstet Gynecol 1998;12:151-153
9. Stagno S, Pass RF, Dworky ME, Alford CA. *Congenital and perinatal citomegalovirus infections*. Semin Perinatal 1983; 7: 31-42
10. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. *Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection*. J Pediatric 2000;137:90-5
11. Lazzarotto T, Gabrielli L, Foschini MP, Lanari M, Guerra B, Eusebi V, Landini MP. *Congenital cytomegalovirus infection in twin pregnancies: viral load in amniotic fluid and pregnancy outcome*. Pediatrics 2003; 112: 153-7

12. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Cristina P, Pinto G, Moraes Figueiredo LT, Jorge SM. *Congenital citomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with High seroprevalence rate*. *Pediatr Infect Dis J* 2001 Feb; 20(2): 188-92
13. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. *Intrauterine transmission of citomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity*. *N Engl J Med* 2001 May 3; 344(18): 1366-71
14. Inoue T, Matsumura N, Fukuoka M, Sagawa N. *Severe congenital citomegalovirus infection with fetal hidrop in a citomegalovirus-seropositive healthy woman*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001
15. 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* 256:1904, 1986
16. Landini MP. *Il citomegalovirus umano*. Ed. AMCLI, 1992: 53-5, 70-82, 92-5
17. Terragna et al. *Trattato delle malattie infettive*. Ed. UTET, 1992: 518-522
18. Stronati M et al. *Infezioni congenite e perinatali*. Edit-Symposia Pediatria e Neonatologia 1998; 248-297
19. Ross SA, Boppana SB. *Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis*. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; 16:44-49
20. Flower KB, Mc Collister FP, Dahle AJ, Boppana S, Pass RF. *Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital citomegalovirus infection*. *J Pediatr* 1997; 130: 624-630
21. Dahle AJ, Fowler KB, Wright JD, Boppana SB, Pass RF. *Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital citomegalovirus*. *J Am Acad Audiol* 2000; 11: 283-290
22. Kashden J, Frison S, Fowler K, Pass RF, Boll TJ. *Intellectual assessment of children with symptomatic congenital citomegalovirus infection*. *J Dev Behav Pediatr* 1998; 19(4): 254-9
23. Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. *Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus by changing behaviors: A randomized controlled trial*. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 240-6
24. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, Guerra B, Landini MP. *Anticitomegalovirus ImmunoglobuliG Avidity in identification of*

- pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection. Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 127-9
25. Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, Gabrielli L, Pradelli P, Guerra B, Landini MP. *Maternal IgG Avidity and IgM detected by Blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. Viral Immunol* 2000; 13: 137-41
26. Beulne D, Goubau P. *Ability of three IgG-Avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001 Apr: 20
27. Bodeus M, Goubau P. *Predictive value of maternal-IgG Avidity for congenital human cytomegalovirus infection. J Clin Virol* 1999 Jan; 12(1): 3-8
28. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, Freymuth F, Eugene G, Stricker R, Dussaux E. *Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. J Infect Dis* 175:944, 1997
29. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP: *Avidità of immunoglobulin G direct against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. Clin Diagn Lab Immunol* 4 :469, 1997
30. Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. *Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. J Infect Dis* 177:1170, 1998
31. Halliday JL, Lumbley J, Sheffield LJ, Robinson HP, Renou P, Carlin JB. *Importance of complete follow-up of spontaneous fetal loss after amniocentesis and chorion villus sampling. Lancet* 1992, 340:886-90
32. 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
33. Revello MG, Gerna G. *Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. J Clin Virol* 2004; 29:71-83
34. Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, 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: 3540-4

35. Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P. *Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection*. *Obstet Gynecol* 2001; 97:443-8
36. Bodeus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. *Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection*. *Prenat Diagn* 1999; 19:314-7
37. Donner C, Liesnard C, Brancart F, Rodesch F. *Accuracy of amniotic fluid testing before 21 weeks' gestation in prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection*. *Prenat Diagn* 1994; 14:1055-9
38. Enders G, Bader U, Lindemann L, Schalasta G. *Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome*. *Prenatal diagnosis* 2001 May; 21(5): 362-77
39. Lipitz S et al. *Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infection*. *Obstet Gynecol* 1997 May; 89(5 Pt 1): 763-7
40. Gouarin S, Palmer P, Cointe D, Rogez S, Vabret A, Denis F, Freymuth F, Lebon P, Grangreot-Keros L. *Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR*. *J Clin Virol* 2001 Apr; 21(1): 47-55
41. 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
42. Graham E, Duhl A, Ural S, Allen M, Blakemore K. *The degree of antenatal ventriculomegaly is related to pediatric neurological morbidity*. *J Matern Fetal Med* 2001 Aug; 10(4): 258-63
43. Cosmi E, Mazzocco M, La Torre R, Ligi P, Sali E, Nigro R. *Therapy or prevention of fetal infection by cytomegalovirus with immunoglobulin infusion in pregnant women with primary infection*. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 2000; 71 Suppl 1: 547-51
44. Guerra B, Simonazzi G., Puccetti C., et al *Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection*. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:380 e 1-7
45. Malinger G., Lev D., Zahaika N., et al *Fetal cytomegalovirus infection of the brain: the spectrum of sonographic findings*. *AJNR AM J Neuroradiol* 2003;24:28-32

46. Simonazzi G., Guerra B., Bonasoni P., Pilu G., et al *Fetal cerebral periventricular halo at midgestation: an ultrasound finding suggestive of fetal cytomegalovirus infection*. Am J Obstet Gynecol 2010; 202(6):599.e-1-5
47. Liesnard C., Donner C., Brancart F., et al *Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection*. Obstet Gynecol 2000; 95 (6Pt1):881-8
48. Lipitz S., Achiron R., Zalei Y., et al *Outcome of pregnancies with vertical transmission of primary cytomegalovirus infection*. Obstet Gynecol 2002; 100(3):428-33
49. Smith C., Squier M.V. *Acquired diseases of the nervous system*. In: Keeling JW, ed. Fetal and neonatal pathology, 4th ed London, UK: Springer-Verlag; 2007:727-34
50. Rorke-Adams L., Larroche J.C., De Vries L. *Fetale and neonatal brain damage*. In: Gilbert- Barnes E., ed Potter's pathology of the fetus infant and child, 2nd ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, 2007: 2027-39
51. Barret R.D., Bennet L., Davidson J, et al. *Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain.*, Birth Defects Res C Embryo Today 2007; 81: 163-76
52. Courville C.B. *Cerebral lesions in cytomegalic inclusion disease*. Bull Los Angeles Neurol Soc 1961;26:9-22
53. Benoist G., Salomon L.J., Mohlo M., Suarez B., Jacquemard F., Ville Y.. *Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging*. Ultrasound Obstet Gynecol 2008; 32:900-5