

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

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

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 06/H1

Settore Scientifico Disciplinare: MED/40

**INFEZIONE PRIMARIA DA CITOMEGALOVIRUS IN GRAVIDANZA:
FATTORI PROGNOSTICI DI MALATTIA SINTOMATICA DETERMINABILI
ENTRO LA VENTIDUESIMA SETTIMANA DI GESTAZIONE**

Presentata da Dott.ssa Francesca Cervi

Coordinatore Dottorato

Prof. Fabio Piscaglia

Supervisore

Dott.ssa Giuliana Simonazzi

Esame finale anno 2018

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	4
MATERIALI E METODI.....	4
Disegno dello studio.....	4
Esiti valutati.....	7
Analisi statistica.....	7
RISULTATI.....	9
Caratteristiche del campione.....	9
Studio morfologico ecografico.....	9
Amniocentesi.....	12
Studio morfologico ed amniocentesi.....	12
DISCUSSIONE.....	15
CONSLUSIONI.....	21
BIBLIOGRAFIA.....	22

INTRODUZIONE

L'infezione da Citomegalovirus (CMV) è una delle principali infezioni congenite nei paesi sviluppati, in cui rappresenta la più comune causa di sordità non-genetica ed una importante causa di ritardo neurologico [1-3]. L'incidenza dell'infezione primaria in corso di gravidanza è approssimativamente tra 1 e 7% con un rischio di trasmissione materno-fetale riportato tra 14.2 e 52.4% [4-7]. L'infezione congenita può portare alla presenza di malattia sintomatica fin dalla nascita in 10-15% dei neonati, con una mortalità perinatale attorno al 10% ed un alto rischio di sequele neurologiche. In assenza di malattia sintomatica alla nascita (85-90%), circa 10-15% dei neonati infetti mostreranno sequele tardive, in particolare deficit uditivo [3,7-8].

E' noto che la presenza di gravi anomalie allo studio ecografico dell'encefalo fetale in epoca prenatale si accompagna a prognosi grave [9,10], ma attualmente è difficile stabilire gli esiti post natali di un feto con anomalie ecografiche non gravi. Studi precedenti hanno dimostrato che il valore predittivo negativo (VPN) dello studio ecografico prenatale nei confronti dell'infezione sintomatica è discretamente alto (93%), specialmente se accompagnato dal dato riguardante l'isolamento virale nel amniotico [11]. La presenza di infezione fetale può essere diagnosticata in epoca prenatale mediante amniocentesi finalizzata all'isolamento di DNA virale nel liquido amniotico attraverso tecniche di amplificazione molecolare (*Real Time Polymerase Chain Reaction- RT PCR*), con buona specificità e sensibilità, ma tale indagine da sola non fornisce informazioni riguardo lo stato clinico della malattia congenita ed il rischio di sequele neurologiche.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il fine dello studio è quello di valutare la predittività nei confronti dell'infezione congenita sintomatica, delle anomalie ecografiche non gravi, in associazione al dato relativo all'isolamento virale su liquido amniotico ottenuto mediante amniocentesi, eseguiti entro la ventiduesima settimana di gestazione.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Studio osservazionale prospettico sulle donne che si sono rivolte all'ambulatorio di malattie infettive in gravidanza del Policlinico S. Orsola-Malpighi nel periodo da gennaio 2007 a dicembre 2015. Le partecipanti sono state arruolate secondo i seguenti criteri di inclusione:

- diagnosi di infezione primaria da CMV entro le prime 15 settimane di gestazione, eseguita sulla base della presenza di IgG e IgM mediante test sierologici di chemioilluminiscenza e conferma tramite *immunoblot* e sulla determinazione dell'indice di avidità basso/medio delle IgG [12-14]. La datazione dell'infezione è stata eseguita sulla base dei dati anamnestici, clinici e laboratoristici;
- studio ecografico della morfologia fetale eseguito presso il nostro centro tra 20 e 21 settimane di gestazione, ad almeno 6 settimane dal presunto contagio materno: l'indagine è stata eseguita da medici ginecologi con approfondita esperienza di diagnosi prenatale ed ha incluso la valutazione di tutti gli organi fetali (ecografia morfologica di II livello) e l'esame neurosonografico [15] fetale attraverso approccio multiplanare ottenuto per via transvaginale, quando possibile;

Le anomalie ecografiche CMV-relate identificate sono state classificate come cerebrali gravi, cerebrali lievi ed extracerebrali, sulla base delle caratteristiche riportate in tabella 1;

- amniocentesi e successivo isolamento di DNA virale mediante *real time PCR* ad almeno 6 settimane dall'infezione materna e dopo la 20^a settimana di gestazione. La valutazione quantitativa tramite PCR ha permesso di identificare il valore di 10⁵ copie/mL come *cut off* per la definizione di alta carica virale [16];

Sono state escluse dallo studio le donne di età inferiore a 18 anni, le gravidanze esitate in aborto spontaneo o interruzione di gravidanza (IVG) nel primo trimestre, le pazienti che hanno rifiutato l'esecuzione di diagnosi prenatale invasiva o il monitoraggio ecografico presso il nostro centro ed i casi persi al *follow up* post-natale.

TABELLA 1
 CLASSIFICAZIONE DELLE ANOMALIE ECOGRAFICHE
 modificata da *Leruez-Ville M et al. [11]*

	Ventricolomegalia ≥ 15 mm
Anomalie cerebrali gravi	Microcefalia < - 2 SD Microencefalia/atrofia cerebrale con allargamento degli spazi pericerebrali Ipoplasia del verme cerebellare Lissencefalia Cisti periventricolari Leucomalacia cistica periventricolare Anomalie del corpo calloso
	Ventricolomegalia lieve (10 -15 mm)
Anomalie cerebrali lievi	Aderenze intraventricolari Calcificazioni intracerebrali Cisti sub-ependimali Alone periventricolare
	Intestino iperecogeno
Anomalie extra-cerebrali	Feto piccolo per epoca gestazionale (PFS <10° centile) Oligoidramnios (massima falda <2 cm) Ascite Versamento pleurico, edema sottocutaneo, idrope fetale Placentomegalia (spessore ≥ 40 mm) Calcificazioni intraepatiche

Esiti valutati

Al fine dello studio sono stati valutati i seguenti esiti post natali e post-IVG:

- isolamento di DNA virale mediante *real time PCR* eseguito sulle urine dei neonati entro le prime due settimane di vita o isolamento immuno-istochimico dell'antigene ppUL44 nei tessuti fetali e placentari in caso di IVG del secondo trimestre;
- *follow up* clinico, laboratoristico, audiometrico e di *imaging* cerebrale dei nati infetti di almeno due anni. Sono stati considerati sintomatici i neonati che hanno presentato alla nascita o successivamente up uno dei seguenti segni o sintomi: clinici di malattia quali ritardo di crescita intrauterina, epato/spleno-megalia, petecchie, porpora cutanea, microcefalia, leteragia, ipotonia, ittero, difficoltà alla suzione, convulsioni, polmonite; alterazione dei valori di laboratorio quali trombocitopenia (conta piastrinica $<100\ 000/\text{mm}^3$), iperbilirubinemia, ($>3\ \text{mg/dL}$), ipertransaminasemia (GPT $> 80\ \text{U/L}$); alterazioni alle indagini strumentali quali *Auditory Brainstem Responses* (ABR), *fundus oculi*, ecografia e risonanza magnetica cerebrale (iperecogenicità periventricolare, calcificazioni intracraniche, ventricolomegalia, iperecogenicità dei vasi ventricolostriatali, pseudocisti, ipoplasia cerebellare) ed addominale (ascite, epato-splenomegalia). Le informazioni relative ai *follow up* neonatali sono state ottenute attraverso la consultazione di cartella clinica dei nati seguiti presso il nostro presidio ed attraverso interviste telefoniche ed invio di questionari ai genitori e pediatri di riferimento dei nati seguiti presso altra sede [17-18];
- autopsia fetale in caso di IVG del secondo trimestre. Le valutazioni macroscopiche, istologiche e immunoistochimiche dei tessuti fetali bersaglio dell'infezione da CMV (pancreas, fegato, intestino, encefalo e coclea) hanno permesso di classificare i feti abortiti come potenzialmente sintomatici, sulla base dell'estensione del danno cerebrale ed extra-cerebrale osservato [19]. In corso di autopsia fetale, sono stati analizzati placenta, encefalo, cuore, polmone, fegato, rene, milza e pancreas, la presenza di infezione è stata valutata attraverso indagine immunoistochimica degli antigeni virali (ppUL44) e degli infiltrati infiammatori (CD3, CD4, CD8, CD 20 e granzima B). La presenza di danno cerebrale fetale degli encefali infetti è stato valutato attraverso classificazione semi-quantitativa delle lesioni osservate a carico di corteccia, sostanza bianca e matrice germinale, presenza di noduli microgliali e di alterazioni vascolari. Il danno fetale cerebrale è stato classificato sulla base

dell'entità delle alterazioni riscontrate: feti verosimilmente asintomatici in presenza di antigeni virali senza alterazioni istologiche patologiche, feti sintomatici in caso di presenza di noduli cerebrali microgliali con/senza necrosi della sostanza bianca e della corteccia o polimicrogiria [19]..

Analisi statistica

Le caratteristiche del campione sono state espresse come media, intervallo, frequenze assolute e relative attraverso statistica descrittiva. Le variabili dicotomiche sono state testate mediante *Fisher's exact test* e l'*odds ratio* (OR) è stato calcolato insieme all'intervallo di confidenza del 95% (95% CI). L'area sotto la curva ROC (AUC) è stata calcolata insieme all'errore standard (SE) per valutare l'accuratezza dei test diagnostici (ecografia ed amniocentesi) nel rilevare l'infezione congenita e la malattia sintomatica. Sono stati riportati anche sensibilità, specificità e i valori predittivi positivi e negativi dei test indagati. I dati sono stati gestiti e analizzati utilizzando il pacchetto IBM SPSS Statistics (versione 23; IBM Co., Armonk, NY, USA) e sono stati considerati statisticamente significativi in caso di *P-value*<0,05.

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico S. Orsola-Malpighi ed è stato condotto in accordo con i principi della dichiarazione di Helsinki.

RISULTATI

Caratteristiche del campione

Lo studio ha arruolato 308 donne in gravidanza con diagnosi di infezione primaria entro la 15^a settimana di gestazione, di età media pari a 32 anni (intervallo: 18-44). L'insorgenza dell'infezione materna è stata precisamente datata in 303 donne: 35(11.6%) casi di infezione periconcezionale (da 3 settimane prima a 3 settimane dopo il concepimento), 242 (79.9%) infezioni del primo trimestre (da 4 a 13 settimane dopo il concepimento) e 26 infezioni dopo la 13^a settimana (8.6%) [20]. Le gravidanze arruolate hanno portato alla nascita di 286 (92.9%) neonati, 21 (6.8%) feti abortiti nel secondo trimestre ed un caso di morte fetale intrauterina (0.3%).

Studio morfologico ecografico

L'esame ecografico morfologico ha rilevato la presenza di uno o più segni patologici in 15 (4.9%) gravidanze: 2 (13.3%) casi di gravi anomalie cerebrali, 10 (66.7%) anomalie cerebrali lievi e 9 (60.0%) anomalie extracerebrali (alcuni feti hanno presentavano contestualmente più di una alterazione) . Due feti, affetti da gravi danni cerebrali a prognosi sfavorevole (microencefalia in entrambi i casi), sono stati esclusi dall'analisi statistica: entrambe le gravidanze sono state interrotte dopo la diagnosi prenatale e lo studio autoptico ha rilevato grave danno cerebrale in entrambi i feti. Pertanto sono stati presi in considerazione 293 (95%) esami ecografici normali e 13 (4.2%) anormali, questi ultimi comprensivi sia di anomalie ecografiche cerebrali lievi che extra-cerebrali.

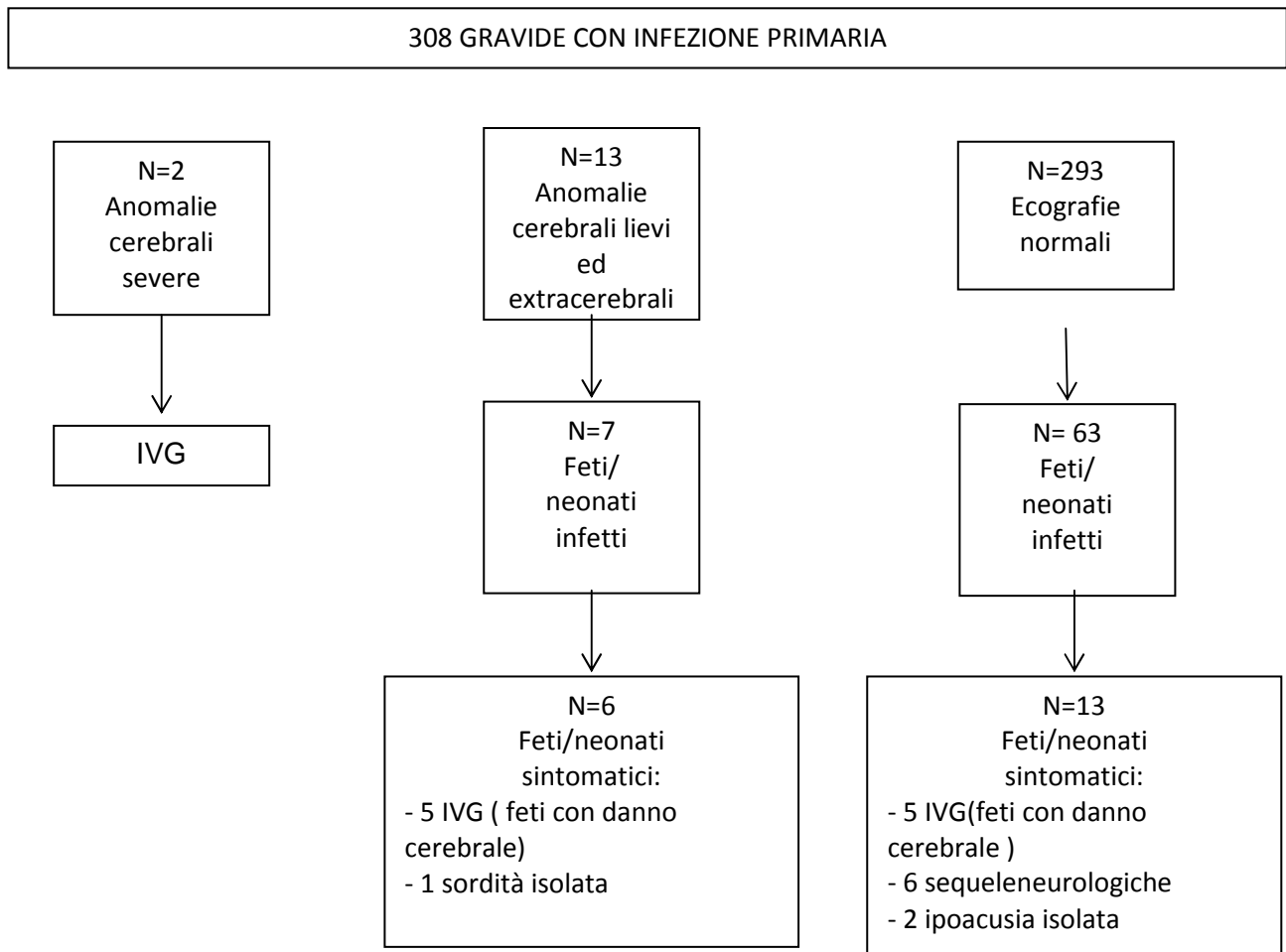
L'infezione congenita è stata diagnosticata in 70 casi (50 neonati e 20 feti abortiti), mostrando un tasso di trasmissione verticale pari a 22.9%.

La trasmissione verticale è stata significativamente maggiore nelle gravidanze in cui i feti hanno mostrato anomalie ecografiche cerebrali lievi e/o extracerebrali (7/13, 53.8%) rispetto alle gravidanze con ecografia morfologica normale (63/293, 21.5%) (P=0.013). La presenza di alterazioni ecografiche all'esame morfologico ha dimostrato un OR pari a 4.26 (95% CI: 1.38-13.13) nei confronti dell'infezione congenita, con sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) rispettivamente di 10.0%, 97.5%, 53.8% e 78.5%.

Diciannove dei 70 casi di infezione congenita (27.1%, 10 feti e 9 neonati) sono stati definiti sintomatici sulla base dell'esame autoptico o del *follow-up* pediatrico, mentre i rimanenti 51 casi non hanno mostrato segni o sintomi di malattia (72.9%, 10 feti e 41 neonati).

L'infezione sintomatica è stata rilevata in 6 su 13 (46.2%) neonati/feti con anomalie ecografiche ed in 13 su 293 (4.4%) neonati/feti di gravidanze con ecografie normali (OR = 18,5, 95% CI: 5,43-62,8, P<0,001). La sensibilità, specificità, VPP e VPN per infezione congenita sintomatica sono risultati rispettivamente 31,6%, 97,6%, 46,2% e 95,6% con un valore AUC ± SE= 0,646 ± 0,033. La figura 1 mostra il diagramma di flusso della distribuzione delle donne secondo i risultati descritti.

FIGURA 1
DESCRIZIONE DEL CAMPIONE



Escludendo i 20 feti abortiti, l'infezione sintomatica si è verificata in 9 neonati (dettagli in tabella 2): in un solo caso tra gli 8 (12.5%) che mostravano anomalie ecografiche cerebrali e in 8 casi tra i 278 (2.9%) nati da gravidanze con ecografia morfologica normale (OR = 4.82, 95% CI: 0.53-44.0, P= 0.228). Quindi il valore di AUC \pm SE calcolato risulta pari a 0,543 \pm 0,104 con valori di sensibilità, specificità, VPP e VPN rispettivamente di 11,1%, 97,5%, 12,5% e 97,1%. Tre dei nove neonati sintomatici(33,3%) hanno mostrato deficit uditivi isolati (ipoacusia/sordità)e solamente uno (11,1%) mostrava un'anomalia ecografica lieve allo studio morfologico del secondo trimestre (iperecogenicità intestinale).

TABELLA 2

CARATTERISTICHE DEI NEONATI INFETTI CON MALATTIA SINTOMATICA

CASO	ECOGRAFIA	CARICA VIRALE SU LIQUIDO AMNIOTICO (copie/mL)	SINTOMI
1	Normale	$> 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Trombocitopenia • Sordità bilaterale • Ritardo del linguaggio
2	Normale	$> 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Cisti cerebrali
3	Normale	$< 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Convulsioni
4	Normale	< 500 (non rilevabile)	<ul style="list-style-type: none"> • Ipoacusia monolaterale
5	Intestino iperecogeno	$> 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Sordità bilaterale
6	Normale	$> 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Sordità bilaterale • Ritardo dello sviluppo neuro-motorio
7	Normale	$> 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Cisti cerebrali • Ipotonia monolaterale arto superiore • Convulsioni
8	Normale	$> 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Ipoacusia bilaterale
9	Normale	$> 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> • Ipotonia monolaterale arto superiore

Amniocentesi

La presenza di infezione fetale è stata dimostrata mediante RT-PCR in 48 liquidi amniotici delle 306 gravidanze valutate (15,7%), in particolare in 38 casi (79,2%) è stata rilevata una carica virale superiore a 10^5 copie/mL, mentre è risultata inferiore a tale valore nei rimanenti 10 campioni analizzati (20,8%). L'infezione congenita è stata confermata a termine di gravidanza in tutti i 48 casi di amniocentesi positiva ed in 22 (8,5%) dei 258 neonati con virus non rilevabile nel liquido amniotico ($P < 0,001$; $AUC \pm SE: 0,843 \pm 0,034$, sensibilità: 68,6%, specificità 100%, PPV: 100%, NPV: 91,5%). Lo studio ecografico ha mostrato caratteristiche patologiche in 6 dei 258 (2,3%) feti con amniocentesi negativa, in nessuno dei feti con bassa carica virale all'amniocentesi ed in 7 dei 38 casi (18,4%) dei casi di amniocentesi con alta carica virale ($P < 0,001$). La malattia sintomatica è stata osservata in 18 (37,5%) neonati/feti con virus nel liquido amniotico ed in un caso su 258 neonati con amniocentesi negativa (0,4%). La presenza di virus nel liquido amniotico ha mostrato un $OR=154$ (95% CI: 19,9-1.196), con sensibilità, specificità, VPP e VPN rispettivamente di 94,7%, 89,5%, 37,5% e 99,6% nel campione generale e $OR=103$ (95% CI: 12,2-863) sensibilità 88,9%, specificità 92,8%, VPP 28,6%, VPN 99,6% nei soli nati vivi.

Sebbene 17 dei 38 neonati/feti con alta carica virale nel liquido amniotico (44,7%) avessero un'infezione sintomatica, la differenza con quelli con bassa carica virale (1/10, 10,0%) non ha raggiunto il limite di significatività statistica sia nel campione totale ($P = 0,067$, $OR = 7,29$, 95% CI: 0,84-63,3, $AUC \pm SE: 0,622 \pm 0,081$, sensibilità: 94,4%, specificità 30,0%, VPP 44,7%; VPN: 90,0%) che nel campione dei soli nati vivi (7 sintomatici su 18 feti con alta carica virale e un neonato sintomatico tra 10 feti con bassa carica virale, $OR = 5,73$; 95% CI: 0,59-55,6; $P = 0,194$, $AUC \pm SE= 0,663 \pm 0,109$).

Studio morfologico ecografico ed amniocentesi

Il potere prognostico dell'indagine ecografica e dell'amniocentesi è stato valutato considerando quando entrambi i test hanno dato risultati positivi (anomalie ecografiche e presenza di carica virale nel liquido amniotico), nonché considerando quando almeno una delle due tecniche ha riportato risultati positivi (anomalie ecografiche o presenza di carica virale nel liquido amniotico) sia nel campione totale che nelle sole gravidanze sono esitate con la nascita di neonati vivi. I risultati delle analisi sono riportate in tabella 3.

TABELLA 3

POTERE PREDITTIVO DI MALATTIA SINTOMATICA
DI ECOGRAFIA ED AMNIOCENTESI

	Sensibilità (%)	Specificità (%)	VPP (%)	VPN (%)	P value	AUC ± SE
FETI E NEONATI						
Anomalie ecografiche non gravi N=306	31.6 (6/19)	97.6 (280/297)	46.2 (6/13)	95.6 (280/293)	<0.001	0.646 ± 0.033
Anomalie ecografiche non gravi <u>e</u> amniocentesi positiva N=306	31.6 (6/19)	99.7 (286/287)	85.7 (6/7)	95.7 (286/299)	<0.001	0.656 ± 0.077
Anomalie ecografiche non gravi <u>o</u> amniocentesi positiva N=306	94.7 (18/19)	87.5 (251/287)	33.3 (18/54)	99.6 (251/252)	<0.001	0.911 ± 0.032
SOLI NATI VIVI						
Anomalie ecografiche non gravi N=286	11.1 (1/9)	97.5 (270/278)	12.5 (1/8)	97.1 (270/277)	0.228	0.534 ± 0.104
Anomalie ecografiche non gravi <u>e</u> amniocentesi positiva N=286	11.1 (1/9)	99.6 (276/277)	50 (1/2)	97.2 (276/284)	0.062	0.554 ± 0,106
Anomalie ecografiche non gravi <u>o</u> amniocentesi positiva N=286	88.9 (8/9)	90.6 (251/277)	23.5 (8/34)	99.6 (251/252)	<0.001	0.898 ± 0.061

La prima analisi ha mostrato significativo miglioramento del valore prognostico di ecografia e amniocentesi rispetto alla sola indagine ecografica, con specificità prossima al 100% e del VPP pari a 85.7%, nei casi in cui entrambe le indagini risultino patologiche. La presenza di un dato patologico in almeno una delle due indagini permette di migliorare sensibilmente la sensibilità e di raggiungere un VPN prossimo al 100%, con un'accuratezza di 0.911 (AUC).

Le stesse analisi sono state eseguite sul campione dei soli nati vivi ed anche in questo caso la valutazione del dato relativo all'isolamento virale sul liquido amniotico ha mostrato un importante miglioramento del potere prognostico dell'ecografia nei confronti della malattia sintomatica, con miglioramento del VPP nei casi in cui entrambi gli esami risultassero patologici e uno spiccato miglioramento di sensibilità (90.6%) e VPN prossimo al 100% in caso in cui almeno una delle due indagini sia risultata patologica ed accuratezza diagnostica pari a AUC=0.898 della curva ROC.

DISCUSSIONE

L'infezione congenita da CMV interessa circa lo 0.64% dei nati [6]. In caso di infezione primaria in gravidanza, le più utilizzate tecniche di diagnosi prenatale comprendono lo studio ecografico della morfologia fetale e l'isolamento del DNA virale nel liquido amniotico mediante procedura invasiva. Poiché circa il 30% delle infezioni primarie materne esita in infezione congenita neonatale, ma meno del 30% di essi svilupperà sintomatologia clinicamente rilevabile della malattia sintomatica alla nascita o al *follow up* è difficile affrontare un *counselling* mirato con la donna soggetta a sierconversione nella prima parte della gravidanza, a causa delle difficoltà di prevedere la prognosi dell'eventuale neonato infetto.

È nota l'associazione di gravi anomalie cerebrali con severa prognosi neonatale [9-10], mentre risulta più difficile stabilire gli esiti relativi ai feti con anomalie ecografiche lievi o con monitoraggio ecografico normale. A tal fine, uno studio retrospettivo israeliano ha confrontato un gruppo di 21 feti con infezione congenita e monitoraggio ecografico prenatale normale in corso di gravidanza, con un equivalente gruppo di controlli sani [21]. La valutazione dello sviluppo cognitivo, motorio e del linguaggio a medio/lungo termine, non ha mostrato differenze significative, a dimostrazione dell'alta capacità, secondo gli autori, di escludere sequele neurologiche nei nati infetti con normale monitoraggio ecografico. Il gruppo di nati infetti presentava un solo caso sintomatico, con deficit uditivo. Le evidenze disponibili quantificano un rischio residuo di infezione severa quali sordità e gravi anomalie dello sviluppo neuromotorio rispettivamente in 1-5% e 0-5% dei casi di studio ecografico normale [22-24].

Le esperienze descritte in letteratura hanno dimostrato che l'ecografia possiede un valore prognostico molto variabile, a seconda del centro di riferimento e della conoscenza dello stato di infezione fetale, indagato attraverso amniocentesi. Sono infatti descritti diversi valori di sensibilità e specificità dell'ecografia nei confronti dell'infezione sintomatica, attraverso studi che prendono in esame reperti ecografici gravi e lievi, sia cerebrali che extracerebrali, variabili ed eterogenei.

Tra le anomalie ecografiche associate a infezione da CMV, una dettagliata casistica francese, riporta la presenza di alterazioni nel 43.5% di 69 feti infetti sottoposti a monitoraggio ecografico ogni 2-4 settimane dal momento dell'infezione fino al termine [25].

In 26 su 30 casi sono descritte alterazioni cerebrali quali calcificazioni parenchimali, cavitazioni del corno occipitale posteriore, microcefalia (circonferenza cranica < 5^a percentile), ventricolomegalia, cisti subependimali, alone ecogeno periventricolare, vasculopatia lenticolostriatale ('candlestick' sign), anomalie della girazione, allargamento degli spazi pericerebrali, cavitazioni del corno temporale e agenesia/ipoplasia cerebellare. Dal punto di vista extracerebrale le anomalie riportate in 20 casi sono state: iperecogenicità intestinale, restrizione di crescita, ascite, versamento pericardico, iperecogenicità renali, epatomegalia, placentomegalia e calcificazioni placentari, più raramente cardiomegalia, calcificazioni epatiche, polidramnios e splenomegalia. Tale studio non valuta l'associazione tra anomalie ecografiche e sintomatologia CMV-relata (7 nati vivi di cui 3 sintomatici, 1 perso al *follow up* e 22 IVG senza informazioni *post-mortem*).

Il nostro studio concentra la propria attenzione sul significato prognostico dei segni ecografici patologici cerebrali non gravi ed extracerebrali, nei confronti della malattia sintomatica (tabella 1), mostrando una sensibilità, specificità, VPP e VPN della sola ecografia rispettivamente di 31.6%, 97.6%, 46.2% e 95.6% (tabella 3). Tali valori mostrano un miglioramento rispetto a quelli pubblicati nella decade scorsa da parte dello stesso gruppo di lavoro sul monitoraggio ecografico del secondo e terzo trimestre rispetto a un campione di 600 donne con infezione primaria da CMV [26]: la presenza di una vasta gamma di alterazioni ecografiche quali iperecogenicità intestinale, ventricolomegalia cerebrale, IUGR, idronefrosi, idrope, alone ecogeno periventricolare, atrofia cerebrale, ipoplasia cerebellare ed epatomegalia è stata osservata in 23 dei 154 nati infetti (14.9%), di cui 18 sintomatici (sensibilità 20.9%, specificità 93.6%, VPP 35.3% - 78.3% in caso di infezione fetale accertata- e VPN 87.6%).

Nel nostro studio, l'isolamento di DNA virale su liquido amniotico si mostra significativamente correlato alla presenza di malattia sintomatica, tuttavia gli ampissimi intervalli di confidenza dell'*odds ratio* non permettono di considerare il dato attendibile. La presenza di un'alta carica virale (>10⁵ copie/mL) mostra un trend positivamente associato all'infezione sintomatica senza tuttavia raggiungere la significatività statistica e non può essere considerato singolarmente come fattore di rischio per la presenza di sintomatologia neonatale. La valutazione del dato relativo all'isolamento virale nel liquido amniotico assieme alle anomalie ecografiche permette un importante miglioramento del valore prognostico dell'ecografica, con sensibilità, specificità, VPP e VPN rispettivamente di 31.6%, 99.7%, 85.7% e 95.7%.

Il potere prognostico della presenza di anomalie ecografiche infatti si dimostra migliore nelle gravidanze con documentata infezione fetale anche in altre esperienze europee. Uno studio francese ha preso in considerazione 73 feti con accertata infezione in utero, indagando il potere predittivo della viremia e della conta piastrinica fetali in associazione al monitoraggio ecografico [22]: piastrinopenia e presenza di anomalie ecografiche sono risultati fattori di rischio indipendenti per esiti avversi dell'infezione post-nascita o post-IVG. Nel gruppo di studio le anomalie ecografiche sono state suddivise in cerebrali, quali calcificazioni, idrocefalia, microcefalia, cisti germinali, ventricolomegalia, oloprosencefalia, polimicrogiria, cisti occipitali e temporali, con alto *odds ratio* ma ampi intervalli di confidenza (OR=40.6, 95%CI 8.0-206.9) ed in anomalie ecografiche fetali extracerebrali quali iperecogenicità intestinale, epatomegalia, IUGR, oligoidramnios, ascite, calcificazioni epatiche, placentomegalia, polidramnios, versamento pericardico, piede torto (OR= 4.4; 95% CI: 1.3-15).

Un differente gruppo francese riporta un' ottima capacità dell'ecografia nella predizione di malattia sintomatica alla nascita [20] in una serie di 238 gravidanze con infezione primaria da CMV, con sensibilità, specificità, VPP e VPN della metodica rispettivamente di 100%, 61.3%, 100% e 65.7%, con un ulteriore miglioramento nel gruppo di 86 casi di infezione fetale accertata mediante amniocentesi (sensibilità, specificità, VPP e VPN rispettivamente di 100%, 90.2%, 82.6% e 100%). Tuttavia non sono stati considerati nell'analisi statistica i dati relativi alle sequele a distanza, comprendenti almeno 2 casi di deficit uditivo nel gruppo di pazienti con ecografia normale.

È noto inoltre che il monitoraggio ecografico dal momento dell'infezione al termine di gravidanza aumenta il potere predittivo della metodica, in quanto a uno studio morfologico normale tra 19 e 21 settimane di gestazione può seguire l'individuazione di aspetti patologici nei controlli successivi, stimati attorno al 7% nelle casistiche più recenti [11]. Tuttavia il dato disponibile entro la ventiduesima settimana di gestazione risulta di cruciale importanza nel *counseling* e gestione della gravidanza nei Paesi in cui la possibilità di interruzione volontaria di gravidanza non è legalmente consentita in epoche gestazionali avanzate [27].

Uno studio israeliano del 2013 ha focalizzato l'attenzione del valore predittivo di ecografia e risonanza magnetica nelle gravidanze con infezione primaria nel primo e secondo trimestre, individuando 20 pazienti su 145 (13.8%) con anomalie ecografiche suggestive di infezione fetale (alterazioni della biometria, del liquido amniotico e dell'aspetto della

placenta, presenza di ventricolomegalia, cisti o iperecogenicità periventricolari o della fossa posteriore e cervelletto, foci ecogeni epatici ed intestinali) [24]. Nel caso di infezione primaria da CMV contratta in corso del primo trimestre (quindi simile al campione arruolato nel presente studio), la presenza di anomalie durante il monitoraggio ecografico mensile dal momento dell'infezione fino al termine di gravidanza ha mostrato un rischio pari al 30.8% di sordità e del 46.2% di altri esiti avversi, mentre la percentuale di nati affetti da sordità o altre disabilità con ecografia normale è risultata pari al 7%

Un recente studio belga ha valutato la predittività della presenza di qualsiasi segno ecografico suggestivo di infezione da CMV nei confronti della malattia sintomatica in 335 infezioni materne avvenute prima della 20^a settimana, attraverso monitoraggio mensile fino al termine [28]. L'ecografia ha mostrato sensibilità, specificità, VPP e VPN negativo rispettivamente di 44%, 94%, 80% e 68%, con miglioramento delle performance nel gruppo dei 35 nati vivi (sensibilità 38%, specificità 94%, VPP 83%, VPN 72%).

La ricerca di fattori predittivi degli esiti dell'infezione congenita ha portato alla dimostrazione che il potere dell'ecografia può essere sensibilmente migliorato da altri fattori come la carica virale nel liquido amniotico e i dati relativi all'analisi del sangue fetale. Un recente studio francese su 82 feti infetti [11] ha indagato le anomalie ecografiche non severe, la carica virale su liquido amniotico e sangue fetale (espressa in MoM, aggiustata per epoca di gravidanza ed intervallo dall'infezione primaria materna) e la conta piastrinica fetale. In tale studio i risultati di ecografia ed amniocentesi si sono dimostrate variabili indipendenti per infezione sintomatica su neonati e feti abortiti. La presenza di anomalie ecografiche non severe mostra un OR= 18.29 (95% CI 4.29-78.04 P<0.01), quindi sovrapponibile a quello del nostro campione (OR = 18,5, 95% CI: 5,43-62,8, P<0.001). La presenza di alta carica virale su liquido amniotico migliora il VPP da 60 a 78% e la presenza di almeno uno dei due fattori permette di raggiungere un VPN di 95%.

Secondo i colleghi francesi il VPN dell'ecografia in associazione alla presenza di piastrinopenia fetale nell'emocromo, ottenuto mediante funicolocentesi, raggiunge valori prossimi al 100%, senza un sostanziale miglioramento del VPP rispetto a quello ottenuto con la carica virale su liquido amniotico. Nel nostro centro la funicolocentesi non viene routinariamente eseguita, tale scelta è giustificata anche dai risultati del presente studio, in quanto il monitoraggio ecografico e l'isolamento virale su liquido amniotico mostra già un VPN prossimo al 100% (99.7%).

La nostra casistica non differisce nel potere prognostico dei reperti ecografici non gravi, (OR 18.5, IC 95%: 5.43-62.831.6), tuttavia mostra un VPP lievemente inferiore (46.2%) a fronte di un VPN fortemente maggiore (95.6%). Aggiungendo a questo dato la conoscenza della presenza di virus nel liquido amniotico si assiste ad un sensibile miglioramento del VPP, pari a 85.7%. La presenza di almeno uno dei due elementi sopracitati (reperti ecografici non gravi o presenza di carica virale nel liquido amniotico) migliora nettamente l'accuratezza dello studio prenatale (sensibilità 94.7%, specificità 87.5%, VPP 33.3%, VPN 99.6%, AUC 0.911 ± 0.032).

Il nostro studio aggiunge la valutazione dei dati relativi ai soli nati vivi. La letteratura infatti comprende spesso i dati autoptici relativi ai feti abortivi per stimare la possibilità di malattia sintomatica dell'eventuale nato, nel tentativo di aggirare il bias indotto dalla perdita delle gravidanze interrotte, corrispondente al 28% del nostro campione. Nonostante la dettagliata valutazione dei reperti autoptici cerebrali, il tentativo di definire i feti come potenzialmente sintomatici può infatti portare a una sovrastima della malattia sintomatica, infatti, come criticato in altri studi da Picone e colleghi[28], può risultare difficile determinare se una lesione autoptica microscopica possa effettivamente tradursi in un danno neurologico clinicamente evidente in un neonato vivente.

Nel nostro campione i nati infetti sintomatici corrispondono a circa il 3%, in tale gruppo la sensibilità, specificità, VPP e VPN dei reperti ecografici non gravi risultano rispettivamente pari a 11.1%, 97.5%, 12.5%, 97.1%. La presenza di ecografia anomala o di presenza di carica virale nel liquido amniotico raggiunge anche in questo gruppo un VPN prossimo al 100% (99.6%) con un AUC \pm SE = 0.898 ± 0.061 .

Un primo limite dello studio è rappresentato dalla presenza di sintomatologia uditiva isolata in 3 dei 9 nati vivi sintomatici, in quanto è nota l'inadeguatezza dell'ecografia nel rilevare questo potenziale esito durante la vita prenatale, ma le dimensioni del campione non permettono l'analisi statistica nel ristretto gruppo di neonati con solamente sequele neurologiche.

Un secondo limite dello studio è rappresentato dalla popolazione altamente selezionata arruolabile: infatti lo screening per CMV non è raccomandato dalle linee guida nazionali, ma largamente diffuso tra i professionisti che eseguono il monitoraggio della gravidanza. Le donne arruolate sono infatti selezionate tra quelle che hanno avuto esito dubbio al test di screening e sono state inviate presso il nostro centro di riferimento, dove le gravidanze

sono sottoposte a monitoraggio ecografico di secondo livello da personale esperto in medicina materno-fetale.

CONCLUSIONI

La bassa incidenza, la peculiarità della trasmissione dell'infezione congenita da CMV e la variabilità dell'espressione della malattia clinicamente sintomatica rendono necessari ulteriori studi per validare e approfondire la possibilità di predizione della prognosi di malattia. Tuttavia i dati riportati dalla nostra esperienza possono permettere un miglioramento dell'appropriatezza del *consuelling* individualizzato, entro la ventiduesima settimana, alla donna in cui si sia verificata una sieroconversione da CMV nella prima parte della gravidanza.

BIBLIOGRAFIA

1. Stagno S. Cytomegalovirusinfection: a pediatrician's perspective. *Curr Probl Pediatr* 1986;16:629–67.
2. Morton CC et al. Newborn hearing screening—a silent revolution. *N Engl J Med* 2006;354:2151–64.
3. Demmler-Harrison GJ. Congenital cytomegalovirus: public health action towards awareness, prevention, and treatment. *J Clin Virol Suppl* 2009;46:S1–5.
4. Hyde TB et al. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol* 2010;20:311–26.
5. Kenneson A et al. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007;7:253–76.
6. Manicklal S et al. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:86–102.
7. Boppana SB et al. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:93–9.
8. Peckham CS. Cytomegalovirus infection: congenital and neonatal disease. *Scand J Infect Dis Suppl* 1991;80:82–7.
9. Noyola DE et al. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2001;138:325-31.
10. Ancora G, Lanari M, Lazzarotto T, et al. Cranial ultrasound scanning and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirusinfection. *J Pediatr* 2007;150:157-61.
11. Leruez-Ville M et al. Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:342.e1-9.
12. Lazzarotto T et al. Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. *Viral Immunol* 2000;13:137–41.

13. Lazzarotto T et al. Development of a new cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) immunoblot for detection of CMV-specific IgM. *J Clin Microbiol* 1998;36:3337–41.
14. Lazzarotto T et al. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1285–93.
15. International Society of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology Education Committee. Sonographic examination of the fetal central nervous system: guidelines for performing the 'basic examination' and the 'fetal neurosonogram'. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;29:109-16.
16. Lazzarotto T et al. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2008;41:192-7.
17. Lanari M et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006; 117:e76–83.
18. Luck SE et al. for the ESPID Congenital CMV Group. Congenital Cytomegalovirus: A European Expert Consensus Statement on Diagnosis and Management. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36:1205-13.
19. Gabrielli L et al. Congenital cytomegalovirus infection: patterns of fetal brain damage. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:e419–27.
20. Picone O et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn*. 2013;33:751-8.
21. Farkas N et al. Does normal fetal brain ultrasound predict normal neurodevelopmental outcome in congenital cytomegalovirus infection? *Prenat Diagn*. 2011;31:360-6.
22. Benoist G et al. Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:900-5.
23. Picone O et al. Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 2008;28:753-8.
24. Lipitz S et al. Risk of cytomegalovirus-associated sequelae in relation to time of infection and findings on prenatal imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:508-14.
25. Picone O et al. Detailed in utero ultrasound description of 30 cases of congenital cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn*. 2014;34:518-24.

26. Guerra B et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198:380.e1-7.
27. Ministero della Salute. Legge 22 maggio 1978, n. 194. Norme per la tutela sociale della maternità e sull'interruzione volontaria della gravidanza. *Gazzetta Ufficiale* 1978, n. 140.
28. Leyder et al. Primary maternal cytomegalovirus infections: accuracy of fetal ultrasound for predicting sequelae in offspring. *Am J ObstetGynecol* 2016;215:638.e1-8.
29. Picone O et al. Primary maternal cytomegalovirus infections: accuracy of fetal ultrasound to predict sequelae in offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;216:329-30.