

Protocollo diagnostico

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELL' INFEZIONE CONGENITA DA CITOMEGALOVIRUS UMANO (HCMV)

Dott.ssa Lucia Collini - U.O. Microbiologia e Virologia
Dott. Claudio Paternoster - U.O. Malattie Infettive
Dott.ssa Danila Bassetti – U.O. Microbiologia e Virologia
Dott. Paolo Lanzafame - U.O. Microbiologia e Virologia

Premessa

Il presente progetto si sviluppa nell'ambito dei programmi di attività volti a migliorare l'appropriatezza prescrittiva e analitica delle indagini di laboratorio

Scopo

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di elaborare un percorso diagnostico-assistenziale per le infezioni a trasmissione verticale e perinatale, con il presupposto che un corretto monitoraggio infettivologico durante la gravidanza si traduce in un migliore *outcome* neonatale.

Le implicazioni connesse ad una corretta esecuzione ed interpretazione della diagnostica di laboratorio, con il supporto di linee guida in epoca prenatale, sono sicuramente di grande importanza per il ginecologo, il neonatologo e l'infettivologo che seguono la donna in gravidanza, monitorandone la gestazione ed il parto.

Diventa fondamentale la stesura di un protocollo operativo per la diagnosi di infezione nel neonato, per il monitoraggio delle possibili conseguenze dell'infezione congenita, per le possibilità terapeutiche ed il corretto *follow-up*. E non ultimo, risultano indispensabili al microbiologo clinico conoscenze scientifiche sempre più aggiornate per favorire la scelta di indagini diagnostiche predittive appropriate e fornire una valida consulenza nell'interpretazione dei risultati.

Gli obiettivi prefissati dal presente protocollo sono:

- 1) Razionalizzare l'uso delle indagini microbiologiche sulla base delle evidenze scientifiche;
- 2) Ridurre il numero di esami inappropriati;
- 3) Rendere partecipe il clinico sui criteri interpretativi degli esami microbiologici;
- 4) Razionalizzare e migliorare l'utilizzo delle risorse sulla base delle evidenze scientifiche.

Introduzione

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

L'incidenza di infezione congenita da *HCMV* è strettamente correlata alla situazione sierologica della madre e al grado di trasmissione, diverso nell'infezione materna primaria e non primaria. In particolare, dove la sieroprevalenza materna è relativamente bassa, l'incidenza di infezione congenita è variabile tra lo 0.6-0.7% dei nati vivi (1 in ogni 100-150 neonati). Invece nei paesi dove la sieroprevalenza materna è più alta sono riportate percentuali di incidenza variabili tra lo 0.9% e il

2.1%. Si stima che oltre il 60% dei bambini con infezione congenita da *HCMV* è nata da madri con pregressa immunità. Nonostante ciò, le infezioni materne primarie hanno un impatto clinico globale molto più importante rispetto alle infezioni non primarie. Dei neonati infettati solo il 10-15% circa viene alla luce con sintomatologia evidente; pazienti in cui la mortalità perinatale è del 10% e si osservano importanti sequele neurologiche (prevalentemente difetti dello sviluppo psicomotorio e ipoacusia neurosensoriale) in circa il 70-80% di quanti sopravvivono. L'85-90%, invece, pur essendo infetto, non presenta alla nascita alcuna sintomatologia. L'8-15% di questi, però presenterà segni tardivi in particolar modo difetti uditivi. La trasmissione materno-fetale è legata principalmente all'infezione materna primaria che presenta un rischio di trasmissione variabile tra il 14.2% e il 52.4%, percentuali più basse sono osservate nel primo trimestre (~36%) e più alte nel terzo trimestre (~78%). Casi di trasmissione materno-fetale conseguenti ad infezioni non primarie sono stati riportati nello 1-2.2% dei casi, con un rischio di trasmissione non paragonabile a quello delle infezioni primarie. L'entità dei danni feto-neonatali, in particolare le severe compromissioni cerebrali, appaiono correlabili prevalentemente all'epoca gestazionale in cui si verifica la trasmissione verticale: un rischio di prognosi feto-neonatale più grave è principalmente correlabile ad una infezione materna primaria contratta nel primo trimestre di gravidanza. Lo stato sierologico materno e il periodo di gestazione durante il quale viene acquisita l'infezione sono pertanto i fattori che condizionano la possibilità e la severità di infezione congenita da *HCMV*. La maggior parte delle infezioni nelle donne gravide sono asintomatiche anche durante la fase acuta; possono comparire sintomi non specifici e spesso molto modesti come la febbre persistente (60.2% dei casi), l'astenia (48.8%), la cefalea (26.6%), e la mialgia (15.1%). Le analisi di laboratorio evidenziano qualche volta la presenza di linfocitosi atipica e modesto rialzo delle transaminasi.

Metodologia di lavoro

Si è costituito un gruppo di lavoro multidisciplinare composto da dirigenti sanitari delle U.O. Microbiologia e Virologia e U.O. Malattie Infettive, Patologia Neonatale e Ostetricia e Ginecologia dell'Ospedale di Trento, il coordinamento è stato effettuato dalla U.O. Microbiologia e Virologia i cui componenti del gruppo hanno elaborato una bozza di protocollo sulla base dell'analisi della letteratura e valutazione delle evidenze scientifiche sull'argomento e di eventuali linee guida e protocolli già esistenti. La bozza è stata revisionata da ciascuno dei membri del gruppo e quindi discussa in riunioni congiunte.

Il presente protocollo sarà oggetto di revisione tra tre anni (2014) a meno di nuove evidenze scientifiche sull'argomento.

Ricerca delle fonti: La ricerca bibliografica è stata effettuata per mezzo di parole chiave su siti di ricerca generali: Yahoo, Google e su siti di ricerca specialistici: Pubmed, Areas (Cochrane Italia), NGC, Goldenhour, ASM.

Modalità di diffusione e valutazione dell'impatto

Il presente protocollo, approvato dalla Direzione Sanitaria Aziendale, dopo discussione anche in sede Comitato del Dipartimento Medicina di Laboratorio, sarà diffuso capillarmente distribuendo una copia a tutti i direttori di presidio ospedaliero, di U.O. e di distretto dell'APSS. Sarà inoltre possibile la consultazione on-line all'indirizzo URP: <http://www.apss.tn.it/Public/ddw.aspx?n=26921>

La valutazione dell'impatto conseguente alla applicazione sarà a cura dell'U.O. Microbiologia e Virologia dell'Ospedale di Trento che dovrà effettuare una prima valutazione al termine dei sei mesi successivi all'avvio di utilizzo del protocollo, ulteriori valutazioni saranno effettuate con periodicità annuale.

Diagnosi sierologica per infezione da *HCMV*

I test sierologici di screening impiegati devono avere caratteristiche di elevata sensibilità (>95%) e specificità (>95%) e la performance analitica del sistema in uso deve essere verificata da adeguati programmi di qualità interni ed esterni (CQI e VEQ). I test sierologici di screening devono essere eseguiti su piattaforme automatizzate con trasmissione diretta dei risultati al sistema informatico del laboratorio. Sul referto devono essere sempre indicati il risultato numerico, la metodica utilizzata, le unità di misura ed i valori di riferimento per l'interpretazione dei risultati. I campioni di siero provenienti da donne in gravidanza che sono risultati positivi alla ricerca degli anticorpi specifici IgG e IgM anti *HCMV* andrebbero conservati per almeno un anno a -20°C. Nei casi di difficile interpretazione la loro conservazione permette retrospettivamente l'esecuzione di esami di secondo livello presso laboratori di riferimento (Figura 1).

In periodo pre-concezionale

IgM	IgG	
neg	neg	La paziente non è immune: misure di prevenzione dell'infezione primaria da <i>HCMV</i>
neg	pos	Infezione pregressa: non necessari ulteriori accertamenti in gravidanza
pos	pos (avidità bassa/moderata)	Infezione primaria da <i>HCMV</i>

Diagnosi di infezione primaria da HCMV in gravidanza

Sieronegatività per HCMV

La gravida non immune (anticorpi IgG e IgM negativi), e perciò a rischio di acquisire l'infezione primaria, deve essere sottoposta ad indagini sierologiche periodiche. Il controllo viene effettuato mensilmente fino a 18-20 settimane di età gestazionale per consentire, in caso di sieroconversione, gli accertamenti sul feto. Se la sieronegatività materna persiste, i controlli sierologici possono essere dilazionati o ridotti ad un solo controllo a 35-37 settimane di età gestazionale per consentire, in caso di sieroconversione tardiva, di selezionare i neonati a rischio di infezione congenita.

Sieropositività per HCMV

La presenza nel siero degli anticorpi IgG specifici (e contemporanea assenza di anticorpi IgM) al primo controllo in gravidanza (entro le 16 settimane di gestazione) è indicativa di infezione pregressa e non prevede ulteriori accertamenti. Infatti, anche se non completamente protettiva, l'immunità acquisita mette al riparo dall'infezione primaria in gravidanza che comporta il maggior rischio per il feto, mentre l'eventualità di reinfezione o riattivazione, pur non escludibile nel corso della gravidanza stessa, comporterebbe un rischio prospettico di danno fetale non superiore a quello insito nello stato gravidico di per sé.

Sieropositività per IgM e sieronegatività per IgG

La positività per IgM riscontrata con test di I livello deve essere confermata con altro prelievo seriale e/o altra tecnica analitica. E' consigliato ripetere il controllo sierologico nello stesso laboratorio a distanza di 10-15 giorni per valutare una eventuale sieroconversione con comparsa di IgG specifiche, che assieme alla conferma delle IgM sono sufficienti per documentare un'infezione primaria in atto. Al contrario, la persistenza di positività delle IgM con IgG negative potrebbe essere dovuta ad una falsa positività o una reazione crociata con altre infezioni (*Parvovirus*, *Toxoplasma gondii*, *Virus Epstein-Barr*, ...) o stimolazioni aspecifiche del sistema immunitario (anticorpi naturali o patologie autoimmuni). In questi casi la paziente risulta essere a rischio di

acquisire l'infezione primaria da *HCMV* e quindi è buona norma continuare i controlli sierologici periodici.

Sieropositività per IgG e IgM anti HCMV in donne con stato sierologico pre-gravidico ignoto

La diagnosi di infezione da *HCMV* in questo gruppo di donne è molto complessa. La maggior parte delle infezioni sono asintomatiche anche durante la fase acuta e quindi, l'unico modo per individuare le gravide con infezione primaria è quello di sottoporle durante la gestazione (più precocemente possibile, non oltre le 12-16 settimane di età gestazionale) ad una serie di esami specifici. Se gli esami sono eseguiti per la prima volta dopo le 18 settimane di età gestazionale, i risultati ottenuti non permettono un inquadramento utile.

La presenza anche ad alto titolo di IgM anti-*HCMV* in una gravida non deve essere usato come "unico metodo" per identificare un'infezione primaria. Quando vengono ritrovate le IgM in una donna gravida il problema diagnostico è ancora completamente aperto e rappresenta semplicemente un punto di partenza per una valutazione diagnostica di livello superiore. Il grado di avidità degli anticorpi IgG aumenta progressivamente nel tempo ed è significativo di maturazione della risposta immune. Occorrono in media circa 18-20 settimane dall'inizio dell'infezione primaria affinché il sistema immunitario produca anticorpi IgG maturi ad alta avidità. L'interpretazione del test di avidità delle IgG richiede molta cautela ed è importante valutare ogni volta con attenzione i valori di riferimento variabili per ogni kit diagnostico. L'efficacia diagnostica del test di avidità per escludere un'infezione primaria nel I trimestre di gravidanza è ottimale qualora la determinazione avvenga precocemente, non oltre le 12-16 settimane di età gestazionale, in relazione ai valori di riferimento del saggio utilizzato.

Entro le 12-16 settimane di età gestazionale:

-indici di avidità bassa-moderata delle IgG anti *HCMV* sono da ascrivere ad infezione primaria recente da *HCMV*

-indici di alta avidità delle IgG anti *HCMV* possono escludere un'infezione recente.

Dopo le 16 settimane di età gestazionale il test di avidità delle IgG perde di efficacia diagnostica per l'impossibilità di dare un'interpretazione diagnostica utile ai fini della datazione dell'infezione stessa in relazione all'epoca gestazionale. In casi selezionati per il completamento della diagnosi sierologica, sono opportuni altri saggi, come l'immunoblot per la determinazione di IgM ed IgG frazionata verso i vari costituenti virali, con espressione antigenica temporalmente differenziata.

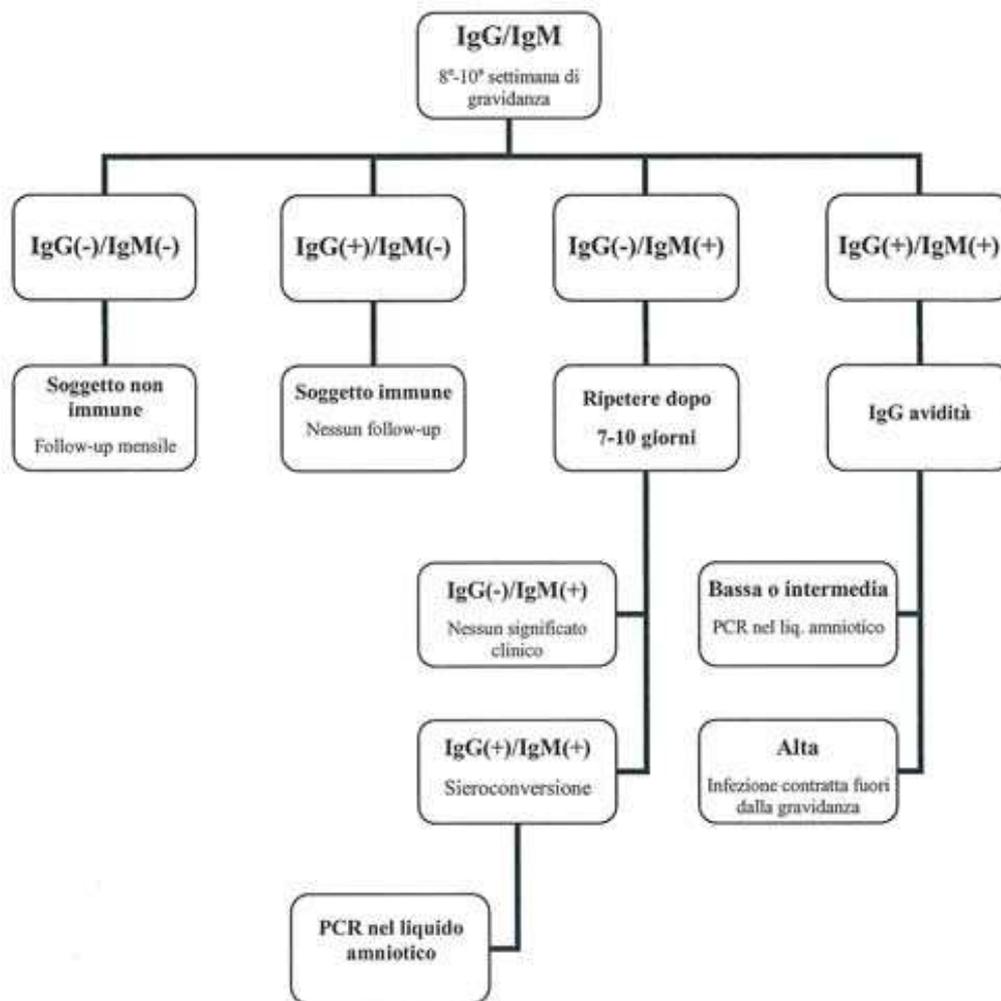


Figura1. Algoritmo diagnostico dei test sierologici di I, II,III livello (tratto da RIMeL / IJLaM 2010; 6-147. A. Antico “Malattie infettive associate a malformazioni del feto: il complesso TORCH”)

Programmazione di una gravidanza dopo diagnosi di infezione primaria da CMV

Dopo 6-12 mesi dalla diagnosi di infezione primaria è indicato eseguire esami di laboratorio che testimonino la fine dell'infezione primaria attiva da *HCMV*. In particolare, se la gravidanza è programmata dopo 6 mesi dall'infezione primaria accertata è appropriato eseguire sia un controllo sierologico che prevede la ricerca delle IgG ed IgM anti *HCMV* e il test di avidità delle IgG anti *HCMV*, sia tre controlli virologici sequenziali, eseguiti a 2/3 settimane l'uno dall'altro per la ricerca ematica del DNA virale. E' opportuno eseguire la ricerca di *HCMV*-DNA nel sangue *in toto* (DNAemia) mediante PCR Real Time in quanto la completa negatività di tre prelievi consecutivi permette di escludere con elevata probabilità la presenza nel sangue, anche intermittente, di tracce del virus e/o dei suoi componenti. Invece, se la gravidanza è programmata dopo 12 mesi dall'infezione primaria accertata, è sufficiente eseguire solo un controllo sierologico che prevede la ricerca degli anticorpi IgG e IgM e il test di avidità delle IgG anti *HCMV*.

Diagnosi Virologica

Le procedure virologiche, ricerca del virus e/o dei suoi componenti nel sangue o in altri liquidi biologici, nelle donne in gravidanza rivestono un ruolo secondario per la diagnosi di infezione primaria da *HCMV* (Figura2).

Nelle donne in gravidanza con accertata infezione primaria il virus nel sangue materno si può ritrovare come non. In caso di positività nel sangue il risultato conferma la diagnosi di infezione primaria recente. In caso di negatività il risultato non esclude l'infezione primaria. Il ritrovamento del virus nel sangue, mediante test dell'antigenemia e/o Real Time PCR, tuttavia non correla né con l'andamento clinico dell'infezione, né con un maggior rischio di trasmissione intrauterina e neppure con la severità di compromissione del feto/neonato. Per lo studio del feto ci si può avvalere della diagnostica prenatale invasiva e di esami strumentali (esame ecografico). In relazione al più alto rischio di trasmissione madre-feto e di danno fetale, la diagnosi prenatale invasiva viene proposta alle donne che hanno contratto l'infezione primaria da *HCMV* nella prima metà della gravidanza (documentata da sierconversione anticorpale) e in caso di anomalie fetali suggestive di infezione. I test molecolari di PCR (reazione polimerasica a catena) impiegati devono essere Real Time, devono avere caratteristiche di elevata sensibilità e specificità e la performance analitica del sistema in uso deve essere verificata da adeguati programmi di qualità interni ed esterni (CQI e VEQ). Le procedure di estrazione, amplificazione e rilevazione devono essere basate su piattaforme automatizzate. Si devono utilizzare kit di PCR Real Time marchiati CE che possono esprimere i risultati anche in Unità Internazionali. Sul referto devono essere sempre indicati il risultato numerico, la metodica utilizzata e le unità di misura.

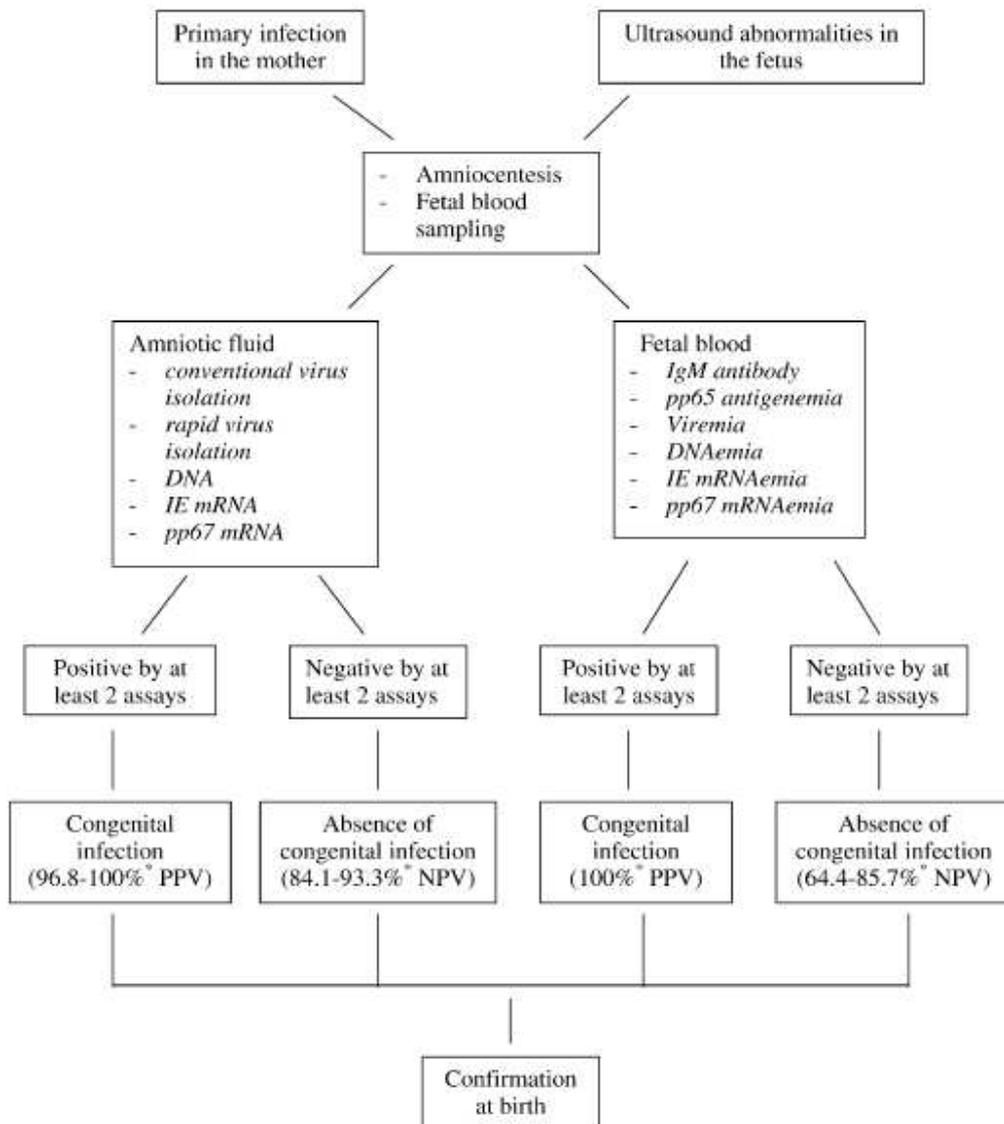


Figura2. Flow chart per la diagnosi prenatale.

Diagnosi prenatale invasiva

La diagnosi prenatale invasiva è effettuata tramite amniocentesi e prevede un prelievo di liquido amniotico sotto controllo ecografico non prima di 20-21 settimane di età gestazionale e ad almeno 6-8 settimane dall'inizio dell'infezione materna. Il momento di esecuzione dell'amniocentesi è scelto tenendo conto che *HCMV* è un virus a lenta replicazione e si calcola che occorrono circa 6-8 settimane dopo l'infezione materna affinché il virus infetti la placenta, arrivi al sangue fetale e tramite il sangue invada e si replichi produttivamente negli organi bersaglio. La sede elettiva di replicazione è il rene e il virus viene così eliminato con la diuresi fetale nel liquido amniotico; dopo le 20 settimane di età gestazionale il feto produce quantità sufficienti di urina tali da permettere di rilevare il virus nel liquido amniotico. Quando la diagnosi prenatale è stata eseguita in epoche gestazionali più precoci, sono stati osservati frequentemente risultati falsi negativi dovuti alla scarsa eliminazione del virus attraverso il rene fetale, a causa proprio della ridotta diuresi.

Il liquido amniotico va prelevato (10 ml), raccogliendolo in provetta sterile, inviato molto rapidamente al laboratorio per la buona riuscita della diagnosi. Il trasporto può avvenire a temperatura ambiente se di breve durata (15 minuti) altrimenti a 4-8°C. Sul liquido amniotico viene eseguita la PCR per la ricerca e quantificazione del genoma virale (PCR Real Time).

Al fine di migliorare l'affidabilità della diagnosi di infezione da *HCMV* nel feto è necessario eseguire almeno due test virologici (isolamento virale e PCR Real Time oppure due format diversi di PCR Real Time). Poiché la quantità di virus nel liquido amniotico può essere molto bassa, dovrebbe essere processato almeno 1 ml di liquido amniotico sia per l'isolamento virale che per ciascuno dei test molecolari. Il campione non deve essere centrifugato prima dell'uso per analizzare la componente cellulare. La positività ad uno o più test eseguiti su liquido amniotico indica infezione congenita (valore di predittività positiva=100%). La negatività a tutti i test eseguiti non esclude un risultato falso negativo (valore di predittività negativa = 94.2% intervallo).

Interpretazione dei risultati quantitativi di *HCMV*-DNA nel liquido amniotico

Il ritrovamento nel liquido amniotico, prelevato ad almeno 6-8 settimane dall'inizio dell'infezione materna e tra le 20-21 settimane di età gestazionale, di DNA virale al di sotto del limite inferiore del range di linearità (quantità inferiori a 500 o 1000 copie/ml di liquido amniotico) permette di escludere con elevata probabilità eventuali compromissioni del neonato alla nascita e/o successive progressioni dell'infezione con comparsa di sequele tardive quali ad esempio deficit a carico dell'udito e/o ritardo dello sviluppo psico-motorio. Quantità elevate di virus nel liquido amniotico non associate ad anomalie ecografiche (quantità superiori a 10^5 - 10^6 copie/ml) tendenzialmente sono riferibili a feti/neonati affetti da severe infezioni. Questa correlazione però non è assoluta in quanto nel 40-50% dei casi le infezioni congenite risultano asintomatiche alla nascita e durante il *follow up* neonatale nonostante l'elevato carico virale nel liquido amniotico. Quantità elevate di virus nel liquido amniotico, se associate ad esami ecografici francamente patologici, assumono invece validità prognostica nell'individuare i feti/neonati infetti a rischio di sintomatologia clinica severa (Figura3).

Il prelievo di sangue fetale non può essere eseguito a scopi diagnostici ma può essere solo parte di una valutazione prognostica. I test siero-virologici (*HCMV*-IgM e *HCMV*-DNA) e biochimici (conteggio piastrine, transaminasi e gamma GT) eseguiti sul sangue fetale raggiungono la loro massima sensibilità prognostica se il prelievo di sangue viene eseguito dopo le 30 settimane di gestazione. Recentemente alcuni dati in letteratura hanno osservato come una valutazione di più parametri siero-virologici, ematologici e biochimici del sangue fetale, prelevato in 20-21 settimane di età gestazionale, acquisisca maggiore predittività prognostica.

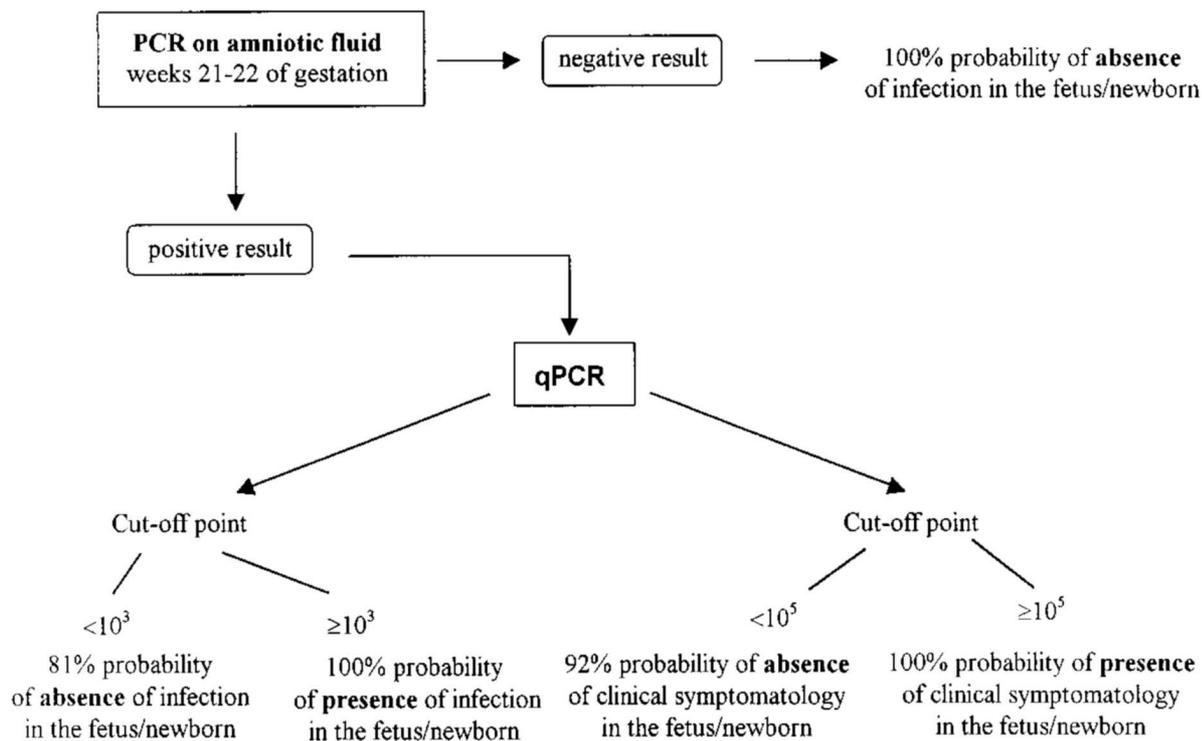


Figura3- Flow chart per la diagnosi di infezione prenatale

(tratta da Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, Am J Obstet Gynecol 2000;183).
(qPCR, Quantitative PCR)

Diagnosi di laboratorio neonatale

Diagnosi diretta: il metodo di riferimento per la diagnosi neonatale è l'isolamento del virus eseguito su colture di fibroblasti embrionali umani, in campioni di urina (o eventualmente saliva) raccolti entro le prime 2-3 settimane di vita. Anche la ricerca del DNA virale mediante PCR Real Time eseguita sugli stessi materiali è un metodo affidabile per diagnosticare l'infezione congenita da *HCMV*. Viene eseguita su campione di urina e/o saliva e/o sangue intero/plasma.

Campione di urina:

raccogliere 2-3 ml di urina in provetta sterile. E' possibile conservare a 4-8°C il campione fino a 24 ore prima dell'invio al laboratorio. Il trasporto al laboratorio può avvenire a temperatura ambiente se di breve durata (15 minuti), altrimenti il campione deve essere trasportato mantenendolo a 4-8°C.

Campione di saliva:

raccogliere la saliva con tampone sterile, inserire il tampone nel terreno di trasporto per virus (tamponi UTM), spezzare il bacchetto e lasciare il tampone all'interno della provetta. Il trasporto può avvenire a temperatura ambiente se di breve durata (15 minuti), altrimenti a 4-8°C.

Se la diagnosi è eseguita in tempi successivi alle 3 settimane di vita, le positività dei test possono non essere sicuramente riferibili ad una infezione intrauterina, bensì ipoteticamente riconducibili anche ad infezione contratta durante il passaggio lungo il canale del parto o attraverso il latte materno infetto. In caso di risultato negativo dell'isolamento virale o della PCR Real Time su urina (o saliva), considerando l'elevata sensibilità di questi test ed il carico virale generalmente elevato e protratto nel tempo, il neonato non è da ritenere infetto e l'esame non merita di essere ripetuto. Al contrario, in caso di positività dei test, il neonato è da ritenersi infetto e non sono necessarie ulteriori conferme diagnostiche. Tuttavia, particolare attenzione deve essere posta quando per la diagnosi di infezione congenita si utilizzi solo il campione di saliva, in quanto è possibile il rischio di contaminazione del campione da parte del latte materno potenzialmente infetto. Dunque,

nell'eventualità si utilizzi la sola saliva, questa va raccolta lontano dalle poppate con latte materno. E' comunque prudente confermare questa positività entro le prime due/tre settimane di vita con la ricerca del virus su un campione di urina, specie se programmato il trattamento con antivirali. La diagnosi virologica di infezione congenita da *HCMV* su campione ematico ha una sensibilità diagnostica più bassa. Tuttavia, in caso di positività dei test eseguiti su campioni di sangue prelevati entro le prime 2-3 settimane di vita, la diagnosi di infezione congenita è comunque certa (specificità del 100%).

Campione di sangue:

prelevare 1 ml di sangue, raccoglierlo in provetta Vacutainer con EDTA. E' possibile conservare il campione di sangue a temperatura ambiente fino a 24 ore prima dell'invio al laboratorio. Per la buona riuscita della diagnosi la conservazione e il trasporto del campione di sangue devono essere effettuati a temperatura ambiente.

Campione di plasma:

prelevare 1 ml di sangue, raccoglierlo in provetta Vacutainer dedicata all'indagine di biologia molecolare (tappo perla). E' possibile conservare il campione di sangue a 4°C fino a 48/72 ore prima dell'invio al laboratorio.

La valutazione del carico virale su sangue o urina mediante isolamento virale e/o PCR quantitativa Real-Time ha dimostrato di rappresentare un indicatore prognostico. Tuttavia, allo stato attuale non gioca isolatamente un ruolo nella scelta terapeutica. Ove vi sia l'indicazione per il trattamento con antivirali, la valutazione seriata del carico virale su sangue e urina mediante PCR quantitativa Real-Time (preceduta dalla valutazione prima dell'inizio del trattamento) fornisce indicazioni circa l'efficacia terapeutica.

Diagnosi sierologica: la ricerca sierologica non trova indicazione nella diagnosi di infezione congenita da *HCMV*. Infatti, la presenza di IgG *HCMV*-specifiche su siero neonatale non è indicativa di infezione congenita, per la possibilità del rilievo della quota anticorpale di origine materna, passata attraverso la placenta. Vi è inoltre ampia variabilità nel ritrovamento delle IgM sieriche (20-70% dei neonati infetti), connessa alla risposta immunitaria del neonato, nonché alla tipologia del test sierologico utilizzato. La presenza di IgM *HCMV*-specifiche in epoca neonatale identifica tuttavia un'infezione congenita (100% di specificità).

Diagnosi tardiva dell'infezione congenita

Le indagini virologiche e sierologiche, passate le tre settimane dalla nascita, possono non essere in grado di distinguere un'infezione pre da una perinatale, potenzialmente contratta durante il parto o con il latte materno; la diagnosi di infezione congenita può allora essere ipotizzata solo in base alla clinica.

Sintesi

L'infezione da *HCMV* è la più frequente tra le infezioni congenite nei Paesi industrializzati. Nel nostro Paese è stata evidenziata una incidenza di poco meno di un infetto su cento nati vivi. Considerando che ogni anno in Italia nascono più di 550.000 neonati, possiamo ipotizzare di avere oltre 5.000 neonati all'anno con infezione congenita da *HCMV*. L'impatto di questa infezione sulla salute pubblica è considerevole, essendo la prima causa di sordità neurosensoriale non genetica in età pediatrica (si ritiene sia responsabile di circa 1/3 delle sordità infantili) ed un importante fattore di rischio per lo sviluppo di deficit visivi, intellettivi e motori. In Italia non vi sono programmi di screening dell'infezione congenita nei neonati. Tuttavia, viene consigliata la sierologia materna per *HCMV* in gravidanza, con conseguenti ricadute diagnostico-assistenziali sui neonati. In caso di sospetta/accertata infezione in gravidanza (primaria o non primaria) e/o sospetto clinico neonatale è necessario procedere alle indagini neonatali per la diagnosi di infezione congenita che, se

confermata, deve dar luogo a valutazioni clinico-laboratoristico-strumentali atte a definire il coinvolgimento di organi ed apparati. In base a questi elementi potrà essere espresso un giudizio prognostico, avviato il *follow up* e, ove indicata, iniziata la terapia. Prima di intraprendere la terapia va rilevato il carico virale su sangue e urine e deve essere monitorato in un periodo intermedio ed alla sospensione della stessa.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007; 17:253-76.
2. Rahav G, Gabbay R et al. Primary versus nonprimary cytomegalovirus infection during pregnancy, Israel. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:1791-3.
3. Dollard SC, Grosse SD et al. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007;17:355-63.
4. Marshall BC, Adler SP. The frequency of pregnancy and exposure to cytomegalovirus infections among women with a young child in day care. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:163.e1-5.
5. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis* 2009; 49:522-28.
6. Van der Sande MA, Kaye S et al. Risk factors for and clinical outcome of congenital cytomegalovirus infection in a peri-urban West-African birth cohort. *PLoS One* 2007; 2:e492.
7. Kouri V, Correa C et al. Diagnosis and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital infection in newborns: 2007-2008. *Ped Infect Dis J* 2010; 29:1105-10.
8. Fang FQ, Fan AS et al. Incidence of cytomegalovirus infection in Shanghai, China. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16:1700-3.
9. Fowler KB, Stagno S et al. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326:663-7.
10. Fowler KB, Stagno S et al. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 2003; 289:1008-11.
11. Ross SA, Fowler KB et al. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr*. 2006; 148:332-6.
12. Bodéus M, Beulné D et al. Ability of three IgG avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:248-52.
13. Pass RF, Fowler KB et al. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol* 2006; 35:216-20.
14. 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.
15. Adler SP, Finney JW et al. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr* 2004; 145: 485-491.
16. Vauloup-Fellous C, Picone O et al. Does hygiene counselling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol* 2009; 46S: S49-S53.
17. De Paschale M, Agrappi C et al. Positive predictive value of anti-HCMV IgM as an index of primary infection. *J Virol Methods* 2010; 168: 121-5.
18. De Carolis S, Santucci S et al. False-positive IgM for CMV in pregnant women with autoimmune disease: a novel prognostic factor for poor pregnancy outcome. *Lupus* 2010; 19: 844-9.
19. Revello MG, Genini E et al. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol* 2010; 48: 255-9.
20. Macé M, Sissoeff L et al. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenat Diagn* 2004; 24: 861-3.
21. Lazzarotto T, Varani S 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: 137-141.

22. Guisasola ME, Ramos B et al. Comparison of IgG avidity assays in the confirmation of the diagnosis of cytomegalovirus primary infection. *APMIS* 2010; 118: 991-93.
23. Kanengisser-Pines B, Hazan Y et al. High cytomegalovirus IgG avidity is a reliable indicator of past infection in patients with positive IgM detected during the first trimester of pregnancy. *J Perinat Med* 2009; 37: 15-8.
24. Eggers M, Bader U et al. Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. *J Med Virol* 2000; 60: 324-30.
25. Lazzarotto T, Gabrielli L et al. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol* 2004; 65: 410-5.
26. Revello MG, Fabbri E et al. Role of prenatal diagnosis and counselling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol* 2011; 50:303-7.
27. Guerra B, Simonazzi G et al. Impact of diagnostic and confirmatory tests and prenatal counseling on the rate of pregnancy termination among women with positive cytomegalovirus immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:221.
28. Guerra B, Simonazzi G et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 380.e1-380.e7.
29. Guerra B, Lazzarotto T et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 476-482.
30. La Torre R, Nigro G et al. Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease. *Clin Infect Dis* 2006; 43:994-1000.
31. Lipitz S, Achiron R et al. Outcome pregnancies with vertical transmission of primary cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2002; 100:428-33.
32. Lazzarotto T, Varani S et al. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2000;137: 90-5.
33. Barbi M, Calvario A et al. Documento elaborato dal gruppo di lavoro AMCLI-SIV "Infezioni da CMV in gravidanza" 2007, <http://www.amcli.it> & <http://www.siv-virologia.it/>.
34. Goegebuer T, Van Meensel B et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 660-5.
35. Lazzarotto T, Guerra B et al. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2008; 41:192-7.
36. Gouarin S, Gault E et al. Real-Time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1767-72.
37. Romanelli RM, Magny JF et al. Prognostic markers of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Braz J Infect Dis* 2008; 12: 38-43.
38. Lazzarotto, T., Guerra, B., Gabrielli, L., Lanari, M., Landini, M. P. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clinical Microbiology & Infection.* 2011; 17(9):1285-1293.
39. Fabbri E, Revello MG et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG* 2011; 118: 448-456.
40. McCarthy FP, Giles ML et al. Antenatal interventions for preventing the transmission of cytomegalovirus (CMV) from the mother to fetus during pregnancy and adverse outcomes in the congenitally infected infant (Review). *The Cochrane Library* 2011, Issue 3.
41. Lazzarotto T, Guerra B et al. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1285-93.
42. Boppana SB, Ross SA et al. Saliva polymerase-chain reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med* 2001; 364: 2111-8.

43. Pass RF. Dried blood spots and universal newborn screening for congenital cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 582-4.
44. Lanari M, Lazzarotto T et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006;117: 76–83.
45. Boppana SB, Fowler KB et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr* 2005; 146:817–23.
46. Bradford RD, Cloud G et al. Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *J Infect Dis* 2005; 19: 227-33.
47. Revello MG, Zavattoni M et al. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* 1999; 14:57-66.
48. Lombardi G, Garofoli F et al. Oral valganciclovir treatment in newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *European J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:1465-70.
49. Acosta EP, Brundage RC et al. Ganciclovir population pharmacokinetics in neonates following intravenous administration of ganciclovir and oral administration of a liquid valganciclovir formulation. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81:867-72.
50. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Prenat Med*. 2011; (1): 1–8.