Malattie infettive associate a malformazioni del feto: il complesso TORCH

A. Antico

Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda ULSS15 - Alta Padovana, Cittadella (PD)

Riassunto

Le infezioni causate dagli agenti le cui iniziali compongono l'acronimo TORCH (Toxoplasmosi, Rosolia, Citomegalovirus, Herpes e altro) non rappresentano un pericolo per il soggetto sano, ma diventano un problema clinico grave nella donna in gravidanza per i danni che possono causare al feto. È importante perciò una diagnosi accurata e tempestiva per consentire ove possibile un intervento terapeutico efficace ed adeguato. Oggi le moderne tecnologie analitiche consentono anche di collocare in un arco di tempo preciso l'insorgenza dell'infezione (avidità delle IgG specifiche) e stabilire se la malattia ha interessato il feto (test in biologia molecolare). Pertanto il ruolo del laboratorio in queste patologie non è solo esprimere un giudizio sullo stato immunologico della gestante ma principalmente governare l'iter diagnostico in funzione del reperto analitico di primo livello, per formulare la diagnosi sierologica di infezione, soprattutto nei casi in cui la malattia sia sfumata o senza manifestazioni cliniche. Il patologo clinico utilizza un percorso diagnostico ragionato che esegue in sequenza logica i test sierologici di diverso livello: si sfruttano la sensibilità e la specificità degli esami di I livello (ricerca degli anticorpi specifici di tipo IgG e IgM) per stabilire lo stato immunologico della gravida; in caso di presunto contagio si eseguono nella stessa test di II livello (avidità degli anticorpi specifici di tipo IgG, ricerca dell'agente eziologico nel sangue con metodi di biologia molecolare) per confermare e datare l'infezione. Il percorso diagnostico si conclude, nel sospetto di infezione congenita, con l'esecuzione di test di III livello, che utilizzano metodiche di amplificazione genica per accertare la presenza dell'agente eziologico nel liquido amniotico, nel sangue di cordone ombelicale o nel prelievo da villi coriali. La presenza di IgM specifiche verso agenti TORCH nel neonato entro un mese di vita conferma la diagnosi di infezione congenita.

Summary

Infectious diseases related to embryo-fetal lesions: the TORCH group infections

Infections caused by agents of acronym TORCH (toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes, etc.) don't pose a danger to healthy persons, but become a serious clinical problem in pregnancy because they can cause harms to the fetus . Therefore an accurate and timely diagnosis is very important to permit an effective and appropriate therapeutic intervention where possible. Today modern analytical technologies can also place the onset of infection in a well-precise span of time and determine whether the disease has affected the fetus. Thus the role of the laboratory in these diseases is not merely that of giving an opinion on the immunological status of the pregnant woman; it is mainly to govern the diagnostic procedures, depending on the analytical findings of the first level tests, in order to formulate a serological diagnosis of infection, especially in cases where the disease is not clearly defined or without clinical manifestations. A clinical pathologist uses a diagnostic flowchart that runs serological testing of different levels in a logical sequence: sensibility and specificity of I level tests are used to determine a pregnant woman's immunological state (IgG and IgM antibodies); a II level test is run to confirm and to date an infection (IgG avidity, molecular biology methods can find the ethiologic agent in the blood). When a congenital infection is suspected the diagnostic flowchart ends with the III level tests, using techniques of gene amplification to detect the presence of the infective agent in the amniotic fluid, umbilical cord blood or levy chorionic villi. The presence of specific IgM antibodies against TORCH agents in the infant within a month of life confirms the diagnosis of a congenital infection.

Key-words: Pregnancy Complications, Congenital Abnormalities, Rubella virus, Toxoplasma, Cytomegalovirus, Simplexvirus.

Ricevuto: 06-04-2010 Pubblicato on-line: 07-05-2010

Corrispondenza a: Dott. Antonio Antico, Laboratorio Analisi, P.O. Cittadella, Azienda Ulss15 - Alta Padovana, Via Casa di Ricovero n.40, Cittadella (PD). Tel 049-9424872, fax 049-9424874, e-mail: antonioantico@virgilio.it

Le infezioni causate dagli agenti le cui iniziali compongono l'acronimo TORCH [T: Toxoplasma gondii, R: Rubella virus, C: Cytomegalovirus, H: Herpes Simplex virus, O: Others (HBV, HCV, Parvovirus B 19, VZV, Listeria, Streptococco di gruppo B)] non rappresentano un pericolo per il soggetto sano ma diventano un problema clinico grave nel paziente immunocompromesso e nelle gravide per le lesioni che possono causare al neonato[1]. Pertanto diagnosticare tempestivamente queste malattie in gravidanza, collocare la loro insorgenza nell'arco gestazionale e stabilire se hanno interessato il feto è basilare per consentire, ove possibile, un intervento terapeutico efficace[2]. Per questi motivi oggi il ruolo del laboratorio non è più solo quello di esprimere un giudizio sullo stato di immunizzazione del soggetto studiato, ma indicare al clinico qual è l'iter diagnostico più appropriato, in base al test di screening, per giungere ad una rapida e corretta definizione dello stato d'infezione; deve in pratica suggerire quali sono i test di vario livello, da eseguire in sequenza logica, per rilevare l'infezione, interpretare clinicamente il dato analitico ottenuto e trasmetterlo al curante nel modo più chiaro ed esaustivo possibile. I protocolli diagnostici qui riportati associano la sensibilità e la specificità dei test di I livello, la ricerca degli anticorpi IgG e IgM, al valore predittivo del test di II livello, la determinazione dell'avidità delle IgG specifiche. Nel sospetto di infezione congenita, è prevista l'esecuzione di test di III livello in centri di riferimento. Questi percorsi certamente si basano sulla qualità analitica del risultato, ma la loro elevata efficacia diagnostica trae origine dall'interpretazione clinica del dato analitico da parte dell'esperto di laboratorio, che consente di ottimizzare il follow-up nelle gravide, di diminuire i costi che derivano dall'esecuzione di esami in biologia molecolare ed evitare aborti inutili.

Infezione da Toxoplasma

L'infezione primaria da *Toxoplasma gondii* contratta durante la gravidanza costituisce una causa importante di malattia congenita del neonato; l'infezione pregressa può riattivarsi esclusivamente in gravide interessate da patologie che causano immunocompromissione o in trattamento con terapia immunosoppressiva[3–5]. Tale zoonosi, acquisita mediante ingestione delle cisti del protozoo contenute nella carne poco cotta o nell'acqua e/o altro cibo contaminati dalle feci del gatto (ospite definitivo), non causa sintomi evidenti o specifici nella maggior parte delle gestanti che contraggono l'infezione[4,6]. Pertanto per controllare l'insorgenza dell'infezione da toxoplasma servono la sistematica educazione delle gravide alla profilassi e lo screening. Nelle gravide sieronegative il dosaggio degli anticorpi specifici deve essere eseguito ogni mese per poter individuare precocemente una sieroconversione e iniziare subito il trattamento terapeutico, le donne sieropositive invece non necessitano di ulteriori accertamenti[6]. La frequenza di trasmissione verticale aumenta con l'età gestazionale (Tab. I), ma segni clinici gravi sono più comunemente osservati in bambini nati da donne la cui infezione è avvenuta precocemente in gravidanza[4,7]; inoltre il trattamento della malattia nel feto e nel neonato durante il primo anno di vita ha dimostrato di migliorare in modo significativo l'esito clinico dell'infezione congenita[8-10]. La corretta interpretazione del profilo diagnostico per toxoplasmosi nella gravida e la sua comunicazione al ginecologo da parte di un esperto di laboratorio hanno dimostrato di diminuire il numero di aborti non necessari del 50% circa[11].

Test di I livello: IgG e IgM anti Toxoplasma - Obiettivo: definire lo stato immune del soggetto

L'assenza di IgG e IgM indica che la gravida non è mai venuta a contatto col parassita (soggetto non immune); la presenza degli anticorpi IgG e l'assenza di IgM indicano che il soggetto è protetto, l'infezione è stata contratta in passato e non necessita di ulteriori accertamenti (soggetto immune). Se sono presenti entrambi, anche con anticorpi IgM dubbi, è necessario stabilire se l'infezione è avvenuta durante la gestazione o prima del concepimento, per determinare il rischio per il feto (Fig. 1). L'avidità degli anticorpi di tipo IgG permette di datare l'infezione[12]. Informazioni cliniche sull'età gestazionale e/o lo stato immunitario pregravidico favoriscono una corretta interpretazione dei risultati sierologici aumentando la loro efficacia clinica. Il dosaggio degli anticorpi IgG è specifico e quantitativo, essendo disponibile una preparazione internazionale di riferimento che consente l'allestimento di una curva di calibrazione in Unità Internazionali/mL. La determinazione degli anticorpi IgM, qualitativa per la mancanza di standard internazionali che consentono una ottimizzazione dei risultati, presenta ancora problemi di specificità (presenza di elevati livelli di IgG

Tabella I. rischio di trasmissione di infezione congenita da toxoplasma gondii e sviluppo di segni clinici in bambini prima dei 3 anni di età[7].

Età gestazionale settimane	Rischio di infezione congenita (95% CI) %	Sviluppo di segni clinici nei bambini infetti (95% CI) %
13	6 (3-9)	61 (34-85)
26	40 (33-47)	25 (18-33)
36	72 (60-81)	9 (4-17)

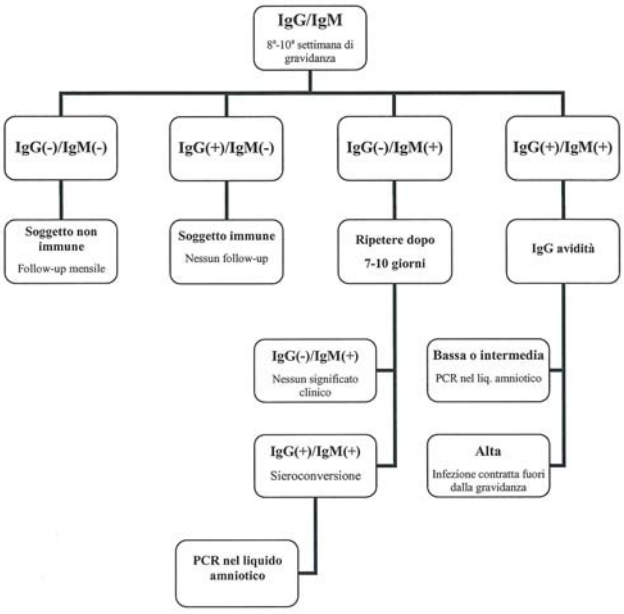

Figura 1. Algoritmo diagnostico dei test sierologici di I, II, III livello per agenti TORCH

specifiche, anticorpi antinucleo, IgM policlonali o specifiche per altre infezioni virali); la disponibilità di tecniche ad immunocattura (impiego di un anticorpo anti-IgM umane e di un antigene virale specifico) consente di superare alcune di queste difficoltà analitiche, ma non quella dovuta alla presenza di IgM specifiche persistenti[13-15]. Tali anticorpi possono persistere in circolo per più di un anno dopo l'infezione acuta. Nel nostro centro la ricerca di tali immunoglobuline viene eseguita con un metodo in chemiluminescenza (CLIA, DiaSorin, Saluggia) dotato di alta sensibilità e quindi di elevato valore predittivo negativo; il risultato positivo viene confermato con metodo immunoenzimatico con lettura in fluorescenza [*enzyme linked fluorescent assay* (ELFA, Biomerieux)] provvisto di elevata specificità. La positività di entrambi metodi è fortemente indicativa della presenza di anticorpi specifici verso il toxoplasma; la discordanza tra i metodi, solitamente positività del metodo più sensibile non confermata del metodo ELFA, impone una rivalutazione a breve del paziente o, nel caso siano presenti le IgG, la determinazione della loro avidità.

Test di II livello: avidità delle IgG anti Toxoplasma - Obiettivo: distinguere l'infezione primaria recente o pregressa

Questo test consente di collocare in un arco di tempo definito l'insorgenza dell'infezione. Gli anticorpi IgG anti toxoplasma acquisiscono alta avidità di legame almeno dopo 12-16 settimane (a seconda del metodo utilizzato) che il paziente ha contratto l'infezione[16-18]. In una gravida nelle prime settimane di gestazione, a prescindere dal risultato degli anticorpi IgM, una alta avidità indica che il feto non è a rischio di toxoplasmosi congenita. Per gestanti oltre le 16 settimane invece un alta avidità non esclude che l'infezione sia stata acquisita prima del concepimento[19] (Tab. II). I dati in nostro possesso dimostrano che l'avidità delle IgG può rimanere intermedia per molto tempo dopo l'infezione primaria se il soggetto è stato sottoposto a terapia antibiotica; anche per questo motivo è importante avere a disposizione lo stato immunitario pregravidico della gestante[16,20,21]. L'interpretazione dei risultati dei test sierologici effettuati entro il primo trimestre prevede 3 ipotesi diagnostiche nel referto di laboratorio:

- avidità bassa: compatibile con una infezione primaria recente (entro le 12-16 settimane);
- avidità alta: compatibile con una infezione pregressa (superiore alle 12-16 settimane);
- avidità intermedia: non consente dei escludere una infezione primaria negli ultimi 4 mesi.

Test di III livello: biologia molecolare - Obiettivo: diagnosticare l'infezione congenita

Per la diagnosi prenatale di toxoplasmosi congenita è utilizzata con successo l'amplificazione del DNA di *T. gondii* (gene B1) nel liquido amniotico dopo le 18 settimane di gestazione[19,22,23]: prima di tale epoca l'esame comporta un rischio più elevato per il feto e presenta minor efficacia diagnostica. Essa è indicata in gravide, senza controindicazioni per la procedura, in cui:

- i test sierologici siano altamente suggestivi di un'infezione acquisita durante la gestazione o poco prima del concepimento;
- siano presenti o si sospettino danni fetali all'ecografica (ad esempio ventricolomegalia o calcificazioni cerebrali o epatiche);
- sia presente importante compromissione del sistema immunitario e quindi sia fondato il rischio di riattiva-

Tabella II. Interpretazione degli esami di II livello per la diagnosi di Toxoplasmosi.

Epoca gestazionale	indice IgG avidità	Significato clinico
Qualsiasi settimana	BASSO	Infezione verosimilmente contratta in gravidanza
> 24 settimane	ALTO*	
> 13 settimane	INTERMEDIO*	
< 24 settimane	ALTO	Infezione contratta prima della gravidanza
< 13 settimane	INTERMEDIO	

**qualora precedenti determinazioni anticorpali fossero risultate negative.*

zione della loro infezione latente[24].

PCR eseguita nel liquido amniotico dopo 18 settimane di gravidanza ha dimostrato avere un valore predittivo negativo dell'88% e una specificità e valore predittivo positivo del 100%[19]. Romand e collaboratori hanno anche evidenziato che la carica del parassita nel liquido amniotico è un fattore di rischio indipendente per la gravità dell'infezione fetale. Infezioni materne acquisite prima delle 20 settimane di gestazione, che presentano una concentrazione del protozoo > 100 parassiti per mL di liquido amniotico, sono state associate con il più alto rischio di esiti gravi nel feto[25]. Tuttavia le tecniche in PCR per l'individuazione del DNA di *T. gondii* nel liquido amniotico o in altri fluidi non sono ancora standardizzate e non c'è consenso sul protocollo migliore da utilizzare[19,22,25-28]. L'esame deve essere inviato pertanto ad un laboratorio di riferimento, con provata esperienza di esecuzione e interpretazione dei risultati del test.

Infezione da Virus della Rosolia

Il virus della rosolia, il cui genoma è costituito da una catena singola di RNA, appartiene alla famiglia *Togaviridae*, genere *Rubivirus*; infetta l'uomo, che ne rappresenta il serbatoio ed il vettore, per contagio di tipo diretto. L'infezione primaria contratta durante le prime 12 settimane di gravidanza può causare patologie fetali in una percentuale molto elevata di casi[29,30]. La diffusione al feto inizia con l'infezione della placenta durante la viremia materna, che esita in apoptosi e inibizione della divisione delle cellule tessutali embrionali[31-34]: può determinare, in base all'epoca gestazionale in cui colpisce, manifestazioni permanenti tipo sordità, malattie cardiache congenite, cataratta, glaucoma, retinopatia pigmentata e ritardo mentale; transitorie con regressione spontanea (porpora trombocitopenica neonatale, anemia emolitica e epatite), tardive come diabete mellito, ipo-e ipertiroidismo, panencefalite. Quando il feto è colpito dopo la 18^ settimana di gestazione l'insorgenza di anomalie è molto meno probabile poiché l'organogenesi è già completata[30]. L'infezione da rubivirus può essere asintomatica nel 50% dei pazienti infetti rendendo difficile la diagnosi clinica; sulla base di queste evidenze nelle donne in gravidanza diventa essenziale la ricerca degli anticorpi specifici contro il virus[35,36]. Fortunatamente a causa del successo dei programmi di vaccinazione questa malattia è rara in molti paesi industrializzati, mentre continua a verificarsi nei paesi in via di sviluppo dove l'immunizzazione passiva non è applicata; la maggior parte dei vaccini utilizzati attualmente contengono il ceppo RA 27 / 3, che induce immunità di lunga durata rilevabile per 20 anni nel 95% dei pazienti[34].

Test di I livello: IgG e IgM anti Rubivirus - Obiettivo: definire lo stato immune del soggetto

L'assenza di IgG e IgM indica che la gestante non è mai venuta a contatto col virus (soggetto non immune); la presenza degli anticorpi IgG e l'assenza di IgM indicano che il soggetto è protetto e non necessita di ulteriori accertamenti (soggetto immune). Se sono presenti entrambi, anche con anticorpi IgM dubbi, è necessario stabilire se l'infezione è avvenuta durante la gravidanza per stabilire il rischio per il feto; questo è possibile mediante la determinazione dell'avidità degli anticorpi specifici di tipo IgG[37,38]. Il dosaggio degli anticorpi IgG è quantitativo ed è espresso in Unità Internazionali/mL essendo disponibile una preparazione internazionale di riferimento, tuttavia la correlazione tra i diversi test immunoenzimatici è relativamente scarsa. La determinazione degli anticorpi IgM, qualitativa per la mancanza di standard internazionali, ha raggiunto una buona sensibilità analitica, ma la specificità, nonostante la disponibilità di tecniche ad immunocattura, è penalizzata da reattività crociata con altri virus (parvovirus B19, Epstein-Barr) e dalla presenza di IgM specifiche persistenti: tali anticorpi possono rimanere in circolo per più di 8 settimane dopo l'infezione acuta[39,40]. Nel nostro centro la ricerca di tali immunoglobuline viene eseguita con un metodo in chemiluminescenza (CLIA, DiaSorin, Saluggia) dotato di alta sensibilità e quindi di elevato valore predittivo negativo; il risultato positivo viene confermato con metodo immunoenzimatico con lettura in fluorescenza [*enzyme linked fluorescent assay* (ELFA, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)] provvisto di elevata specificità. La positività di entrambi metodi è fortemente indicativa della presenza di anticorpi specifici verso la rosolia; la discordanza tra i metodi, solitamente positività del metodo più sensibile non confermata del metodo ELFA, impone una rivalutazione a breve del paziente o, nel caso siano presenti le IgG, la determinazione della loro avidità.

Test di II livello: avidità delle IgG anti Rubivirus - Obiettivo: distinguere l'infezione primaria recente o pregressa

Gli anticorpi anti Rubivirus di tipo IgG mostrano alta avidità di legame con l'epitopo virale dopo 12 settimane che il paziente ha contratto l'infezione[41]. Una alta avidità in una donna nelle prime settimane di gestazione indica che il feto non è a rischio di rosolia congenita. Per gestanti oltre le 16 settimane invece un alta avidità non esclude che l'infezione sia stata acquisita durante la gravidanza; in questo caso il rischio di trasmissione al feto va valutato mediante la determinazione degli anticorpi IgM contro la rosolia nel sangue fetale o l'individuazione diretta dell'RNA virale con tecnica di *Polimerase Chain Reaction* (PCR) nel liquido amniotico[42,43]. I dati della letteratura dimostrano che l'avidità delle IgG può rimanere intermedia anche per molto tempo dopo vaccinazione, mentre il soggetto che contrae naturalmente l'infezione sviluppa IgG ad alta avidità entro 90 giorni[44]. L'interpretazione dei risultati dei test sierologici effettuati entro il primo tri-

mestre prevede 3 ipotesi diagnostiche nel referto di laboratorio:
- avidità bassa: compatibile con una infezione primaria recente;
- avidità alta: compatibile con una infezione pregressa, acquisita almeno 12 settimane prima;
- avidità intermedia: non consente dei escludere una infezione primaria negli ultimi 4 mesi.

Test di III livello: biologia molecolare - Obiettivo: diagnosticare l'infezione congenita

Per la diagnosi prenatale di rosolia congenita è necessario utilizzare metodiche che consentono di rilevare l'RNA virale nel liquido amniotico come ibridazione o PCR con trascrizione inversa (RT-PCR)[43-45]. Il prelievo deve essere eseguito dopo 18 settimane di gestazione: prima di tale epoca l'esame comporta un rischio più elevato per il feto e presenta minor efficacia diagnostica. L'amniocentesi è indicata in gravide, senza controindicazioni per la procedura, in cui i test sierologici siano altamente suggestivi di un'infezione acquisita durante la gestazione e/o siano presenti o si sospettino danni fetali all'indagine ecografia. Nella pratica clinica la ricerca del virus sul liquido amniotico ha sostituito il prelievo di sangue fetale per la diagnosi di infezione congenita, a causa del rischio inferiore che comporta e la più elevata sensibilità dimostrata. In particolare RT-PCR mostra sensibilità e specificità estremamente elevate per la diagnosi prenatale di rosolia ed è una tecnica rapida ed efficace poiché garantisce risultati in 24-48 ore dopo il campionamento[46].

Infezione da Citomegalovirus

Il Citomegalovirus (CMV), nome comune dell'herpesvirus umano 5, appartiene alla famiglia delle *Herpesviridae*, è altamente specie specifico e presenta un genoma a doppio filamento di DNA; come tutti i virus erpetici, nell'ospite che lo subisce può causare danno cellulare, rimanere latente per anni e riattivarsi in seguito a una compromissione del sistema immunitario[47]. Se l'infezione primaria è contratta nelle prime settimane di gravidanza può provocare malformazioni gravi nel feto. La trasmissione del virus al feto può avvenire sia dopo l'infezione primaria sia dopo la ricorrente, che può essere determinata da riattivazione del ceppo virale latente o da un nuovo ceppo di CMV[48-51]. Tuttavia è dimostrato che la primaria, soprattutto se contratta entro le prime 12 settimane, colpisce più frequentemente il prodotto del concepimento e causa danni fetali più gravi e in maggior percentuale rispetto a quella ricorrente[49,51,52]: la trasmissione al feto si verifica in circa il 40% dei casi, contro 1% delle infezioni ricorrenti, con nascita di neonati congenitamente infetti che sono nel 10-15% dei casi sintomatici, 85-90% asintomatici. Tra gli asintomatici circa il 10% sviluppano sequele, mentre il 90% presentano uno sviluppo normale[51,53]. Lavori sperimentali hanno dimostrato che le infezioni congenite sintomatiche in madri immuni sono causate soprattutto da reinfezioni da parte di un ceppo nuovo di CMV, poiché hanno rilevato la presenza di anticorpi diretti contro nuovi epitopi della glicoproteina H del CMV non presenti in circolo prima della gravidanza in corso[54,55]. Dato che la stessa infezione primaria può essere clinicamente asintomatica in gravidanza o presentarsi con segni molto sfumati, diventa essenziale la ricerca degli anticorpi specifici di tipo IgG e IgM ogni mese fino alla 18^ settimana.

Test di I livello: IgG e IgM anti Citomegalovirus - Obiettivo: definire lo stato immune del soggetto

L'assenza di IgG e IgM indica che la gestante non è mai venuta a contatto col virus (soggetto non immune); la presenza degli anticorpi IgG e l'assenza di IgM indicano che il soggetto ha già contratto l'infezione primaria. Se sono presenti entrambi, anche con anticorpi IgM dubbi, è necessario stabilire se l'infezione è primaria o ricorrente e se è avvenuta durante la gestazione, per stabilire il rischio per il feto. Il dosaggio degli anticorpi IgG è quantitativo ed è espresso in Unità Internazionali/mL essendo disponibile una preparazione di riferimento. I metodi per la determinazione degli anticorpi IgM, qualitativa per la mancanza di standard internazionali, hanno raggiunto elevata sensibilità analitica anche nel rilevare gli anticorpi presenti nelle infezioni ricorrenti, ma la specificità è limitata da reattività crociata con altri virus della famiglia delle *Herpesviridae*, interferenza da fattore reumatoide e anticorpi antinucleo, presenza di IgM che reagiscono con antigeni cellulari[56,57]. Tuttavia oggi la disponibilità di tecniche ad immunocattura, che impiegano nella reazione immunologica un anticorpo anti-IgM umane e proteine virali specifiche, e l'introduzione di immunodosaggi, che utilizzano proteine o peptidi ricombinanti di CMV strutturali (pp150, pp65 e pp38) e non strutturali (pp52 e P130) blottati su supporti di nitrocellulosa, hanno consentito di eliminare diverse interferenze analitiche e a rilevare gli anticorpi della fase acuta con specificità molto alta[58-60]. Permane il problema legato della presenza di IgM specifiche persistenti: tali anticorpi possono rimanere in circolo per un anno dopo l'infezione acuta[61]. Nel nostro laboratorio il protocollo diagnostico applicato prevede che la ricerca di tali immunoglobuline venga effettuata con metodo in chemiluminescenza (CLIA, DiaSorin, Saluggia) per la sua elevata sensibilità e elevato valore predittivo negativo e che il risultato positivo sia confermato con metodo ELFA (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) provvisto di elevata specificità. In caso di positività di entrambi i metodi (nella gravida anche con discordanza tra test) viene eseguita la determinazione della avidità delle IgG specifiche per stratificare il rischio di infezione congenita, come raccomandato da evidenze sperimentali recenti[61-63]. In generale, livelli di IgM anti CMV alti o medio-alti possono essere riscontrati fino a 3 mesi dopo l'infezione acuta; dopo tale intervallo di tempo comin-

ciano a diminuire. Bassi livelli di IgM stabili per più di tre mesi sono compatibili con la presenza di IgM persistenti[64].

Test di II livello: Avidità delle IgG anti Citomegalovirus - Obiettivo: diagnosticare l'infezione primaria recente

La valutazione dell'avidità delle IgG, intesa come la percentuale di anticorpo legata all'antigene dopo trattamento con agenti denaturanti, aiuta a distinguere l'infezione primaria dalle ricorrenti nelle gestanti che presentano anticorpi IgM anti CMV nel siero. IgG-specifiche per il virus a bassa avidità sono prodotti nelle prime 4-6 settimane dopo l'insorgenza di infezione primaria, mentre gli anticorpi IgG ad alta avidità sono presenti nei soggetti almeno dopo 3 mesi dall'esordio della malattia o nelle forme ricorrenti; diversi studi riportano che i valori di avidità in campioni di siero prelevati meno di 3 mesi dopo l'insorgenza di infezione primaria sono compresi tra 21% ± 13%, mentre i valori medi di pazienti con infezione pregressa tra 78% ±10%[64,65]. Pertanto, la presenza di alti livelli di IgM e un basso indice di avidità (< 30%) sono altamente suggestivi di una infezione primaria contratta da meno di 3 mesi. Un lavoro recente ha inoltre evidenziato che un indice di avidità superiore al 65% durante il primo trimestre di gravidanza può ragionevolmente essere considerato un buon indicatore di malattia pregressa, mentre un indice di avidità ≤ 50% rappresenta un fattore di rischio di infezione congenita[65]. Lo stesso studio ha anche dimostrato che le donne che hanno un basso indice di avidità durante il primo trimestre di gravidanza trasmettono l'infezione al feto in percentuale significativamente inferiore rispetto a gravide con IgG ad avidità bassa rilevata nel corso del secondo o terzo trimestre di gravidanza[65,66]. Un indice di avidità > 70% entro le 18 settimane di gestazione dimostra un valore predittivo negativo per malattia congenita da CMV molto elevato[67,68].

Quando si sospetta la presenza di un'infezione in gravidanza si può ricercare CMV nel sangue della madre prima di praticare procedure invasive, per verificare se la malattia potrà interessare il feto. Nel corso di infezione sia primaria che ricorrente, da riattivazione o reinfezione, il CMV può essere rilevato in diversi fluidi corporei oltre il sangue come la saliva, urine e secrezioni vaginali, per un periodo di tempo variabile. Studi condotti negli ultimi 10 anni hanno dimostrato che la presenza di viremia in individui immunocompetenti è diagnostica di infezione primaria, dato che essa è assente o non rilevabile nelle infezioni ricorrenti; invece nei soggetti immunocompromessi è indicativa di malattia sia primaria che ricorrente[69-72]. Diversi metodi sono stati sviluppati per rilevare e quantificare CMV e le sue proteine nel sangue. I dosaggi più utilizzati comprendono la determinazione di:

- Viremia: i metodi tradizionali per l'isolamento del virus, che richiedono tempi lunghi perché si basano sulla comparsa dell'effetto citopatico sul tessuto di coltura, sono stati sostituiti dal *"shell vial"* test, che fornisce risultati in 24 ore. Esso si fonda sul principio che ogni fibroblasto umano p72-positivo, del monostrato che costituisce il substrato del test, è stato infettato da un leucocita che trasporta il virus: il numero di nuclei positivi è correlabile alla carica virale. Il principale svantaggio di questo test è la bassa sensibilità[73,74].
- Antigenemia: consente di rilevare e quantificare in poche ore il numero di leucociti positivi per la fosfoproteina pp65 nel sangue periferico, per lo più polimorfonucleati e, in misura molto minore, monociti / macrofagi[75]. Questa proteina è trasferita ai granulociti da cellule infettate tramite eventi transitori di microfusione tra due cellule aderenti[76]. Al momento dell'insorgenza dell'infezione l'antigenemia di regola è più sensibile e mostra maggior valore predittivo della viremia, perché si positivizza prima e si negativizza dopo di essa[77]; alti livelli di antigenemia sono spesso associati con malattia da CMV[78]. Il maggior limite di questo metodo è l'interpretazione soggettiva nella lettura del vetrino[73].
- DNA del CMV: la sua individuazione e quantificazione nel sangue periferico e urine consente la diagnosi di infezione da CMV dopo pochi giorni dal contagio grazie alla sua rapida comparsa in circolo; è ancora rilevabile dopo 4 mesi dalla primo-infezione e scompare entro 6 mesi[69]. Due sono i principali metodi analitici utilizzati per la sua determinazione: PCR e le tecniche di ibridazione[70,79]. Una particolare applicazione riguarda il loro impiego nella ricerca del DNA del virus nei campioni di liquido amniotico per la diagnosi prenatale di infezione da CMV.

L'infezione primaria può essere diagnosticata quando uno qualsiasi dei marcatori virologici su indicati è rilevato nei fluidi corporei con i quali viene eliminato il CMV, mentre studi diversi hanno dimostrato che nessun test è positivo in pazienti immunocompetenti con malattia pregressa o ricorrente[70-72]. La viremia permette la diagnosi di infezione primaria in circa il 25% dei casi durante il primo mese dopo l'esordio, l'antigenemia nel 50% dei pazienti nel primo mese e nel 25% dei soggetti nel secondo mese dopo l'insorgenza della malattia; CMV-DNA consente la diagnosi di infezione primaria nel 100% dei soggetti esaminati entro 1 mese dopo l'inizio della patologia e nel 98% di quelli sottoposti al test entro 2 mesi[61].

Test di III livello - Obiettivo: diagnosticare l'infezione congenita

Per la diagnosi prenatale le indagini sono effettuate nel sangue fetale prelevato tramite cordocentesi e nel liquido amniotico ottenuto mediante amniocentesi. Le principali indicazioni cliniche sono l'infezione primaria documentata della madre in gravidanza e/o alterazioni riscontrate all'esame ecografico come il ritardo di crescita intrauterina, idrope o ascite e anomalie del si-

stema nervoso centrale.

Su sangue fetale vengono eseguite:

- *la ricerca e la quantificazione della carica virale*: studi sull'efficacia diagnostica dei test in PCR, utilizzati per ben classificare l'infezione congenita, hanno dimostrato che antigenemia e viremia hanno una sensibilità inferiore al 60% nell'individuare la trasmissione dell'infezione al feto e la ricerca del DNA virale circa dell'85%; la specificità per tutti i dosaggi è del 100%[61,80]. Questi risultati evidenziano che tali test, eseguiti su sangue funicolare, rilevano correttamente tutti i feti non infetti, mentre non identificano almeno il 15% delle infezioni intrauterine;
- *la determinazione delle IgM specifiche del CMV:* presentano scarso valore predittivo a causa della bassa sensibilità dimostrata dal test (dal 20% al 75%)[81], mentre la specificità è del 100%[82]; va segnalato che i livelli di IgM sono significativamente più elevati nei feti con malattia congenita nei quali sono presenti anomalie ecografiche, biochimiche ed ematologiche, il che implica che questo parametro rappresenta un indicatore prognostico sfavorevole di malattia congenita[80]. È ragionevole presumere che la scarsa sensibilità del test eseguito a 20-23 settimane di gestazione dipenda dal fatto che tali anticorpi potrebbe essere prodotti dal feto in una fase più avanzata della gravidanza o dopo la nascita. Feti senza alterazioni biochimiche, ematologiche e/o ecografiche, cariche virali basse o assenti, IgM non rilevabili a 20-24 settimane di gestazione presentano un minor rischio di sviluppare malattia congenita[80].

L'isolamento del virus nel liquido amniotico mediante l'utilizzo del metodo PCR è riconosciuto come il test di riferimento per la diagnosi prenatale di infezione da CMV. In un recente studio prospettico la sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo e negativo di infezione congenita da CMV dell'esame eseguito nel liquido amniotico sono risultati rispettivamente 80%, 99%, 98% e 93%[83]. La sensibilità non ottimale del test trova spiegazione nel fatto che spesso c'è un ritardo nella trasmissione intrauterina della malattia[84,85]. Anche la rilevazione di piccole quantità di DNA virale (100 equivalenti genoma /mL di liquido amniotico) correla con la malattia congenita[64]. Il rischio di trasmissione del CMV al feto nel corso di procedure eseguite per la diagnosi prenatale in presenza di viremia nella madre non sembra essere elevato, anche se non può essere escluso[69]. La sensibilità della diagnostica prenatale può essere migliorata eseguendo l'amniocentesi dopo la 21^ settimana di gestazione[83,86], se possibile comunque lasciando trascorrere almeno 7 settimane tra l'esordio dell'infezione materna e il prelievo del liquido amniotico[84,86].

Infezione da Herpes Simplex Virus

Herpes Simplex 1 e 2 (HSV 1,2) sono virus a DNA che appartengono a *Alphaherpesvirinae*, una sottofamiglia delle *Herpesviridae* che si localizzano nei tessuti nervosi, dove possono persistere in uno stato latente per anni. L'infezione primaria da HSV nella donna incinta, relativamente all'epoca gestazionale in cui insorge, può provocare aborto spontaneo (primo trimestre), ritardo di crescita intrauterina (secondo trimestre), parto pretermine, infezione congenita o neonatale (terzo trimestre)[87]; in particolare se contratta alla fine del periodo gestazionale può determinare la malattia neonatale nel 30%-50% dei casi poiché la gravida non ha il tempo necessario per sviluppare gli anticorpi specifici per sopprimere la replicazione virale prima del parto[87-89]. Pertanto l'85% delle malattie congenite vengono trasmesse durante il parto, mentre l'infezione insorta nella prima parte della gestazione comporta un rischio molto basso sia di trasmissione al feto che al neonato; sono stati tuttavia descritti rari casi di infezione intra-uterina correlata a infezione materna grave[90,91]. La diagnosi di infezione da HSV può essere posta efficacemente mediante test diretti che consentono di isolare il DNA del virus dalle secrezioni vaginali o dal contenuto delle lesioni vescicolari o ulcerate della mucosa genitale mediante metodi di PCR o *real time* PCR; essi consentono di ottenere un risultato clinicamente sicuro in 24-48 ore. In assenza di lesioni muco-cutanee la diagnosi di infezione da HSV deve essere effettuata attraverso test indiretti rappresentati dal dosaggio degli anticorpi sierici specifici di tipo IgG contro la glicoproteina G di HSV-1 (GG-1) o la glicoproteina G di HSV-2 (gG-2) e le IgM specifiche[92,93]. Sulla base delle evidenze che emergono dalla letteratura la loro determinazione è appropriata se la gravida presenta segni clinici di infezione sistemica nelle prime 18 settimane di gestazione o lesioni attive tipiche a livello genitale nelle ultime settimane di gravidanza, per stabilire se la gravida ha contratto la prima infezione (IgG-/IgM+ o IgG+ /IgM+ a titolo elevato) e quindi definire il rischio di trasmissione dell'infezione al neonato. Quando l'infezione primaria è acquisita nel corso dei primi 6 mesi di gravidanza, è consigliabile ricercare il virus con metodi diretti sulle secrezioni o lesioni vescicolari genitali dalla 32ª settimana di gestazione. Se due determinazioni consecutive risultano negative e/o non ci sono lesioni genitali erpetiche attive al momento del parto è possibile eseguire un parto naturale. Le donne che presentano un episodio di recidiva di HSV alcune settimane prima della data prevista del parto devono sottoporsi a ricerche del virus a partire dalla 36^ settimana di gestazione[94]. Se la sieroconversione è completata al momento del travaglio il taglio cesareo non è necessario perchè il bambino è protetto dalla malattia dagli anticorpi materni e il rischio di trasmissione è basso[88,94].

Infezione da "Other"

Altri agenti infettivi, compresi nell'acronimo TORCH, possono provocare malattia fetale se contratti in gravidanza. Tra questi:

Varicella Zoster virus(VZV)

L'infezione da VZV può provocare due forme di patologia:

- *la sindrome della varicella congenita(CVS)*, se la madre contrae VZV durante i primi 6 mesi di gestazione precisamente tra 13 e 20 settimane (incidenza 2%) caratterizzata da lesioni cutanee, difetti neurologici, complicazioni oftalmologiche e anomalie scheletriche[95];
- *la varicella neonatale*, che si verifica in neonati da madri che hanno sviluppato VZV 5 giorni prima o 2 giorni dopo il parto e provoca sviluppo di esantema vescicolare[96].

Parvovirus B19

L'infezione da parvovirus può attraversare la placenta e interessare il feto, con un intervallo medio di 6 - 7 settimane tra l'esposizione materna e la malattia fetale. Nelle donne che contraggono il parvovirus nel primo trimestre la percentuale di abortività può raggiungere il 10%; il rischio più alto è tra 9 e 16 settimane di gestazione, si riduce nel secondo trimestre, e le complicanze fetali sono rare nel corso degli ultimi 2 mesi di gravidanza. L'infezione provoca grave anemia fetale che porta a insufficienza cardiaca congestizia e idrope dopo 2- 4 settimane dall'infezione materna[97,98]. Inoltre sono stati riportati diversi casi di anomalie del sistema nervoso centrale (encefalopatia, encefalite e meningite neonatale), miocardite e epatite[99]. Un indicatore precoce di lesione fetale è l'aumento nel sangue materno di alfa-fetoproteina[97]. La diagnosi di infezione da parvovirus B19 può essere posta ricercando gli anticorpi specifici IgM e IgG nel sangue materno. Dato che i livelli di IgM possono rimanere elevati anche per più di 6 mesi[100], non sempre la positività di IgG e IgM indica un'infezione recente: in questo caso è necessario ricercare il DNA virale, con metodo PCR, nel liquido amniotico[101].

Bibliografia

1. Stegmann BJ, Carey JC. TORCH Infections. Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. Curr Womens Health Rep 2002; 2:253-8.
2. Gilbert GL. Infections in pregnant women. Med J Aust. 2002; 176:229-36.
3. Mitchell CD, Erlich SS, Mastrucci MT, Hutto SC, Parks WP, Scott GB. Congenital toxoplasmosis occurring in infants perinatally infected with human immunodeficiency virus 1. Pediatr Infect Dis J 1990; 9:512-8.
4. Remington JS, McLeod R, Thuilliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker C, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. p. 947-1091.
5. Wechsler B, Le Thi Huong D, Vignes B, Piette JC, Chomette G, Godeau P. Toxoplasmose et lupus: revue de la litterature a propos de 4 observations. Ann Med Interne 1986; 137:324-30.
6. Boyer KM, Holfels E, Roizen N, Swishre C, Mack D, Remington J, et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. Am J Obstet Gynecol 2005; 192:564-71.
7. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. Lancet 1999; 353:1829-33.
8. Thiebaut R, Leproust S, Chene G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. Lancet 2007; 369:115-22.
9. Kieffer F, Wallon M, Garcia P, Thulliez P, Peyron F, Franck J. Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis J 2008; 27:27-32.
10. Petersen E. Toxoplasmosis. Semin Fetal Neonatal Med. 2007; 12:214-23.
11. Liesenfeld O, Montoya JG, Tathineni NJ. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. Am J Obstet Gynecol 2001; 184:140-5.
12. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis 2002; 185: 73-82.
13. Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. J Clin Microbiol 1997; 35:174-8.
14. Public Health Service, Department of Health and Human Services; US Food and Drug Administration. FDA public health advisory: limitations of toxoplasma IgM commercial test kits. Rockville, MD: Department of Health and Human Services; US Food and Drug Administration, 1997:3.
15. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 1997; 35:3112-5.
16. Hedman K, Lappalainen M, Seppala I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. J Infect Dis 1989; 159:736-9.
17. Pelloux H, Brun E, Vernet G, Marcillat S, Jolivet M, Guergour D, et al. Determination of anti–*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the Vidas system (bioMérieux). Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32: 69-73.
18. Lappalainen M, Koskiniemi M, Hiilesmaa V, Ammälä P, Teramo K, Koskela P, et al. Outcome of children after maternal primary *Toxoplasma* infection during pregnancy with emphasis on avidity of specific IgG. Pediatr Infect Dis J 1995; 14:354-61.
19. Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. Obstet Gynecol 2001; 97:296-300.
20. Montoya JG, Huffman HB, Remington JS. Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of to-

xoplasmic lymphadenopathy. J Clin Microbiol 2004; 42:4627-31.
21. Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, Press C, Remington JS. VIDAS test for avidity of *Toxoplasma*-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women. J Clin Microbiol 2002; 40:2504-8.
22. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JD. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J Clin Microbiol 1990; 28:2297-301.
23. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase-chain reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med 1994; 331:695-9.
24. Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Schaal JP, Equy V, Bost-Bru C, Pelloux H. Value of *Toxoplasma gondii* detection in one hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis J 2007; 26:845-6.
25. Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. Am J Obstet Gynecol 2004; 190:797-802.
26. Costa JM, Darde ML, Assouline B, Vidaud M, Bretagne S. Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. J Clin Microbiol 1997; 35:2542-5.
27. Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. J Clin Microbiol 2004; 42:1719-22.
28. Bretagne S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. Clin Microbiol Infect 2003; 9:505-11.
29. Gilbert GL. Rubella. In: Gilbert GL editor. Infectious disease in pregnancy and the newborn infant. 2nd ed. Switzerland: Hardwood Academic Press 1997. p. 23-62.
30. Lee JY, Bowden DS. Rubella Virus Replication and Links to Teratogenicity. Clin Microbiol Review 2000; 13:571-87.
31. Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. Mutat Res 1999; 434:243-51.
32. Pugachev KV, Frei TK. Rubella virus induces apoptosis in culture cells. Virology 1998; 250:359-70.
33. Höfmann I, Pletz MW, Liebert UG. Rubella virus-induced cytopathic effect *in vitro* is caused by apoptosis. J Gen Virol 1999; 80:1657-64.
34. Cusy MG, Valensin PE, Cellesi C. Possibility of reinfection after immunisation with RA 27/3 live attenuated rubella virus. Arch Virol 1993; 129:337-40.
35. Enders G, Nickerl U. Rubella vaccination: antibody persistence for 14-17 years and immune status of women without and with a history of vaccination. Immun Infekt 1988; 16:58-64.
36. Ingrand D. Diagnostic antenatal des infections rubeoliques. Rev Fr Lab 2003; 353:41-5.
37. Best JM, O'Shea S, Tipples G, Davies N, Al-Khusaiby SM, Krause A, et al. Interpretation of rubella serology in pregnancy - pitfalls and problems. BMJ 2002; 325:147-8.
38. Bottiger B, Jensen IP. Maturation of rubella IgG avidity over time after acute rubella infection. Clin Diagn Virol 1997; 8:105-11.
39. Morgan-Capner P, Crowcroft NS, PHLS Joint Working Party of the Advisory Committees of Virology and Vaccines and Immunisation. Guidelines on the management of, and exposure to, rash illness in pregnancy (including consideration of relevant antibody screening programmes in pregnancy). Commun Dis Public Health 2002; 5:59-71.
40. Thomas HI, Morgan-Capner P, Roberts A, Hesketh L. Persistent rubella-specific IgM reactivity in the absence of recent primary rubella and rubella reinfection. J Med Virol 1992; 36:188-92.
41. Banatvala JE, Brown DWG. Rubella. Lancet 2004; 363: 1127-37.
42. Grangeot-Keros L, Pillot FJ, Daffos, Forestier F. Prenatal and postnatal production of IgM and IgA antibodies to rubella virus studied by antibody capture immunoassay. J Infect Dis 1988; 158:138-43.
43. Ho-Terry L, Terry GM, Londesborough P, Rees KR, Wielaard F, Denissen A. Diagnosis of fetal rubella infection by nucleic acid hybridization. J Med Virol 1988; 24:175-82.
44. Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, Zavattoni M, Torsellini M, Gerna G. Prenatal Diagnosis of Rubella Virus Infection by Direct Detection and Semiquantitation of Viral RNA in Clinical Samples by Reverse Transcription-PCR. J Clin Microbiol 1997; 35:708-13.
45. Ho-Terry L, Terry GM, Londesborough P. Diagnosis of foetal rubella virus infection by polymerase chain reaction. J Gen Virol 1990; 71:1607-11.
46. Bosma TJ, Corbett KM, O'Shea S, Banatvala JE, Best JM. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples. J Clin Microbiol 1995; 33:1075-9.
47. Weller TH. Cytomegaloviruses: the difficult years. J Infect Dis 1970; 122:532-9.
48. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S, Svanberg L, Holmqvist R, Lernmark B, et al. Congenital cytomegalovirus infection and disease in Sweden and the relative importance of primary and secondary maternal infections. Preliminary findings from a prospective study. Scand J Infect Dis 1984; 16:129-37.
49. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med 1992; 326:663-7.
50. Schopfer K, Lauber E, Krech U. Congenital cytomegalovirus infection in newborn infants of mothers infected before pregnancy. Arch Dis Child 1978; 53:536-9.
51. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to the fetus and clinical outcome. JAMA 1986; 256:1904-8.
52. Demmler GJ. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. Rev Infect Dis 1991; 13:315-9.
53. Stagno S, Whitley RJ. Herpesvirus infection of pregnancy. N Engl J Med1985; 313:1270-4.
54. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. N Engl J Med 2001; 344:1366-71.
55. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Alford CA. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. Clin Obstet Gynecol 1982; 25:563-76.

56. Champsaur H, Fattal-German M, Arranhado R. Sensitivity and specificity of viral immunoglobulin M determination by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1988; 26:328-32.
57. Deyi YM, Goubau P, Bodéus M. False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19:557-60.
58. Kraat YJ, Stals FS, Christiaans MHL, Lazzarotto T, Landini MP, Bruggeman CA. IgM antibody detection for 38 (ppUL80a) and 150 (ppUL32) kDa proteins by immunoblotting: the earliest parameter for acute cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. J Med Virol 1996; 48:289-94.
59. Lazzarotto T, Ripalti A, Bergamini G, Battista MC, Spezzacatena P, Campanini F, 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.
60. Vornhagen R, Plachter B, Hinderer W, The TH, Van Zanten J, Matter L, et al. C. A. Early sero- diagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. J Clin Microbiol 1994; 32:981-6.
61. 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.
62. O'Neill HJ, Shirodaria PV, Connolly JH, Simpson DI, McGeown MG. Cytomegalovirus-specific antibody responses in renal transplant patients with primary and recurrent CMV infections. J Med Virol 1988; 24:461-70.
63. Lazzarotto T, Galli C, Pulvirenti R, Rescaldani R, Vezzo R, La Gioia A, et al. Evaluation of the Abbott AxSYM cytomegalovirus (CMV) immunoglobulinM(IgM) assay in conjunction with other CMV IgM tests and a CMV avidity assay. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8:196-8.
64. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and implications of human cytomegalovirus infection in pregnancy. Fet Matern Med Rev1999; 11:117-34.
65. Bodéus M, Goubau P. Predictive value of maternal IgG avidity for congenital human cytomegalovirus infection. J Clin Virol 1999; 12:3-8.
66. Yow MD, Williamson DW, Leeds LJ, Thompson P, Woodward RM, Walmus BF, et al. Epidemiologic characteristics of cytomegalovirus infection in mothers and their infants. Am J Obstet Gynecol 1988; 158:1189-95.
67. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, Guerra B, et al. Anticytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6:127-9.
68. Maine GT, Lazzarotto T, Landini MP. New developments in the diagnosis of maternal and congenital CMV infection. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1:19-29.
69. 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 1998; 177:1170-5.
70. Gerna G, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Chezzi L, Grossi P, et al. Human cytomegalovirus leukoDNAemia correlates more closely with clinical symptoms than antigenemia and viremia in heart and heart-lung transplant recipients with primary HCMV infection. Transplantation 1998; 65:1378-85.
71. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Krajden M, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. Transplantation 1999; 68:1305-11.
72. Sia IG, Wilson JA, Groettum C, Epsy MJ, Smith TF, Paya CV. Cytomegalovirus DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. J Infect Dis 2000; 181:717-20.
73. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev 1998; 11:533-54.
74. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Battaglia M. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. J Clin Microbiol 1990; 28:2681-8.
75. Grefte, JMN, van der Gun BTF, Schmolke S, van der Giessen M, van Son WJ, Plachter B, et al. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. J Gen Virol 1992; 73:2923-32.
76. Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sozzani S, Lanzarini P, Genini E, et al. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells *via* transient microfusion events. J Virol 2000; 74:5629-38.
77. Gerna G, Baldanti F, Grossi P, Locatelli F, Colombo P, Viganò M, et al. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in transplant recipients. Rev Med Microbiol 2001; 12:155-75.
78. Grossi P, Minoli L, Percivalle E, Irish W, Viganò M, Gerna G. Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. Transplantation 1995; 59:847-51.
79. Boivin G, Olson CA, Quirk MR, St-Cyr SM, Jordan MC. Quantitation of human cytomegalovirus glycoprotein H gene in cells using competitive PCR and a rapid fluorescence-based detection system. J Virol Methods 1995; 51:329-42.
80. Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Baldanti F, De Julio C, De-Giuli L, et al. Prenatal diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody response in blood of congenitally infected fetuses. J Infect Dis 1999; 180:1320-3.
81. Donner C, Liesnard C, Content J, Busine A, Aderca J, Rodesch F. Prenatal diagnosis of 52 pregnancies at risk for congenital cytomegalovirus infection. Obstet Gynecol 1993; 82:481-6.
82. Revello MG, Baldanti F, Furione M, Sarasini A, Percivalle E, Zavattoni M, et al. Polymerase chain reaction for prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection. J Med Virol 1995; 47:462-6.
83. Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. Obstet Gynecol 2000; 95:881-8.
84. Bodéus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalo-

virus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. Prenatal Diagn 1999; 19:314-7.
85. Revello MG, Sarasini A, Zavattoni M, Baldanti F, Gerna G. Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection by a modified nested polymerase chain reaction. J Med Virol 1998; 56:99-103.
86. Lipitz S, Yagel S, Shalev E, Achiron R, Mashiach S, Schiff E. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infection. Obstet Gynecol 1997; 89:763-7.
87. Brown ZA, Selke S, Zeh J, Kopelman J, Maslow A, Ashley RL, et al. The acquisition of herpes simplex during pregnancy. N Engl J Med 1997; 337:509-15.
88. Sauerbrei A, Wutzler P. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 1: herpes simplex virus infections. Med Microbiol Immunol 2007; 196: 89-94.
89. Patel R, Barton SE, Brown D, Cowan FM, Kinghorn GR, Munday PE, et al. Herpes Simplex Virus Special Interest Group of the Medical Society for the Study of Venereal Diseases, United Kingdom, European Branch of the International Union against Sexually Transmitted Infection and the European Office of the World Health Organization. European guideline for the management of genital herpes. Int J STD AID 2001; 12:34-9.
90. Enright AM, Prober CG. Neonatal herpes infection: Diagnosis, treatment and prevention. Semin Neonatol 2002; 7:283-91.
91. Barefoot KH, Little GA, Ornvold KT. Fetal demise due to herpes simplex virus: an illustrated case report. J Perinatol 2002; 22:86-8.
92. Cusini M, Ghislanzoni M. The importance of diagnosing genital herpes. J Antimicrob Chemother 2001; 47:9-16.
93. Swiss Herpes Management Forum. Swiss recommendations for the management of genital herpes and herpes simplex virus infection in the neonate. Swiss Med Wkly 2004; 134:205-14.
94. Ciavattini A, Vichi M, Rinci A, Tsiroglou D. Infezioni virali in gravidanza: gestione e raccomandazioni. La Colposcopia in Italia 2007; 2:11-6.
95. Sauerbrei A. Varicella-zoster virus infections in pregnancy. Intervirology 1998; 41:191-6.
96. Sauerbrei A, Wutzler P. The congenital varicella syndrome. J Perinatol 2000; 20:548-54.
97. Ergaz Z, Ornoy A. Parvovirus B19 in pregnancy. Reprod Toxicol 2006; 21:421-35.
98. Goff M. Parvovirus B19 in pregnancy. J Midwifery Womens Health 2005; 50:536-8.
99. De Jong EP, de Haan TR, Kroes AC, Beersma MF, Oepkes D, Walther FJ. Parvovirus B19 infection in pregnancy. J Clin Virol 2006; 36: 1-7. Erratum in: J Clin Virol 2007; 38:188.
100. De Haan TR, Beersma MF, Claas EC, Oepkes D, Kroes AC, Walther FJ. Parvovirus B19 infection in pregnancy studied by maternal viral load and immune responses. Fetal Diagn Ther 2007; 22:55-62.
101. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. N Engl J Med 2004; 350: 586-97.