

# Aggiornamento delle Procedure Operative Standard per la Diagnosi e la Cura dei Casi di Rosolia Congenita

*Updating Standard Procedures for Diagnosis and Treatment of Congenital Rubella Case*

W. Buffolano,<sup>1</sup> A. Fila,<sup>2</sup> M. Agnese,<sup>1</sup> M. Stronati,<sup>3</sup> P. Dicostanzo<sup>1</sup>

*Key words: Rosolia congenita sindrome, diagnosi, management, complicazioni ed esiti*

## Riassunto

La complicanza più temibile della rosolia contratta in gestazione è la rosolia congenita, che può complicarsi con aborto, morte endouterina, difetti congeniti multipli (cuore, occhio, udito, SNC), esiti a distanza e ridotta attesa di vita. Obiettivo dei programmi vaccinali contro la rosolia è pertanto la prevenzione della rosolia congenita. La strategia combinata di eliminazione Morbillo-Rosolia (riduzione dell'incidenza dei casi <1/100.000 nati vivi) attraverso la vaccinazione universale della popolazione dei nuovi nati è di dimostrata efficacia, quando le coperture della I dose siano stabilmente superiori al 95% e si realizzi il recupero alla vaccinazione della popolazione adulta suscettibile. Per la certificazione dell'avvenuta eliminazione, è fondamentale acquisire l'abilità di riconoscere i casi di RC, utilizzando adeguatamente e tempestivamente le risorse per la diagnosi, anche in caso di forma non manifesta alla nascita. Con il presente documento si intende offrire supporti al sospetto e alla conferma diagnostica dei casi di rosolia congenita, anche dopo l'anno di età, mediante il ricorso a tecniche non routinarie sierologiche o di misura di mediatori della risposta immune. Sono altresì discussi i supporti per la definizione della gravità di esordio (rosolia congenita sindrome o infezione) e la programmazione delle cure a breve e lungo termine dei casi di RC.

## Abstract

Congenital Rubella is the dramatic consequence of rubella during gestation. A combined strategy of Measles and Rubella universal vaccination on children and selective vaccination of susceptible women has been shown effective in the elimination of congenital rubella requiring an incidence of <1 case of CRS per 100,000 live births. Verification processes of rubella elimination require that physicians early and appropriately diagnose all cases of congenital rubella, including those unpatent at birth. The paper highlights clinical and laboratory aspects channeling diagnosis of congenital rubella infection or syndrome even after the first year of life, and the short- and long-term management criteria.

## Prefazione

La rosolia è un'infezione virale acuta esantematica, di cui la rosolia congenita (RC) è la complicanza della forma acquisita in gestazione. La rosolia non è curabile, ma può essere prevenuta con la vaccinazione, sfruttando la piastra offerta dalla strategia di eliminazione del morbillo, con il vaccino trivalente Morbillo- Rosolia- Parotite. A partire dal 2003, l'Italia condivide il progetto di eliminazione di morbillo e rosolia congenita lanciato dalla Regione Europea dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in 130 Paesi.<sup>1-5</sup> Il progetto si pone l'obiettivo di ridurre l'incidenza della rosolia congenita a <1 caso su 100.000 nati vivi. Enormi sforzi sono stati compiuti e discreti risultati ottenuti; tuttavia, la rosolia in gravidanza e la RC continuano a circolare in Italia e altri Paesi EU.<sup>6-8</sup>

Dal momento che l'avvenuta eliminazione andrà certificata, è essenziale che il riconoscimento dei casi sia sistematico, oltre che attuato adeguatamente e tempestivamente, anche nelle forme non patenti alla nascita. D'altra parte, la circolazione persistente della RC impone risposte al persistente e drammatico bisogno di salute. Infine, essendo la RC una patologia oltre che complessa anche potenzialmente evolutiva e imprevedibile, è necessario che il Medico di

<sup>1</sup> Centro Coordinamento Infezioni Perinatali- Regione Campania, Università Federico II, Napoli, Italia

<sup>2</sup> Reparto Epidemiologia delle Malattie Infettive, Centro Nazionale Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

<sup>3</sup> Neonatologia, Patologia Neonatale e Terapia Intensiva, Fondazione IRCCS- Policlinico San Matteo, Pavia

Indirizzo per la corrispondenza (Corresponding author):

Wilma Buffolano

Centro Coordinamento Infezioni Perinatali - Regione Campania,  
Azienda Universitaria Policlinico, via Pansini n 5, Ed. 9H, 80131- Napoli, Italia  
Tel. +39- 081 7462914; Fax +39- 081 7462979; e-mail: wilma@unina.it

Medicina Generale (MMG) mantenga l'allerta su eventuali complicanze tardive, una volta che il soggetto con RC sia divenuto adulto. Pediatra e MMG dovranno altresì favorire in chi accudisce il paziente capacità di percezione su eventuali cambiamenti che possono annunciare complicanze tardive.

Il presente documento, di aggiornamento e integrazione delle Procedure Operative Standard elaborate in collaborazione tra Società Italiana di Neonatologia (SIN) e Istituto Superiore di Sanità (ISS) a sostegno del Piano di Eliminazione del Morbillo e della Rosolia Congenita, 2004- 2007, è rivolto sia al neonatologo, cui compete la sorveglianza sui casi incidenti di RC, sia ai pediatri (ospedalieri e/o di Libera Scelta), che possono trovarsi nella necessità di attuare retroattivamente la diagnosi di RC o sue complicanze, nonché agli specialisti che delle complicanze della RC si fanno carico. Intende, insomma, rivisitare i criteri per sospetto diagnostico, definizione di severità della forma alla nascita, appropriata gestione a lungo termine dei pazienti con RC, anche per misure di impatto.<sup>9</sup>

### ***I.a La rosolia***

La rosolia, è una malattia esantematica contagiosa, a decorso rapido e generalmente benigno. Il contatto interumano ravvicinato (almeno 30 minuti nella stessa stanza e a meno di 1 metro di distanza) è l'elemento cruciale per la trasmissione, che avviene attraverso l'aria espirata (tosse e starnuti).

Nelle aree geografiche senza o con inadeguata strategia vaccinale, la rosolia decorre in modo endemico, con riaccensioni epidemiche ogni 4-9 anni (nei climi temperati il picco d'incidenza si registra tra fine- inverno e inizio- primavera). Il periodo di incubazione dura in media 18 giorni (intervallo 12- 23 giorni). Il periodo contagioso occupa 2- 3 settimane; infatti, il virus si riproduce in nasofaringe dalla settimana che precede l'esantema fino a 1-2 settimane dopo la comparsa dell'esantema (periodo di stato). La viremia occupa gli ultimi giorni della fase di incubazione e l'intera fase di stato. L'immunità acquisita in via naturale, o in seguito a vaccinazione, è permanente ma non assoluta ed è documentabile mediante dimostrazione della presenza di anticorpi specifici (IgM e IgG) in test sierologico (Rubeo- test).

Il quadro clinico caratteristico include: 1. esantema eritematoso maculopapulare confluyente e fugace (durata circa 3 giorni), che compare a distanza di 14-21 giorni dal contagio: inizia in zona retro-auricolare per estendersi a volto e a tronco; man mano che l'esantema diffonde, le lesioni comparse per prime scompaiono. 2. linfadenomegalia, che precede l'esantema di 5- 10 giorni e persiste 10- 14 giorni oltre la sua risoluzione; si localizza in zona retro auricolare, nucale e latero- cervicale; 3. sintomi generali (febbre, cefalea e rinocongintivite) che precedono di 1-5 giorni l'esantema; 4. artralgia - artrite complicante il 70% dei casi di rosolia in donne giovani. Interessa mani, polsi e gomiti e scompare in 1- 3 settimane.<sup>10</sup> Complicazioni poco frequenti sono la trombocitopenia e l'encefalite potenzialmente mortale, che si manifesta in circa 1 caso su 6.000. Specie quando contratta durante l'adolescenza o in età adulta, il periodo contagioso della malattia può decorrere non riconosciuto; infatti, nel 50% dei casi l'esantema è atipico o addirittura

assente. Questo interferisce con il sistematico isolamento di casi e contatti e facilita la propagazione dell'infezione.

### ***Ib. La Diagnosi di rosolia***

Le diagnosi di rosolia su base puramente clinica non è affidabile.<sup>11</sup> Pertanto, il dato anamnestico di una rosolia sofferta in passato non smentisce il sospetto clinico o di laboratorio. Al di fuori della gestazione, specie nei casi in cui è riconosciuto il contatto e sono evidenziati i segni clinici predetti, è sufficiente praticare il Rubeo- test per confermare la diagnosi. Se una recente vaccinazione può essere esclusa, l'infezione è confermata nelle seguenti condizioni: 1. positività delle IgM (test EIA); 2. positività delle IgG (sierocconversione o incremento su 2 campioni raccolti a distanza di 7- 10 giorni e processati contemporaneamente nelle stesse condizioni operative). Se il sospetto nasce in gestazione, è indispensabile datare con buona approssimazione l'epoca presunta di viremia materna, per stabilire il rischio embrio- fetale. Pertanto, è raccomandato il ricorso a una ulteriore conferma diagnostica, attraverso test sierologici di II livello o esami virologici. Infatti, IgM specifiche con lunga persistenza (mesi o anche anni dopo l'infezione naturale) sono state registrate nel 2- 3% delle gestanti e false positività delle IgM con bassi livelli di IgG al Rubeo test sono stati riscontrati anche in infezioni diverse dalla rosolia.<sup>12,13</sup>

Un test di conferma consolidato, anche se non completamente standardizzato, è quello dell'avidità delle IgG, che misura la percentuale di IgG di sottoclasse 1 sul totale delle IgG specifiche prodotte dal paziente in risposta all'infezione. Una avidità alta è associata a risposta sierologica matura (a distanza di 4 e 8 settimane dall'esantema, rispettivamente il 100% e 50% dei soggetti presenta bassa avidità delle IgG- rosolia specifiche; dopo 4 mesi, la percentuale di soggetti con bassa avidità si riduce a <10%). Dunque, un test di avidità elevato depone contro una infezione nelle precedenti 16 settimane.<sup>14</sup> Purtroppo, i risultati ottenuti con i diversi kit del commercio non sono ancora univoci e questo ne complica l'interpretazione, che va affidata a persona esperta della malattia e del test.<sup>15</sup> La vaccinazione interferisce con i risultati del test di avidità, inducendo una maturazione (incremento percentuale delle IgG1 nel tempo) più lenta di quella conseguente la malattia naturale. Nel 50% dei vaccinati, il test raggiunge il picco in 10- 12 mesi. In circa il 30% dei soggetti immunizzati (in via naturale o con la vaccinazione) il test rimane in zona grigia, anche per anni. Nelle reinfezioni, avidità elevate sono sviluppate in appena 2- 4 settimane.

Un altro test di conferma consolidato e commercializzato, ma meno diffuso, è l'immunoblotting (IB), che identifica anticorpi prodotti contro 3 proteine strutturali del virus, due dell'envelope (E1 e E2) e una del core (C). In seguito all'esantema, anticorpi contro l'antigene E1 sono prodotti in 7- 30 giorni (positività della banda omologa), mentre quelli contro l'antigene E2 sono evidenziabili dopo 2- 4 mesi (specie se si utilizzino antigeni ricombinanti).<sup>16</sup> Gli anticorpi contro l'antigene C compaiono in fase acuta e scompaiono dopo 3 anni. Il test IB consente la diagnosi differenziale tra rosolia infezione vera (IB E1 +) e falsa positività delle IgM (IB E1- e C-), nonché tra infezione pregressa (E2+ e E1+) e infezione recente (E1+ e E2-).<sup>17</sup>

MANIFESTAZIONI CLINICHE DESCRITTE IN ASSOCIAZIONE CON LA ROSOLIA CONGENITA.					
<b>Nascita</b>					
<b>Generali</b>		Restrizione crescita endouterina	<b>Precoci (early)</b>		Stenosi periferica a. polmonare
		Basso Peso nascita			Stenosi valvolare polmonare
		Prematurità			Dotto Arterioso Pervio
		Aborto spontaneo			Difetto InterAtriale, Difetto InterVentricolare
<b>Precoci (early)</b>	<b>Occhio</b>	Opacità corneali			Miocardite
		Cataratta			Anomalie Arco Aortico
		Corioretinite		<b>Diversi</b>	Polmonite interstiziale
		Retinite pigmentosa			Ipoplasia timica
	Microftalmia			Stenosi a. renale e ipertensione	
	<b>SNC</b>	Iidrocefalia/ Fontanella a. ampia	<b>Tardive (late)</b>	<b>SNC</b>	Ipotonia
		Microcefalia			Ritardo sviluppo psicomotorio
		Meningoencefalite			Deficit Uditivo Anomalie comportamento Autismo/ Psicosi
		Convulsioni o equivalenti (letargia/ irritabilità/ suzione stentata/ automatismi)			Panencefalite progressiva
	<b>Addome</b>	Epatosplenomegalia		<b>Ghiandole endocrine</b>	Deficit GH
		Iperbilirubinemia (diretta)			Iper- o ipo- tiroidismo
	<b>Cute</b>	Blueberry- muffin rash			Diabete giovanile o mellito
		Porpora trombocitopenica			Pubertà precoce

Da: Buffolano W. et al. Ped. Med. Chir. (Med. Surg. Ped.),2004, 26: 9-18 (modificata)

## II. La rosolia congenita

La rosolia, contratta in gravidanza, può essere trasmessa per via diaplacentare, anche quando sia decorsa senza manifestazioni cliniche. Alla RC possono associarsi difetti congeniti molteplici, che configurano una caratteristica sindrome (RC- sindrome), in cui sono primariamente coinvolti apparato uditivo, visivo e cardiovascolare, nonché sistema nervoso.<sup>18</sup> Complessità ed evolutività della RC sono riconducibili ai 2 effetti patogeni del Rubivirus, che esplica un effetto citopatico acuto sull'endotelio, con conseguente danno della parete dei vasi sanguigni, e un effetto inibente cronico sulla replicazione cellulare (sia in fase organogenetica che non). Il ritardo di crescita somatica (sia intra- che extra- uterina) è un segno costante della RC, persino delle infezioni del III trimestre di gestazione. Ne consegue che l'esclusione della RC- sindrome è buona pratica clinica in ogni caso di ritardo di crescita intra- uterina se la donna non dispone di prove di protezione acquisita prima del concepimento. Purtroppo, la diagnosi ultrasonografica prenatale di RC è difficile.

### Ila. Manifestazioni Cliniche

Le manifestazioni cliniche della RC sono tradizionalmente distinte su base cronologica in 1. precoci (transitorie o permanenti) e 2. tardive (Tab. 1). Le varie fasi di malattia non possono essere considerate reciprocamente esclusive.

L'insieme delle manifestazioni transitorie configura la cosiddetta *Expanded Rubella Syndrome* dell'esordio severo, un quadro clinico drammatico alla nascita e comune ad altre infezioni congenite (CMV e varicella congenite). E' caratterizzato da porpora trombocitopenica, segni di eritropoiesi dermica (blueberry muffin rash), epatosplenomegalia, ittero a componente diretta, epatite, anemia emolitica da iperplasia eritroide, encefalite, polmonite, miocardite,

opacità corneali, sottili linee di iperdensità alternate a rarefazione ossea a livello metafisario delle ossa lunghe e alla giunzione costochondrale (strie radiolucenti) che si completano nei primi 2 mesi di vita e scompaiono poi senza conseguenze. Apprezzabile pienamente solo nei primi 2 mesi di vita, è la forma più grave di RC- sindrome: nel 35% dei pazienti si ha il decesso nei primi 18 mesi di vita per insufficienza cardio- respiratoria o emorragia cerebrale; nel restante 65% si riscontrano esiti severi, soprattutto a carico del SNC. Talvolta, la RC ha esordio sistemico tardivo (primi 12 mesi di vita), con esantema cronico di tipo rubeolico associato a polmonite e diarrea persistente.<sup>19,20</sup> E' relativamente comune che anomalie oculari (in primis cataratta), difetti cardiaci, encefalite o suoi esiti (ritardo mentale), anomalie cranio- facciali (microcefalia), sordità neurosensoriale e ipoevolutismo somatico vengano riconosciuti tra i 2 e i 6 mesi di vita.<sup>21</sup>

Le manifestazioni permanenti sono conseguenza dell'effetto combinato da una parte del potenziale teratogeno del Rubivirus, che induce anomalie strutturali organo-genetiche, dall'altra della risposta infiammatoria dell'ospite, con esito in necrosi tissutale. Si evidenziano a carico dei più diversi organi e apparati (Tab. 1).

Il deficit uditivo è il segno prevalente e talvolta unico della RC- sindrome, perché l'organo del Corti è quello che risente per un periodo di tempo più lungo degli effetti della replicazione virale (tutta la prima metà della gestazione).<sup>22</sup> Il difetto uditivo della RC è caratteristicamente periferico (neurosensoriale) e più raramente centrale. Quando solo monolaterale, spesso resta non indagato sul piano eziologico. Può restare non rilevato allo screening audiologico del neonato; infatti, l'insorgenza può essere tardiva e il decorso ingravescente. Se di natura centrale o mista, si caratterizza per un persistente ritardo del linguaggio dopo la protesizzazione, tanto da simulare un ritardo mentale.

Difetti cardiaci congeniti a carico di tronco vascolare e setti [Dotto Arterioso Pervio (DAP), coartazione aortica, Difetti del setto InterVentricolare (DIV) e/o Inter-Atriale (DIA), nonché stenosi (valvolare o periferica) dell'arteria polmonare], complicano i casi di RC acquisiti nelle prime 8-10 settimane di gestazione. Possono essere isolati, o combinati. Essendo causa potenziale di malattia coronarica, cerebrale, renale e vascolare periferica in età adulta, tipo e gravità della cardiopatia condizionano la prognosi quoad vitam della RC.

Anomalie oculari, in larga maggioranza bilaterali, includono cataratta centrale (nucleare o membranosa) con anello periferico, glaucoma, difetti del visus (ambliopia, nistagmo e strabismo), microftalmo, opacità corneali, micropupilla con incompleta risposta dilatativa ai farmaci midriatici, retinopatia da anomalo sviluppo dello strato pigmentario. Cataratta e retinopatia sono le manifestazioni prevalenti (rispettivamente 12% e 33% dei casi); possono essere rilevate alla nascita o rendersi apprezzabili dopo settimane, mesi o anche anni.<sup>23</sup> Di per sé, la retinopatia non compromette la visione. Tuttavia, un danno visivo permanente residua quando fenomeni di neoformazione vasale sub-retinica non sono trattati tempestivamente con la terapia fotodinamica.<sup>24</sup> Il glaucoma della RC può essere di 2 tipi: 1. tipo infantile con angolo acuto, decorso progressivo fino a buftalmo e opacamento corneale; 2. tipo tardivo, secondario (spesso complicante a distanza di 2- 16 anni l'intervento di avulsione della lente catarattosa), afachico e talvolta associato a microftalmo e/o ipoplasia dell'iride.

Le manifestazioni tardive, quali esito della cronica replicazione virale e/o della cronica stimolazione del sistema immune, possono comparire 1. tardi in età pediatrica, 2. in età adulta 3. nella maturità.<sup>25,26</sup> Includono disendocrinopatie (diabete e distiroidismo), sordità progressiva, danno visivo e vascolare (ipertensione renale e/o aortica), malattie degenerative del SNC, disordini psichiatrici che interferiscono con la capacità di vita indipendente e di occupazione vocazionale, pur se non competitiva (autismo, ansia da separazione, compromissione delle relazioni sociali).<sup>27</sup> Molti pazienti con RC-sindrome mostrano deficit neuromotorio persistente. Il rischio relativo per diabete insulino-dipendente e per psicosi non affettive è significativamente aumentato rispetto alla popolazione generale (rispettivamente, di 100- 200 volte e 5.2 volte).<sup>28,29</sup> Eccezionalmente, è stata descritta una involuzione progressiva delle capacità motorie e cognitive (encefalopatia subacuta progressiva).<sup>30</sup>

### ***IIb. La gestione a lungo termine della RC***

Nel corso degli anni, i pazienti con RC possono richiedere interventi chirurgici e/o neuro-riabilitativi.

- a) Una riparazione salvavita può essere necessaria per le anomalie cardiache. Per quanto attiene i difetti cardiaci, va sottolineato che, per alcuni di essi, tecniche di cateterizzazione terapeutica possono essere preferibili a farmaci e chirurgia (chiusura a ombrello del Dotto Arterioso Pervio, dilatazione ballonare della valvola polmonare).
- b) Un trattamento chirurgico può rendersi necessario per difetti dell'occhio, quali glaucoma, cataratta e neovascolarizzazione retinica. La cataratta può essere eliminata con estrazione extra-

capsulare della lente e successivo impianto di una lente artificiale intraoculare. L'intervento va praticato entro il III mese di vita, per conservare la visione tridimensionale, che si sviluppa in questo periodo. L'impianto della lente non sempre ha il successo sperato. In caso di glaucoma, la laserterapia è l'intervento di elezione.

Attesa e qualità di vita dei soggetti con RC sono nel complesso poco conosciute, perché documentate su coorti nate a metà del secolo scorso. Nella coorte australiana (anni '40), quando i pazienti furono intervistati ai 25 anni di età, la qualità di vita risultò discreta: molti di loro erano coniugati e avevano un lavoro, per quanto non competitivo.<sup>31</sup> Nell'indagine condotta successivamente, quando erano ormai sessantenni, l'attesa di vita risultò invece significativamente inferiore a quella della popolazione generale, per la maggiore incidenza di diabete tipo 2, distiroidismo (sia iper- che ipo-) e menopausa precoce.<sup>32</sup> I risultati ottenuti sulla coorte USA (anni '60) a 25 anni furono invece scoraggianti: la maggioranza dei pazienti intervistati fu trovata in situazione di impossibilità a vivere indipendenti.<sup>33</sup> Non si può escludere che le differenti conclusioni dei due studi fossero in parte ascrivibili alla disponibilità, nella coorte americana con danno cardiaco, di cure medico-chirurgiche più progredite (ovviamente, con lievitamento dei costi sociali e di assistenza). Purtroppo, mancano informazioni su esiti a distanza e qualità di vita nei nati con RC in anni più recenti, verosimilmente, per minore attenzione sulla RC in Europa e USA, nella prospettiva di una sua eliminazione. In EU, negli anni '90 sono stati lanciati studi collaborativi multicentrici contro molte infezioni congenite (HIV, toxoplasmosi, HCV), ma non contro la RC. Eppure, si stima che nel mondo annualmente continuino a nascere 100.000 bambini con la RC.<sup>34</sup>

### ***IIc. Severità clinica della RC rispetto alle varie fasi della gestazione***

Rischio di trasmissione e gravità clinica alla nascita della RC dipendono dalla settimana di gestazione (EG) in cui la madre è in fase viremica; questa dura una decina di giorni (inizia 7 giorni prima del rash e si estingue alla scomparsa dell'esantema). Nello storico studio di Miller sugli effetti della rosolia in gestazione, nelle prime 11 settimane EG la trasmissione si ebbe nel 90% dei casi di rosolia con rash. In seguito, la trasmissione diminuì fino a 30 settimane EG (67% tra 11 e 15 EG, 47% a 17 EG, 35% a 30 EG), per poi risalire (60% a 31- 36 EG).<sup>35</sup> Nel follow-up a due anni, il 20% dei casi di RC presentò segni permanenti (100% in caso di contagio materno prima di 11 settimane EG e 35% tra 13 e 16 settimane EG). Nella serie di C. Peckham, l'incidenza globale di difetti congeniti, valutata a 2 anni, fu del 23% (52% in caso di infezione <8 settimane EG, 36% a 9- 12 EG, 10% a 13- 20 settimane EG).<sup>36</sup> Nelle infezioni databili 11- 17 settimane EG, le anomalie risultano a carico di un solo organo bersaglio, più spesso l'apparato uditivo. Difetti d'organo sono rari dopo le 16 settimane EG.<sup>37</sup> In conclusione, il counselling prenatale va individualizzato sulla base della presunta EG di infezione materna (o meglio di viremia), non dimenticando che le forme severe sono appannaggio delle viremie materne nelle prime 8-9 settimane EG.

TEST DI LABORATORIO PER LA CONFERMA DELLA DIAGNOSI DI ROSOLIA CONGENITA.				
Metodo	Campione biologico	Età test (consigliata)	Interpretazione Risultato	Referenza
EIA- IgM (immunocattura)	Siero, saliva	<3m	IgM+/ IgG+: RC confermata; IgM-/IgG+: ricontrolla nel tempo (criterio clinico); IgM-/IgG-: madre con falsa positività IgM in gravidanza	Corcoran C & Hardie DR. <i>Pediatr Infect Dis J</i> 2005; 24: 286- 87
Isolamento RV in coltura cellulare	saliva, urine, tessuti post-mortem	<12m	Positivo: diagnosi confermata RC; Negativo: RC non confermata; ricorrere ad altro test	Bosma T.J et al, <i>J Clin Microbiol</i> 1995; 33: 1075-79
RV-RNA (RT- nPCR)	saliva, urine, liquor, aspirato lente, sangue intero su filter-paper, tessuto*)	<12m	Positivo: diagnosi confermata RC; Negativo: RC non confermata; ricorrere ad altro test	Katow S. <i>Intervirolog</i> 1998;41:163-9
EIA- IgG (immunocattura)	siero	7- 11m	Positivo: diagnosi confermata RC; Negativo: RC esclusa (rare eccezioni)	Cooper, Krugman 1967
IgG Avidità	siero	6m- 3a	Bassa avidità persistente (anche >12 mesi di vita) + segni clinici: diagnosi RC confermata Bassa avidità persistente (anche >12 mesi di vita) - segni clinici: diagnosi RC suggestiva	Thomas HJ et al, <i>J Med Virol</i> 1993; 41: 196- 200
Risposta alla vaccinazione (sierologica)	siero	1-3a	Mancata produzione o bassi livelli di IgG (<300UI/ml) e IgG1 (bassa avidità) in risposta alla vaccinazione con normale risposta al morbillo): diagnosi RC suggestiva	Fitzgerald MG et al, <i>Pediatrics</i> 1988, 81: 812-814
Risposta Mitogenica (in vitro)	sangue intero fresco	<3a	Mancata risposta in vaccinato o dopo Rosolia clinica: Diagnosi RC suggestiva	Katow S & Sugiura A, 1985 <i>J Clin Microbiol</i> 21, 449- 51; O'Shea S et' al, <i>J Virol Methods</i> 1992; 37: 549
Enzyme- Linked ImmunoSpot test (ELISPOT)	sangue intero fresco	<3a	Mancata risposta in vaccinato o dopo Rosolia clinica: Diagnosi RC suggestiva	Allmendinger J et al, <i>J. Med. Virol.</i> 2010; 82:335-40;
ImmunoBlotting	siero	1-3a	Intensa risposta anti-E2 + e tardiva risposta anti-E1: Diagnosi RC suggestiva	Chaye HH et al., <i>J. Clin. Microbiol.</i> 1992; 30: 2323- 2329

### IId. Diagnosi di Rosolia Congenita

In Tab. 2b, sono riassunti i test per la conferma di laboratorio della RC alla nascita e quelli supplementari per la diagnosi retroattiva.

Il sospetto diagnostico di RC, basato su criteri clinici o anamnestici (storia clinica e/o sierologica materna in gravidanza) impone sempre il ricorso alla conferma di laboratorio.

Comunemente, la diagnosi di RC poggia sulla dimostrazione di positività delle IgM specifiche in test EIA a immunocattura. La positività del test su 2 campioni sierologici è considerata probante, per l'elevata specificità del risultato. La sensibilità del test (96%, quando applicato nei primi 3 mesi di vita) tende a diminuire nel tempo: 87% a 3- 6 mesi di vita, 71% a 6- 12 mesi di vita, 67% a 18 -24 mesi di vita.<sup>12</sup> Invece, la negatività delle IgM alla nascita (da confermare con un secondo test dopo una settimana e da affiancare all'uso di un secondo test a cattura) non esclude la diagnosi di RC. Infatti, man mano che, grazie alla strategia di vaccinazione universale, la rosolia circola sempre di meno nella popolazione, la probabilità che il Rubeo- test IgM negativo identifichi correttamente i casi di non infezione diminuisce, mentre aumenta il rischio di false positività a un solo test, da reazione crociata con altri virus, quali Morbillo, Parvovirus B19 o HSV-6 o passaggio transplacentare di IgM materne in prossimità del parto.<sup>38</sup> Ovviamente, un secondo Rubeo- test IgM e IgG, eseguito a distanza di 15- 28 giorni dal primo, dà modo di chiarire la diagnosi. Se la IgM positività è vera, il risultato sarà positivo anche sul secondo campione raccolto. In questo caso, i valori delle IgG specifiche si manterranno stabili (o anche aumenteranno). Se invece si tratta di IgM positività falsa, sul secondo campione esse risulteranno negative e i valori di IgG diminuiranno conseguentemente al tempo intercorso tra primo e secondo campionamento. Infatti, le IgG dimezzano ogni 28 giorni, se di origine materna; restano invariate o aumentano, se c'è neosintesi da parte del bambino.

Specialmente nei casi di RC con Rubeo- test IgM positività, ma senza segni clinici e senza test virologico probante (non eseguito o eseguito tardi e negativizzato), la diagnosi di RC va confermata /esclusa ripetendo il Rubeo- test IgG tra i 7 e gli 11 mesi, prima che sia stata praticata la vaccinazione con MPR. Un test IgG positivo conferma definitivamente la diagnosi di RC (e la necessità di follow up a lungo termine su segni permanenti e tardivi); un test IgG negativo esclude definitivamente la diagnosi di RC.

Nei pazienti in cui il quesito diagnostico si pone dopo i 3 mesi di vita, per esempio all'insorgenza di un segno tardivo, e il risultato di test virologici e IgM specifiche è negativo, la diagnosi eziologica può essere formulata in base alle peculiarità della risposta dell'ospite. La diagnosi retrospettiva, sul piano della sorveglianza, non può mai essere classificata come definita.

L'isolamento virale e la PCR hanno bassa sensibilità, ma alta specificità. La sensibilità diminuisce con l'età (84% a un mese di vita, 62% a 4 mesi).<sup>39</sup> Tuttavia, urine, secreto nasofaringeo e liquor possono risultare positivi fino a 12 mesi e l'aspirato del cristallino con cataratta è risultato positivo nel terzo anno di vita. Concludendo, se il test colturale risulta positivo, la diagnosi di RC è retroattivamente confermata; se risulta negativo, la diagnosi di RC non può essere esclusa. Resta la possibilità di confermare l'infezione ricorrendo al Rubeo- test IgG a 7 -11 mesi di vita.

Dopo l'anno di età, la diagnosi di RC può essere confortata dal fenomeno della lenta maturazione delle IgG. In questo caso, vaccinato o no che sia il paziente, la positività al Rubeo- IgG si combina con una bassa percentuale di IgG1 al test di avidità. Nei pazienti con RC, le IgG specifiche possono scomparire nel tempo, in genere in età prescolare.<sup>40</sup> In questo caso, al momento della seconda dose MPR, mentre la popolazione infantile risponde alla vaccinazione con incremento delle IgG e rapida maturazione di una avidità alta, i pazienti con RC rispondono normalmente al vaccino anti- mor-

Tabella 3

ELEMENTI CLINICI SU CUI BASARE LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE ROSOLIA CONGENITA INFEZIONE E ROSOLIA CONGENITA SINDROME.

Valutazione	Strumenti		Difetto da escludere
	I livello	II livello	
Generale	Parametri auxologici corretti per l'EG al parto, cute per presenza di ittero, rash o petecchie, margini epatico e splenico, tono, postura e riflessi, motilità spontanea e suzione;	Ri- valutazione USG in gestazione	Microcefalia, Ritardo crescita armonico, segni sistemici di RC
Cardiologica (specialistica)	Auscultazione cardiaca; Pressione arteriosa (4 arti); Ecocardiografia standard;	Ecocardiografia bidimensionale con color- doppler (valutazione dei flussi)	Dotto Arterioso Pervio, Stenosi polmonare, Difetti del setto, Stenosi arco aortico, difetti combinati
Audiologica (specialistica)	esame orecchio esterno; impedenziometria; OTAE o ABR monotonale;	ABR	Difetto uditivo sensoriale, centrale o misto
Oftalmologica (specialistica)	Esame diretto segmento anteriore; Fundoscopia;	Fundoscopia indiretta; Ecografia oculare e/o Retinogramma (obbligatorio in caso di opacità del vitreo)	Cataratta, glaucoma, retinopatia sale- pepe
Neurologica (specialistica)	Esame obiettivo neurologico; Ecografia cerebrale, se FA esplorabile; EEG;	Ecografia cerebrale esperta, se FA esplorabile TAC o RMN (casi sintomatici, anche non neurologici)	Difetti di tono, postura o riflessi; riscontro di anomalie strutturali o funzionali SNC

billo, mentre le IgG Rosolia specifiche restano negative o stabilmente basse. Inoltre, la percentuale di IgG1 non aumenta rapidamente e significativamente per effetto del richiamo.

Se si ricorre al test IB, in caso di RC si registreranno: 1. Rapida e intensa risposta E2; 2. Tardiva risposta E1 (che è quella protettiva, perché coinvolge anticorpi neutralizzanti il virus). In una piccola coorte con RC- sindrome è stato dimostrato uno sbilanciamento nella risposta all'antigene E1 rispetto a quella contro l'antigene E2, sia in IB che in test mitogenico in vitro. Comunemente, la risposta all'antigene E1 è prevalente rispetto a quella E2 (nella popolazione normale, l'antigene E2 in vivo è mascherato, attraverso un processo di glicosilazione). L'opposto accade nel paziente con RC, in cui è prevalente la risposta a E2. Lo sbilanciamento nella risposta E1/E2 nei casi di RC è stato attribuito alla ritardata clearance virale nei soggetti con infezione endouterina.

Sotto i 3 anni di età, la risposta cellulomediata al Rubivirus può essere dimostrata con tecnica di linfoproliferazione in vitro o in ELISPOT, anche in assenza di anticorpi IgG specifici.

### *Ile. Diagnosi Differenziale tra RC sindrome e RC infezione e Management a breve e a lungo termine*

La RC può coinvolgere qualsiasi organo o sistema. In effetti, gli organi che si stanno sviluppando al momento del passaggio diapla-centare del virus saranno quelli maggiormente danneggiati. Malformazioni a carico degli organi bersaglio primari (occhio, orecchio, cuore e capo) possono non essere patenti alla nascita. Esiste poi una costellazione di lesioni tardive, a carico potenzialmente di qualsiasi organo e apparato, che si manifestano alla o dopo la pubertà. La RC è per sua natura una malattia cronica potenzialmente evolutiva e a tutt'oggi non siamo in grado di prevedere quale complicanza si svilupperà e in quale paziente. Certamente, le complicanze sono più frequenti e serie nella forma a esordio sindromico. Se ne conclude che la piena definizione di gravità della forma (RC- sindrome o Infezione) è un processo complesso e continuo, che non si esaurisce alla nascita, ma si completa nel tempo, quasi indefinitamente.

L'allerta su una anamnesi di rash febbrile e/o contatto con un caso confermato di rosolia durante la gestazione e/o sieroconversione

(Rubeo- test IgG negativo a IgG positivo) è fondamentale per sospettare la diagnosi e attuare un adeguato piano di diagnosi e follow-up, specie nei neonati apparentemente asintomatici. In ospedale, va attuato il sistematico isolamento dei contatti nella fase diagnostica e poi fino a negatività di 2 test colturali o fino a compimento dei 12 mesi di vita, nei casi di RC confermata. Il soggiorno in strutture collettive (per esempio asili nido) va impedito e, in caso di ospedalizzazione, il lattante va isolato. Lo stato di protezione nel personale di sala va verificato e i soggetti suscettibili vaccinati.

La tempestività della diagnosi (e dell'isolamento) riduce le conseguenze della malattia nel bambino e nei familiari, attraverso la pronta istituzione di un appropriato programma di interventi, e blocca le possibilità di epidemia.

Al momento del ricovero per il parto è quindi opportuno verificare l'esecuzione del Rubeo-test in gestazione e registrarne i risultati rispetto alla settimana EG sui documenti clinici del neonato. La protezione indotta dal Rubivirus (sia ceppo selvaggio che vaccinale) è permanente, ma non assoluta. Una reinfezione (anche con trasmissione al feto, in caso di gravidanza) è possibile all'incirca nel 3-10% dei casi di malattia naturale e nel 14-18% dei casi di vaccinazione.<sup>41</sup> Se non v'è documentazione sullo stato di immunità/ suscettibilità della donna, il Rubeo-test andrebbe eseguito al ricovero per il parto, con la finalità di offrire la vaccinazione alle madri senza IgG specifiche.

Quando la gestante non è vaccinata e dovesse risultare Rubeo test negativa allo screening, l'eventuale riscontro di ritardo di crescita intrauterino e/o di anomalie a carico degli organi bersaglio della RC deve indirizzare il sospetto diagnostico di RC. In Tab. 3, sono elencate le procedure da affiancare a un accurato esame obiettivo e alle misure auxologiche (corrette per EG di nascita) per attuare la diagnosi differenziale tra RCI e RCS.

Purtroppo, al riscontro di una Pervietà del Dotto di Botallo o di Difetti isolati del Setto si attribuisce significato clinico corretto più spesso retroattivamente, posta l'alta incidenza di queste anomalie nella popolazione dei nati (specie pretermine e/o di basso peso alla nascita). La stenosi isolata dell'arteria polmonare (anche solo valvolare), per la sua rarità, ha un alto indice di associazione con la RC; perciò, la diagnosi di RC va sempre esclusa in questi casi.<sup>42</sup> Eventuali manifestazioni oculari a carico del segmento anteriore, quali catarat-

ta, movimenti pendolari dell'occhio, strabismo, lacrimazione, opacità corneali, micropupilla con incompleta risposta dilatativa ai farmaci midriatici, asimmetrie di volume dell'occhio (microftalmo o buftalmo) hanno maggiore probabilità di indurre al sospetto diagnostico di RC. La retinopatia "sale e pepe", quando rilevata all'esame fundoscopico attuato con qualsiasi altra indicazione, è fortemente indicativa di RC. La combinazione cataratta – cardiopatia ha un'ottima Likelihood ratio (LR), pari a 31.94, con elevata specificità (98.9%) e bassa frequenza di false positività (1.1%).<sup>37</sup> La cataratta però può non essere apprezzabile alla nascita.

La RC andrebbe sistematicamente esclusa nei bambini positivi allo screening audiologico, che è ormai pratica consolidata nella maggior parte delle Regioni italiane, specie se manca positività per ipoacusia familiare nell'anamnesi.<sup>43</sup> L'associazione cardiopatia – sordità neurosensoriale ha alta predittività positiva per la RC.<sup>22</sup>

Segni clinici, ma anche neuroradiologici, di compromissione del SNC rilevabili alla nascita (idrocefalia, microcefalia, fontanella pulsante, convulsioni, letargia/irritabilità, disturbi del movimento o della postura) sono drammatici segnali di allarme, purtroppo aspecifici. Come per la cardiopatia congenita, il danno neurologico è ricercato (e diagnosticato) esaustivamente soprattutto nei bambini che sono considerati a rischio. Eppure, il danno sul SNC è, con quello cardiovascolare, l'elemento critico per la qualità di vita del soggetto. Quando il danno neurologico è associato a manifestazioni sistemiche (IUGR, prematurità, epatosplenomegalia, porpora) la possibile natura infettiva è invece più scoperta.

Altre anomalie (congenite o no) descritte in associazione con la RC, alcune di tipo precoce (arresto della crescita, polmonite interstiziale, ipoplasia timica), altre di tipo tardivo (stenosi arteria renale con ipertensione arteriosa, anomalie di tipo relazionale, ipotonia, ritardo mentale, panencefalite progressiva, sordità tardiva, difetti endocrinologici) possono ricevere corretto inquadramento diagnostico solo se la diagnosi primaria di RC è già stata formulata.<sup>44</sup> L'allerta per la diagnosi di RC non deve escludere, specie quando storia clinica e sierologia non sono esaustivi, la diagnosi differenziale con altre infezioni congenite associate a esantema virale in gestazione (per esempio, CMV, B19, EBV), e/o caratterizzate da danno oculare, acustico e/o neurologico (CMV e toxoplasmosi congeniti).

Quando la diagnosi di RC sia stata confermata in laboratorio (o non sia stata smentita dalla scomparsa delle IgG al Rubeo-test dopo i 6 mesi di vita) il follow up a lungo termine coinvolge sia gli organi bersaglio colpiti che potenziali manifestazioni e complicanze tardive. In particolare, due sono le complicanze temute: 1. polmonite interstiziale, potenzialmente fatale, che può richiedere tempestivo trattamento ventilatorio in terapia intensiva; 2. trombocitopenia grave, in cui può essere proposto il trattamento con IgG endovena. Vanno altresì periodicamente esclusi: a. anomalie di tono e trofismo muscolare; b. disturbi della postura e dell'equilibrio; c. ritardi nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo; d. ipotiroidismo; e. diabete; f. ipertensione (renale e/o arteriosa); g. tumori. Controlli prima semestrali e poi annuali debbono includere l'esame specialistico audiologico e oftalmologico, almeno fino all'età scolare, quando è più facile che il bambino denunci la comparsa di manifestazioni tar-

dive. Nei casi con anomalie cardiache non corretti chirurgicamente va attuato un monitoraggio personalizzato su segni di insufficienza cardiaca congestizia.

Nella sorveglianza vanno coinvolti il pediatra di famiglia e i familiari del bambino, in una sorta di triangolazione centro clinico di riferimento- pediatra di famiglia- familiari. I familiari vanno supportati affinché possano riconoscere modificazioni nel comportamento del paziente che rappresentano i prodromi di complicanze serie. Eccessiva sudorazione, improvviso aumento di frequenza e volume delle minzioni, perdita di peso, irritabilità, insonnia, vomito, dolore addominale e/o disidratazione possono denunciare l'insorgenza del diabete. Intolleranza al caldo e al freddo, modifiche nella frequenza cardiaca, perdita o incremento improvviso di peso, letargia, debolezza, sudorazione, cute secca, modificazioni nel timbro della voce possono denunciare anomalie della tiroide. Formazione specifica e coinvolgimento del PdF nella definizione a lungo termine di severità della forma (co- management), educazione della famiglia alla sorveglianza e all'automedicazione, supporti di natura psicosociale come completamento delle azioni del centro clinico di riferimento (regionale o sovra-regionale) sono indispensabili per garantire adeguatezza di cure mediche, chirurgiche e riabilitative, nonché occupazionali, con contenimento delle risorse impiegate.

## Ringraziamenti

Si ringraziano per i loro critici commenti i proff. G. Auletta e E. Marciano (audiologi pediatrici), P. Vassallo e A. Magli (oftalmologi pediatrici), V. Farina (cardiologo pediatra), C. Bravacci (neuropsichiatra infantile), G. Portella (virologo).

## Referenze

- 1 World Health Organization European Regional Office, Strategic plan for measles and congenital rubella infection in the European Region of WHO. 2003, WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, Denmark.
- 2 World Health Organization European Regional Office, Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region strategic plan 2005- 2010, 2005, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- 3 Regional Committee for Europe 60th Session, Resolution: Renewed commitment to elimination of measles and rubella and prevention of congenital rubella syndrome by 2015 and sustained support for polio-free status in the WHO European Region. Moscow, 13-16 September 2010, 2010.
- 4 Piano Nazionale per l'Eliminazione del Morbillo e della rosolia congenita 2003-2007 (disponibile: <http://www.governo.it/backoffice/allegati/20894-1712.pdf>).
- 5 Piano Nazionale per l'Eliminazione del Morbillo e della Rosolia congenita (PNEMoRc) 2010- 2015 (disponibile: [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1519\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1519_allegato.pdf)).
- 6 Filia A, Rota MC, Del Manso M, D'Ancona P, Giambi C, Ranghiasi A, Salmaso S, Iannazzo S, Pompa MG, Declich S e Gruppo di Lavoro sul Piano nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita. Piano nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita: indagine sullo stato di avanzamento (2009). Rapporti ISTISAN 10/45.

- 7 Ciofi degli Atti M, Filia A, Revello MG, Buffolano W, Salmaso S. Rubella control in Italy. *Euro Surveill* 2004; 9: 19-21.
- 8 Buffolano W, Agnese M, Pizzuti R, RePuNaRC. Secular trend on congenital infections: insights from Campania region register for perinatal infection, southern Italy. *J Maternal Fetal Neon Medicine* 2011; 24: 94-96.
- 9 Buffolano W, Stronati M, Macagno F. Procedure operative standard per la diagnosi e la gestione clinica dei casi di rosolia congenita. *Ped Med Chir* 2004; 26: 9-18.
- 10 Cooper LZ, Ziring PR, Ockerse AB, Fedun BA, Kiely B, Krugman S. Rubella. Clinical manifestations and management. *Am J Dis Child* 1969; 118: 18-29.
- 11 Banatvala JE & Brown DW. Rubella. *Lancet* 2004;363:1127-1137.
- 12 Best JM, Enders G. Laboratory diagnosis of rubella and congenital rubella. In: Jangu Banatvala & Catherine Peckham Eds. *Rubella Virus*, Elsevier 2007, Cap. 3, pp 1127- 1137.
- 13 Thomas HIJ, Barrett E, Hesketh LM, Wynne A, Morgan-Capner P. Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J Clin Virol* 1999; 14: 107-118.
- 14 Herne V, Hedman K, Reedik P. Immunoglobulin G avidity in the serodiagnosis of congenital rubella syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 763-766.
- 15 Mubareka S, Richards H, Gray M, Tipples GA. Evaluation of commercial rubella immunoglobulin G avidity assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 231-233.
- 16 Nedeljkovic J, Jovanovic T, Mladjenovic S, Hedman K, Peitsaro N, Oker-Blom C. Immunoblot analysis of natural and vaccine-induced IgG responses to rubella virus proteins expressed in insect cells. *J Clin Virol* 1999; 14: 119-131.
- 17 Hofmann J, Liebert UG. Significance of avidity and immunoblot analysis for rubella IgM- positive serum samples in pregnant women. *J Virol Methods* 2005; 130: 66-71.
- 18 Cherry JD. Frequency and main characteristics of clinical findings in congenital rubella infection. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1992:1804-1805.
- 19 Tardieu M, Grosperriere B, Durandy A, Gariscelli C. Circulatory immune complexes containing rubella antigens in late-onset rubella syndrome. *J Pediatr* 1980;97:370-373.
- 20 Bagna R, Bertino E, Rovelli I, Peila C, Giuliani F, Occhi L, Mensa M, Mazzone R, Saracco P, Fabris C. Benign transient blueberry muffin baby. *Minerva Pediatr* 2010; 62: 323-327.
- 21 Menser MA, Forrest JM. Rubella-high incidence of defects in children considered normal at birth. *Med J Aust* 1974; 1: 123-126.
- 22 Reef SE, Plotkin S, Cordero JF, Katz M, Cooper L, Schwartz B, Zimmerman-Swain L, Danovaro-Holliday MC, Wharton M. Preparing for congenital rubella syndrome elimination: summary of the Workshop on Congenital Rubella Syndrome Elimination in the United States. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 85-95.
- 23 Liu Y, Guo J, Zhao RF, Wang L. Unilateral pulmonary artery stenosis and late-onset cataract in an adult: a case of suspected congenital rubella syndrome. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125: 549-551.
- 24 Wang LK, Kanzal S, Pulido JS. Photodynamic therapy for the treatment of choroidal neovascularisation secondary to rubella retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 790-792.
- 25 Williams LL, Shannon BT, Leguire LE, Fillman R. Persistently altered T cell immunity in high school students with the congenital rubella syndrome and profound hearing loss. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 831-835.
- 26 Viskari H, Paronen J, Keskinen P, Simell S, Zawilinska IB, Zgorniak-Nowosielska I, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Haapala AM, Knip M, Hyoty H. Humoral B-cell autoimmunity is rare in patients with the congenital rubella syndrome. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 378-383.
- 27 Chess S. Behavior and learning of school-age Rubella children. Congenital rubella behavior studies (CRBS) final report. Project no. MC-R-360188-03-0, National Institute of Health, December 31, 1974.
- 28 Forrest JM, Turnbull FM, Sholler GF, Hawker RE, Martin FJ, Doran TT, Burgess MA. Gregg's congenital rubella patients 60 years later. *Med J Aust* 2002; 177: 664-667.
- 29 Brown AS, Cohen P, Greenwald S, Susser E. Nonaffective psychosis after prenatal exposure to rubella. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 438-443.
- 30 Plotkin S, Reef S. Rubella Vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P eds. *Vaccines*, 5th ed. Philadelphia Saunders, 2008, pp 467-517.
- 31 McIntosh ED, Menser MA. A fifty-year follow-up of congenital rubella. *Lancet* 1992; 340: 414- 415.
- 32 Forrest JM,Turnbull FM, Sholler GF, Hawker RE,Martin FJ, Doran TT, Burgess MA. Gregg's congenital rubella patients 60 years later. *MJA* 2002; 177: 664-667.
- 33 Menser MA, Dods L, Harley JD. A twenty-five year follow-up of congenital rubella. *Lancet* 1967; 2: 1347-1350.
- 34 Robertson SE, Featherston DA, Jacic- Dobo M, Henser BS. Rubella and congenital rubella syndrome: global update. *Rev Panam Saud Publica* 2003; 14: 306-315.
- 35 Miller E, Cradock-Watson JE, Pollock TM. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet* 1982; 2: 781-784.
- 36 Peckham CS. Clinical and laboratory study of children exposed in utero to maternal rubella. *Arch Dis Child* 1972; 47: 571-574.
- 37 Rittler M, Lopez- Camelo J, Castilla EE. Monitoring Congenital Rubella Embriopathy. *Birth Defect Res* 2004;70: 939-943.
- 38 Thomas HI, Barrett E, Hesketh LM, Wynne A, Morgan-Capner P 1999. Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J Clin Virol*. 14:107-18.
- 39 Cooper LZ, Krugman S. Clinical manifestations of postnatal and congenital rubella. *Arch Ophthalmol*. 1967;77(4):434-439.
- 40 Cooper LZ, Florman AL, Ziring PR. Loss of rubella haemagglutination-inhibition antibody in congenital rubella. *Am J Dis Child* 1971; 122: 397-401.
- 41 Bullens D, Smets K, Vanhaesebrouck P. Congenital rubella syndrome after maternal reinfection. *Clin Pediatr (Phila)* 2000;39:113-116.
- 42 Oster ME, Riehle-Colarusso T, Correa A. An update on cardiovascular malformations in congenital rubella syndrome. *Birth Defects Res & Clin Mol Teratol*. 2010;88:1-8.
- 43 De Leenheer EMR, Janssens S, Padalko E, Loose D, Leroy BP, Dhooge IJ. Etiological diagnosis in the hearing impaired newborn: Proposal of a flow chart. *Int J Pediatr Otorinolaryngol* 2011;75:27-32.
- 44 Franklin SL, Kelly R. Congenital Rubella and Interstitial Pneumonitis. *Clin Pediatr* 2001;40:101-103.