

Revisione del percorso diagnostico dell'infezione da Parvovirus B19 in gravidanza

Referente:

*Maurizio Zavattoni AMCLI SC Microbiologia e Virologia IRCCS Policlinico San Matteo Pavia
m.zavattoni@smatteo.pv.it*

Con la collaborazione di Francesca Cervi SIGO Università di Bologna, Giuliana Simonazzi SIGO Università di Bologna, Brunella Guerra SIGO Università di Bologna, Marcello Lanari SIN AUSL Imola, Cristina Giraldi AMCLI AO Annunziata Cosenza, Valeria Meroni AMCLI IRCCS Policlinico San Matteo Pavia

1. EZIOPATOGENESI, ASPETTI CLINICI ED EPIDEMIOLOGIA

I Parvovirus sono virus a DNA molto piccoli e sprovvisti di pericapside. Ad oggi, sono due le specie virali note, il Parvovirus B19 (B19V) ed il Bocavirus umano (HBoV), considerate patogene per l'uomo. Parvus in latino significa piccolo e infatti il B19V ha un diametro di 20-28 nm con all'interno un filamento di DNA a singola elica costituito da circa 5000-6000 nucleotidi. B19V appartiene al genere Erythrovirus in ragione del suo tropismo elettivo per le cellule della serie rossa. Poiché sprovvisto di un rivestimento esterno lipico, le particelle di B19V sono molto resistenti ai comuni trattamenti denaturanti, tipo etanolo, isopropanolo, calore secco e pastorizzazione.

Il capside virale ha una struttura icosaedrica costituita da due proteine strutturali, VP1 (82kDa) e VP2 (58kDa), identiche tra loro fatta eccezione per un frammento di 227 aminoacidi nella porzione N-terminale di VP1, la cosiddetta "regione unica VP1 (VP1u)". VP2 è la principale proteina strutturale (95% della particella virale), mentre VP1 è incorporata nella struttura capsidica con la regione unica VP1 espressa sulla superficie esterna del virus. Queste proteine hanno un ruolo importante nell'indurre la risposta anticorpale virus-specifica. Pertanto, è fondamentale conoscere quali proteine sono utilizzate nei test sierologici in uso ed il loro differente significato diagnostico. Poiché B19V non si replica nelle colture cellulari convenzionali, proteine VP1 e VP2 vengono prodotte in cellule di mammiferi, insetti e lieviti e assemblate a costituire epitopi lineari (VP1/2-L) o conformazionali (VP1/2-C). La proteina VP2 media il legame tra il virus ed un recettore cellulare (antigene P), chiamato globoside, localizzato sulla superficie delle cellule progenitrici dei globuli rossi, da cui l'attività emolitica esercitata dal virus.

Oltre alle due proteine strutturali, B19V è costituito da una terza proteina non strutturale (NS1). NS1 (77kDa) è una proteina multifunzione, tra cui si distinguono il controllo e l'espressività di TNF- α e IL-6, e l'attività citotossica svolta dal virus mediante blocco del ciclo cellulare ed il fenomeno della apoptosi.

B19V è diffuso in tutto il mondo ed ha come unico ospite l'uomo. La siero-prevalenza è direttamente proporzionale all'età (circa 15% in età prescolare e fino a 85% nella popolazione anziana). Si stima che le donne in gravidanza presentino uno stato di recettività tra il 34 e il 65%, con un'incidenza di sierconversione attorno all'1.5% nella stagione endemica (primavera) e picchi fino al 13.5% nei periodi epidemici, che intercorrono ogni 3-4 anni.

Se ne conoscono tre distinti genotipi. Il genotipo 1 è quello più comune ed è il più diffuso. Il genotipo 2 è stato identificato in biopsie da soggetti nati prima del 1970 e, più raramente, nel midollo osseo, fattori della coagulazione, e sangue. Il genotipo 3 è presente soprattutto in paesi

dell'Africa occidentale e, occasionalmente, anche in Francia e America del Nord e del Sud. Il grado di cross-reattività sierologica nei confronti delle proteine VP1 e VP2 dei tre differenti genotipi è molto elevato. Non sono stati osservati quadri clinici peculiari relativi ad un particolare genotipo (8, 11).

Durante la fase acuta di infezione (approssimativamente 1 settimana dal contagio), il DNA virale è presente nel sangue periferico in quantità molto elevata (10^{11} - 10^{13} copie/ml), mentre gli anticorpi IgG e IgM sono assenti. Alla comparsa dei sintomi (dopo circa 10 giorni dall'infezione) cominciano a positivizzarsi le IgM specifiche, cui fa seguito dopo alcuni giorni (a 13-18 giorni dal contagio) la produzione delle IgG specifiche. Le IgM durano 1-3 mesi (talvolta anche più a lungo) e poi si negativizzano, mentre le IgG permangono per tutta la vita. La viremia può persistere a lungo, talvolta anche mesi, specie nella gestante soggetta ad uno stato di immunodepressione fisiologica. Questa condizione fa sì che in gravidanza l'infezione da B19V assuma tutte le caratteristiche di una infezione persistente. (Fig 1)

2. MANAGEMENT IN GRAVIDANZA

Il Decreto Ministeriale DPR 245 del 10.09.1998 attualmente in vigore, non prevede la partecipazione del SSN ai costi delle prestazioni specialistiche riferibili all'infezione da B19 da eseguire prima e durante la gravidanza.

Le linee guida sulla gravidanza fisiologica pubblicate nel novembre 2010 e revisionate a settembre 2011 (Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità e CeVEAS), non prendono in considerazione l'esecuzione delle indagini di screening in epoca preconcezionale o in gravidanza.

Tuttavia esistono situazioni a rischio in cui può essere indicata l'esecuzione dell'indagine sulla madre al fine di permettere una gestione consapevole della gravidanza complicata dall'infezione, quali:

- anomalie ecografiche suggestive di infezione fetale,
- contatti stretti con individui infetti,
- segni/sintomi suggestivi di malattia materna.

MISURE DI PREVENZIONE

Ad oggi non sono disponibili vaccini per l'immunizzazione attiva della donna in età fertile, né farmaci antivirali di provata efficacia per la prevenzione dell'infezione fetale.

La prevenzione dell'infezione nella gravida è limitata dalla trasmissione del virus per via aerea. Le uniche raccomandazioni in merito [CDC] suggeriscono il frequente e accurato lavaggio delle mani come unica strategia di prevenzione.

DIAGNOSI DI INFEZIONE DA B19V NELLA MADRE

Durante la fase acuta di infezione, un numero estremamente elevato di particelle virali è presente nel sangue materno. Questo aspetto può influenzare la risposta IgG e IgM virus-specifica e dare dei falsi negativi dovuti alla formazione di immunocomplessi. Pertanto, quando i test sierologici sono negativi e la clinica è fortemente suggestiva per una infezione acuta da B19V (o c'è stato un contatto recente con un soggetto infetto) è sempre opportuno associare anche la ricerca del DNA

virale nel sangue periferico della gestante, e ripetere il controllo sierologico dopo 2-3 settimane. Oggi sono molti i test sierologici ELISA o western-blot disponibili in commercio per la ricerca delle IgG e delle IgM virus-specifiche. È innanzitutto importante verificare che i test ELISA o western blot impiegati prevedano l'utilizzo di antigeni VP1/VP2 sia lineari che conformazionali, dal momento che una larga parte della risposta sia IgG che IgM è diretta nei confronti di epitopi conformazionali. IgM anti-VP1/VP2 cominciano a positivizzarsi dopo 10 giorni dal contagio, in concomitanza con elevati livelli di DNA virale nel sangue. IgG anti-VP1/VP2 si positivizzano alcuni giorni dopo, e la simultanea presenza di IgG e IgM in associazione a livelli decrescenti di DNA caratterizza la fase di convalescenza. Durante i 6 mesi successivi, la gestante produce IgG anti-VP2 dirette contro epitopi lineari. Lo stato di infezione remota e di immunità è definito dalla presenza di IgG anti-VP1/VP2 e IgM virus-specifiche negative. Falsi-negativi B19V IgM (con IgG specifiche negative) possono aversi in fase acuta di infezione con livelli molto elevati di particelle virali circolanti (10^7 - 10^{12} copie/ml), ma anche con livelli più contenuti di DNA, in una fase molto precoce. Inoltre, in fase convalescente (talvolta anche entro i tre mesi dall'infezione), IgM negative possono essere associate a bassi livelli di viremia (10^3 - 10^4 copie/ml). Al contrario, falsi-positivi B19V IgM possono riscontrarsi in test IgM a "cattura" che utilizzano antigeni VLPs biotinilati, a causa della presenza nel 2% circa di soggetti adulti di IgM anti-biotina. B19V IgM non-specifiche possono essere presenti in corso di altre infezioni (rosolia, EBV, CMV, sifilide, Toxo) o in presenza di anticorpi anti-nucleo o di fattore reumatoide in test di tipo "indiretto". Un altro fenomeno noto di risposta anomala è quello delle cosiddette IgM "persistenti", cioè IgM specifiche che persistono a lungo, anche oltre la gravidanza e, talvolta, per anni. La loro interpretazione è risolutiva (IgM persistenti o IgM in fase convalescente?) poiché il rischio di idrope fetale è ristretto alle prime 12 settimane dall'infezione e questo condiziona evidentemente il counselling ed il timing del monitoraggio ecografico (6). In tal senso, dirimente è il follow-up sierologico volto a testare in parallelo i sieri sequenziali. A causa di questi aspetti immunologici imprevedibili, la ricerca del DNA virale nel sangue materno è altamente raccomandata per risolvere risposte anticorpali non chiare. A questo proposito, va opportunamente segnalato che al momento in cui si rileva l'idrope o la morte fetale intrauterina le IgM materne potrebbero già essersi negativizzate e quindi è imprescindibile eseguire sempre la ricerca del DNA virale nel sangue materno prima di eseguire una procedura invasiva per accertare una possibile infezione del feto (2, 14).

La rilevazione e la cinetica della DNAemia materna consentono non solo di diagnosticare l'infezione da B19V ma anche di esprimere una valutazione pur approssimativa sull'epoca di infezione in gravidanza. Una PCR negativa per B19V DNA nel sangue periferico della gestante consente di escludere una infezione negli ultimi 3 mesi. Un viral load $>10^5$ /ml nel plasma o nel siero definisce una infezione acuta (primo/secondo mese di infezione). Per cariche $<10^4$ copie/ml che possono essere evidenziate fino a 6 mesi dall'infezione è possibile ricorrere ad una sierologia avanzata (test di avidità IgG e risposta IgG epitopo-specifica) (6).

3. MANAGEMENT DEL FETO

Il rischio di trasmissione verticale si attesta attorno al 40% (33-50%). Il virus non è probabilmente teratogeno, la letteratura generale non riconosce un aumento significativo delle malformazioni congenite rispetto alla popolazione in generale.

Il rischio di complicanze fetali è circa il 10% e possono manifestarsi attraverso morte fetale, idrope, anemia, ipoalbuminemia, epatite, miocardite e placentite (10). Per quanto riguarda la perdita fetale, il rischio di aborto è maggiore (19%) nel primo trimestre e diminuisce gradualmente con l'avanzare dell'epoca gestazionale fino al rischio del 6% di morte fetale endouterina se l'infezione viene acquisita nel 3^o trimestre (9).

Il rischio di idrope, definita come accumulo di liquidi in almeno 2 compartimenti fetali, è maggiore nel 2^o trimestre (3.9%), in particolare se l'infezione materna intercorre prima della 20^a settimana (7.1%)(5). Tale complicanza deriva dall'aumentato rischio di anemia fetale che si può sviluppare tra la 17^a e la 24^a settimana, dovuta all'alta espressione dell'antigene P sugli eritroblasti fetali, dall'aumentata domanda eritropoietica per la crescita fetale e dalla concomitante riduzione della vita media degli eritrociti del secondo trimestre. L'insorgenza di idrope può essere inoltre favorita dal deficit di produzione delle proteine di provenienza epatica derivante dall'aumentata richiesta di eritropoiesi extramidollare e dal danno diretto a miocardiociti che può dar luogo ad aritmie e insufficienza cardiaca. L'idrope può instaurarsi da 2-6 settimane dopo l'infezione materna.

Il virus possiede inoltre tropismo anche per gli enterociti fetali, che una volta infettati possono essere danneggiati, portando a lisi della parete intestinale con conseguenti perforazioni e dispersione di meconio intraperitoneale, causa di peritonite chimica (15).

DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

Diagnosi di B19V nel feto

La amniocentesi non è generalmente indicata. Tuttavia, in caso sia necessario ricorrere alla trasfusione in utero a seguito del riscontro di grave anemia/idrope, il sangue fetale può essere preventivamente raccolto ed esaminato per la ricerca del DNA virale e delle IgM specifiche. In associazione, anche il liquido amniotico può essere prelevato per la diagnosi. Sia nel sangue fetale che nel liquido amniotico particelle virali sono presenti in quantità molto elevata (>10⁶ copie DNA/ml). Al contrario, la sensibilità delle IgM prodotte nel feto è molto bassa. Entrambi i test, se positivi, permettono di confermare l'infezione fetale da B19V (1, 7). Tuttavia, basse quantità (10²-10⁴ copie/ml) di DNA virale nel sangue fetale devono essere interpretate con cautela, a causa della possibile contaminazione con il sangue materno (o come espressione di infezione fetale molto recente). Inoltre, va tenuto presente che, in presenza di IgG specifiche nel sangue fetale, il titolo della DNAemia fetale è inversamente correlato al titolo anticorpale (4, 12, 13).

MONITORAGGIO ECOGRAFICO

Lo studio ultrasonografico del feto può rilevare la presenza di segni aspecifici di infezione fetali, quali: aumento della traslucenza nucale o inversione del flusso di sangue nel dotto venoso nel primo trimestre, edema sottocutaneo, versamento pleurico e/o pericardico, ascite, presenza di idrope generalizzata. A tali segni possono associarsi edema placentare, cardiomegalia, peritonite da meconio, calcificazioni epatiche o intestinali, fino al riscontro di morte fetale in utero.

Studi riguardanti la circolazione fetale hanno dimostrato che la velocità del flusso sanguigno nel distretto cerebrale aumenta in corso di anemia, a causa dell'aumentato output cardiaco ed il decremento della viscosità ematica. Ad oggi la valutazione della velocimetria Doppler dell'Arteria Cerebrale Media (ACM), permette di correlare la velocità massima di picco sistolico (VPS) alla concentrazione di emoglobina fetale stimata con buona affidabilità nei feti di età gestazionale superiore alla 18^a settimana. Qualora la VPS campionata sia superiore a 1.5 MoM lo studio permette di identificare con sensibilità del 100% la presenza di anemia fetale significativa, permettendo quindi l'individuazione dei feti a rischio di sviluppare idrope e ponendo indicazione a procedure terapeutiche invasive (3).

La maggior parte degli studi pubblicati non descrivono significativa anemia oltre le 12 settimane dal contagio materno, tuttavia alcuni autori descrivono anomalie ecografiche fino a 20 settimane dopo il contagio. Pare pertanto ragionevole raccomandare stretto monitoraggio ecografico seriato (comprensivo della valutazione del PVS dell'ACM) dal momento della diagnosi materna fino ad almeno 10-12 settimane dopo il contagio materno.

TRASFUSIONE INTRAUTERINA

L'idrope fetale da B19 può risolversi spontaneamente o portare a morte fetale. La procedura di trasfusione fetale intrauterina, ha dimostrato la possibilità di outcome favorevole e prevenzione della morte fetale (16). In caso di severa anemia fetale dopo la 18^a settimana di gestazione, può essere presa in considerazione l'opportunità di praticare tale procedura, presso centri di riferimento con adeguata esperienza e training degli operatori.

Attualmente la procedura a minor rischio prevede la puntura della vena ombelicale, nella sua porzione funicolare, permettendo dapprima la determinazione di ematocrito ed emoglobina fetali e quindi l'adeguato volume ematico da trasfondere. Le condizioni fetali devono essere strettamente monitorizzate in corso di procedura e nei giorni successivi, e può rendersi necessaria la ripetizione della procedura nei casi a maggiore severità.

La donna deve essere informata del rischio fetale legato alla procedura invasiva ed alle sue eventuali complicanze (es. bradicardia fetale, parto pretermine, sanguinamento dal cordone, dati limitati riguardo la possibilità di sequele neurologiche a lungo termine, ecc.).

I rischi legati alla procedura devono essere valutati alla luce dell'epoca gestazionale raggiunta e, nelle epoche tardive di gestazione, deve essere presa in considerazione l'eventuale anticipazione del parto.

4. MANAGEMENT DEL NEONATO

Diagnosi di B19V nel neonato

Salvo nei neonati sintomatici (con anemia e reticolocitopenia) l'infezione congenita da B19V alla nascita resta spesso misconosciuta, sia perché l'infezione in gravidanza decorre nella maggior parte dei casi in forma asintomatica, sia perché l'infezione fetale si risolve spontaneamente in utero e non è associata a *sequelae* tardive. Tuttavia, la ricerca di B19V DNA e delle IgM specifiche andrebbe

eseguita in tutti i neonati la cui madre abbia una diagnosi clinica o di laboratorio di infezione da B19V in gravidanza, ed in tutti i casi in cui è stata eseguita una diagnosi prenatale per B19V, sia con esito positivo che negativo. La diagnosi retrospettiva si basa sulla persistenza delle IgG oltre i 9-11 mesi di vita, ma è spesso difficoltosa, tenuto conto che la sieroprevalenza per B19V a 3-6 anni è già del 30-50%.

Va comunque segnalato che la sensibilità sia delle IgM che del DNA alla nascita è influenzata dall'epoca di infezione in gravidanza. Nelle infezioni materne acquisite ≤ 12 settimane, a 13-20, e >20 settimane di gestazione le IgM sono positive alla nascita nel 0%, 0%, e 25% dei casi, rispettivamente; invece, il DNA virale alla nascita è presente nel 2%, 9%, e 37% dei casi, rispettivamente. Quindi, un risultato negativo alla nascita non consente di escludere l'infezione congenita da B19V, e ci deve affidare alla persistenza delle IgG a $>8-18$ mesi di vita (Enders M., ESCV 2015, dati personali).

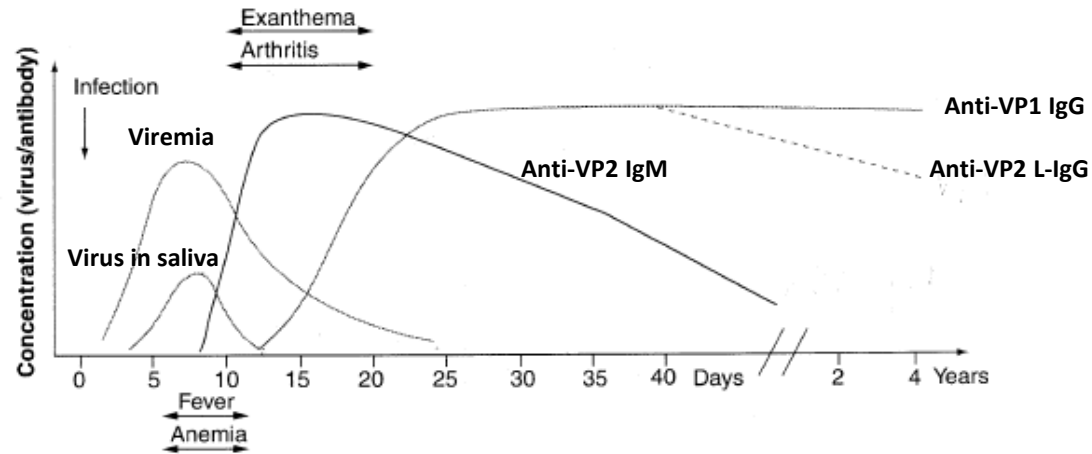
REFERENZE

1. BONVICINI F., MANARESI E., GALLINELLA G., GENTILOMI G.A., MUSIANI M., ZERBINI M. (2009). Diagnosis of fetal parvovirus B19 infection: value of virological assays in fetal specimens. *BJOG*. 116, 813-817.
2. BONVICINI F., PUCETTI C., SALFI N.C., GUERRA B., GALLINELLA G., RIZZO N., ZERBINI M. (2011). Gestational and fetal outcomes in B19 maternal infection: a problem of diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3514-3518.
3. COSMI E., MARI G., DELLE CHIAIE L., DETTI L., AKIYAMA M., MURPHY J., STEFOS T., FERGUSON J.E. 2nd, HUNTER D., HSU C.D., ABUHAMAD A., BAHADO-SINGH R. (2002). Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia resulting from parvovirus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187, 1290-1293.
4. DE HAAN T.R., BEERSMA M.F., OEPKES D., DE JONG E.P., KROES A.C., WALTHER F.J. (2007). Parvovirus B19 infection in pregnancy: maternal and fetal viral load measurements related to clinical parameters. *Prenat. Diagn.* 27, 46-50.
5. ENDERS M., WEIDNER A., ZOELLNER I., SEARLE K., ENDERS G. (2004). Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat. Diagn.* 24, 513-518.
6. ENDERS M., SCHALASTA G., BAISCH C., WEIDNER A., PUKKILA L., KAIKKONEN L., LANKINEN H., HEDMAN L., SÖDERLUND-VENERMO M., HEDMAN K. (2006). Human parvovirus B19 infection during pregnancy--value of modern molecular and serological diagnostics. *J. Clin. Virol.* 35, 400-406.

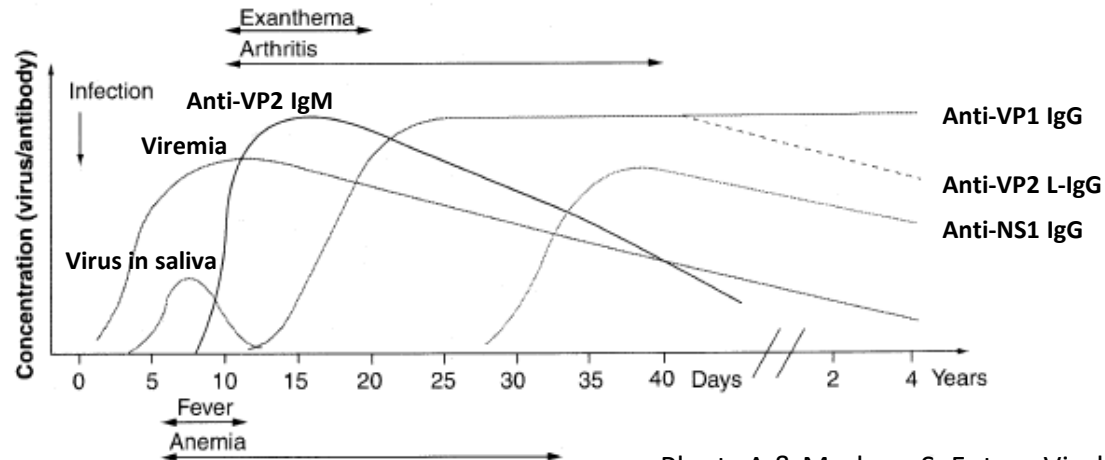
7. ENDERS M., WEIDNER A., ROSENTHAL T., BAISCH C., HEDMAN L., SÖDERLUND-VENERMO M., HEDMAN K. (2008). Improved diagnosis of gestational parvovirus B19 infection at the time of nonimmune fetal hydrops. *J. Infect. Dis.* 197, 58-62.
8. GALLINELLA G., VENTUROLI S., MANARESI E., MUSIANI M., ZERBINI M. (2003). B19 virus genome diversity: epidemiological and clinical correlations. *J. Clin. Virol.* 28, 1-13.
9. NORBECK O., PAPADOGIANNAKIS N., PETERSSON K., HIRBOD T., BROLIDEN K., TOLFVENSTAM T. (2002). Revised clinical presentation of parvovirus B19-associated intrauterine fetal death. *Clin. Infect. Dis.* 35, 1032- 1038.
10. PUC CETTI C., CONTOLI M., BONVICINI F., CERVI F., SIMONAZZI G., GALLINELLA G., MURANO P., FARINA A., GUERRA B., ZERBINI M., RIZZO N. (2012). Parvovirus B19 in pregnancy: possible consequences of vertical transmission. *Prenat. Diagn.* 32, 897-902.
11. SERVANT A., LAPERCHÉ S., LALLEMAND F., MARINHO V., DE SAINT MAUR G., MERITET J.F., GARBARG-CHENON A. (2002). Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol.* 76, 9124-9134.
12. SIMISTER N.E. (2003). Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine.* 21, 3365-3369.
13. WEIFFENBACH J., BALD R., GLONING K.P., MINDERER S., GÄRTNER B.C., WEIDNER A., HANKE M., ENDERS M. (2012). Serological and virological analysis of maternal and fetal blood samples in prenatal human parvovirus b19 infection. *J. Infect. Dis.* 205, 782-788.
14. ZAVATTONI M., PAOLUCCI S., SARASINI A., TASSIS B., RUSTICO M., QUARENGHI A., PIRALLA A., BALDANTI F. (2016). Diagnostic and prognostic value of molecular and serological investigation of human parvovirus B19 infection during pregnancy. *New Microbiol.* 2016 Jul;39(3):181-185.
15. ZERBINI M., GENTILOMI G.A., GALLINELLA G., MORANDI R., CALVI S., GUERRA B., MUSIANI M. (1998). Intra-uterine parvovirus B19 infection and meconium peritonitis. *Prenat. Diagn.* 18, 599-606.
16. VON KAISENBERG CS1, JONAT W. Fetal parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001 Sep;18(3):280-8.

Decorso dell'infezione da B19V

A Infezione acuta e remota con clearance del virus dal sangue



B Infezione persistente, come in gravidanza



Rischio Materno

Esposizione a B19V/contatto intra-familiare/rischio lavorativo

Sierologia materna

IgG +
IgM -

IgG -
IgM +

IgG +
IgM +

IgG -
IgM -

Immune

? Infezione recente ?

Suscettibile

DNA nel sangue
+
IgG and IgM 2-4 settimane dopo

DNA pos
+
Cinetica IgG e IgM

DNA neg
+
IgG e IgM neg

Infezione Acuta/Recente

Rischio fetale

NO

SI

NO

< 9 settimane E.G.

9-20 settimane E.G.

> 20 settimane E.G.

Morte fetale
intrauterina
14.3%

Anemia severa/Idrope
(4.9%)

Basso rischio
(0.5%)

Valutazione
prospettica

Sangue Fetale
(solo se trasfusione intrauterina)

DNA/ IgM ?

Monitoraggio ecografico
+
doppler arteria cerebrale
media per 12 settimane

Liquido amniotico

DNA

Monitoraggio ecografico
+
doppler arteria cerebrale
media per 12 settimane

Sangue Materno

IgG/IgM/DNA