

# Procedure operative standard per la diagnosi e la gestione clinica dei casi di rosolia congenita

Standard Procedures for the diagnosis and management of cases of congenital rubella

Buffolano W.<sup>^</sup>, Stronati M.<sup>∞</sup>, Macagno F.\*

Key words: rosolia congenita, sindrome rosolia congenita, management rosolia congenita.

## Introduzione

Gli esiti della infezione da rosolia acquisita in epoca prenatale (rosolia congenita; RC) sono causa importante di danno neurosensoriale e altre disabilità di origine congenita. Grazie all'uso esteso della vaccinazione, molti Paesi sono ormai vicini all'obiettivo dell'eliminazione della RC<sup>1-4</sup>, che viene definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come la riduzione di incidenza della Sindrome da Rosolia Congenita (s-RC), a valori inferiori a 1 caso ogni 100.000 nati vivi<sup>4</sup>. In Europa, tale obiettivo è previsto per il 2010<sup>1</sup>.

Per prevenire l'infezione rubeolica in gravidanza sono state adottate differenti strategie vaccinali, che prevedevano: a) la vaccinazione universale dei bambini nell'infanzia; b) la vaccinazione delle donne in età fertile e/o delle ragazze adolescenti (vaccinazione selettiva); c) una combinazione delle due strategie<sup>2</sup>. La vaccinazione universale dei bambini ha l'obiettivo di ridurre la circolazione del virus e offrire così protezione indiretta a tutte le donne che affrontano una gravidanza (fenomeno della herd immunity). Si è visto però che la vaccinazione dei soli bambini, se non vengono raggiunte e mantenute coperture alte, può determinare un aumento dei casi di RC. Infatti, qualora la copertura vaccinale sia insufficiente, la malattia continua a circolare nella popolazione suscettibile e si trasmette più facilmente nelle età in cui essi sono maggiormente rappresentati. Si verifica dunque uno spostamento verso l'alto dell'età in cui si contrae l'infezione,

col risultato di aumentare il rischio di rosolia nel periodo dell'età fertile, che si intendeva invece proteggere<sup>5,6</sup>. La vaccinazione selettiva delle adolescenti e delle donne in età fertile ovviamente lascia libera la circolazione del virus nella popolazione di genere maschile. Ne consegue che possono contrarre la rosolia in gravidanza tutte le donne gravide in precedenza sfuggite alla vaccinazione o comunque vaccinate con una risposta immunitaria non sufficientemente protettiva. In questo senso la strategia può risultare iniqua, cioè privilegiare le classi culturalmente e socialmente elevate, che vengono più facilmente e meglio raggiunte dal messaggio vaccinale.

L'esperienza internazionale dimostra che per prevenire la rosolia congenita è indispensabile non solo assicurare elevate coperture vaccinali nei bambini entro il 2° anno di vita, ma anche che è indispensabile monitorare la frequenza delle donne in età fertile suscettibili, ed assicurarne la vaccinazione<sup>4-6</sup>.

In Italia, il vaccino antirosolia è stato introdotto nel 1972. Inizialmente la vaccinazione era raccomandata solo per le ragazze pre-adolescenti; nei primi anni '90, con l'introduzione del vaccino trivalente antimorbillo-parotite-rosolia (MPR), si è passato a raccomandare la vaccinazione universale per tutti i nuovi nati all'età di 12-15 mesi<sup>7</sup>. Finché non saranno raggiunte coperture superiori a 80% nei nuovi nati è raccomandato di continuare la vaccinazione delle ragazze prepuberi.

La copertura vaccinale per la rosolia non viene rilevata di routine, ma indagini condotte negli anni '90 hanno mostrato come oltre il 90% delle vaccinazioni antimorbillo nel secondo anno di vita venga effettuata con MPR<sup>8</sup>. Nei nuovi nati, quindi, la copertura vaccinale per la rosolia è sovrapponibile a quella per il morbillo, cioè il 53% nel 1998<sup>8</sup>, e il 76% nel 2001 (Fonte: Ministero della Salute). Esistono però forti differenze intra-regionali, con coperture variabili dal 47% al 91% nel 2001. Purtroppo non sono disponibili dati nazionali recenti sui livelli di copertura della vaccinazione anti-rosolia nelle donne prima e dopo la pubertà.

Società Italiana di Neonatologia - Gruppo di Studio di Infettivologia Neonatale (Task Force Rosolia Congenita)

<sup>^</sup> Settore Infezioni Perinatali - Dipartimento Pediatria - Università Federico II - Napoli  
<sup>∞</sup> Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale - Azienda Ospedaliera "Carlo Poma" - Mantova

\* Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale - Azienda Ospedaliera "S. Maria della Misericordia" - Udine

Indirizzo per la corrispondenza (Corresponding author): Wilma Buffolano - Dipartimento Pediatria - Università Federico II - Via Pansini, 5 - 80131 Napoli - tel. 081/7462914 - fax 081/7463268 - e-mail: wilma@unina.it

Le basse coperture vaccinali raggiunte con la prima dose MPR in Italia hanno diminuito ma non bloccato la circolazione della rosolia e il rischio di RC resta significativo, in conseguenza degli elevati livelli di suscettibilità sia nella popolazione generale che in quella che affronta il periodo riproduttivo<sup>9</sup>.

Purtroppo, nel nostro Paese non esistono dati sufficienti sulla frequenza della RC, il cui monitoraggio rappresenta il nodo critico per stimare sia l'entità del problema (su cui si prendono decisioni di politica sanitaria) che l'efficacia delle strategie adottate.

Il Piano Nazionale di Eliminazione del Morbillo e della Rosolia Congenita, recentemente stilato dal Gruppo Interregionale per le Malattie Infettive e le Vaccinazioni, dall'Istituto Superiore di Sanità e dal Ministero della Salute, individua tra gli obiettivi da raggiungere la reintroduzione della rosolia in gravidanza e della rosolia congenita tra le malattie soggette alla terza classe di notifica obbligatoria. Un sistema di sorveglianza efficace, tutta via, non può prescindere dal miglioramento della diagnosi dei casi di rosolia acquisita in utero.

La Società Italiana di Neonatologia ha quindi recepito l'invito a stilare delle procedure operative standard per la diagnosi e la gestione clinica della RC, che vengono illustrate in questo documento.

## La rosolia acquisita in età post-natale

### Eziologia e patogenesi

La rosolia è una infezione causata da un *Togavirus* (genere *Rubivirus*) di cui l'uomo è l'unico ospite. La trasmissione, che in genere richiede il contatto diretto stretto, avviene per via aerea; il quadro clinico è caratterizzato da esantema maculopapulare, che compare tra 16 e 20 giorni dal contagio, inizia dalla zona retro-auricolare e si estende al volto e al tronco. Nel 50%-80% dei casi l'esantema non è caratteristico (e può essere confuso con quello del morbillo o della scarlattina), o può mancare del tutto (specie in età adulta)<sup>10</sup>.

Quando presenti, i sintomi generali sono rappresentati da febbre, cefalea, malessere, e rinocongiuntivite, che precedono di 1-5 giorni l'esantema. L'interessamento dei linfonodi retro-nucali e retro-auricolari prima della comparsa del rash è caratteristico. Nelle giovani donne sono frequenti artriti o artralgie. Complicanze serie sono segnalate molto raramente (porpora trombocitopenica, s. di Guillain-Barré ed encefalite). La contagiosità si verifica da alcuni giorni prima a 5-7 giorni dopo la comparsa dell'esantema. Il virus inizialmente replica nella mucosa nasofaringea, da cui può essere isolato da una settimana prima a circa 2 settimane dopo la comparsa dell'esantema (raramente oltre le 5 settimane). Tra i 7 e 9 giorni dal contagio si verifica la viremia (che raggiunge il picco tra 10 e

17 giorni), con diffusione del virus in organi e apparati, placenta compresa<sup>11</sup>.

Sia l'infezione naturale che la vaccinazione conferiscono nella maggioranza dei casi una protezione permanente ma non assoluta nei confronti di reinfezioni, che sono state descritte sia dopo la malattia naturale che dopo la vaccinazione.

### Risposta anticorpale all'infezione acquisita

Le IgM specifiche compaiono a partire da 14-18 giorni dall'esposizione, cioè 2-3 giorni dopo la comparsa dell'esantema. Raggiungono il picco in 20 giorni, per poi declinare fino a diventare non misurabili in 50-70 giorni. Tuttavia, possono persistere positive a bassi livelli anche per 12 mesi<sup>11</sup>. Le IgG specifiche compaiono circa 20 giorni dopo il contagio e persistono nel tempo, almeno per 2-3 decenni.

### La diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio della rosolia può essere effettuata in modo indiretto, attraverso la ricerca degli anticorpi specifici, o diretto, attraverso l'isolamento virale o sonde molecolari (sequenze del genoma virale evidenziate in tecnica PCR)<sup>4</sup>. Ricerca degli anticorpi specifici. La diagnosi indiretta è basata su:

- 1) IgM positività, in presenza di sintomi clinici compatibili. Gli anticorpi di classe IgM possono non essere evidenziabili prima del V giorno di esantema; pertanto, se, in presenza dell'esantema, le IgM risultano negative, il test va ripetuto dopo 5 giorni dalla comparsa della manifestazione clinica. La metodica raccomandata per la ricerca delle IgM è l'EIA (Enzyme Immune Assay) a cattura. False positività delle IgM specifiche in test ELISA (non a cattura) sono descritte in soggetti con altre infezioni virali (Parvovirus B19, CMV, EBV) o positività per i fattori reumatoidi<sup>12</sup>.
- 2) Livelli di IgG in significativo aumento (almeno 4 volte i livelli iniziali) o, meglio ancora, sierconversione su due campioni di siero, prelevati il primo entro 7-10 giorni dalla comparsa dell'esantema o subito dopo il contatto con un soggetto infetto e il secondo almeno 2 settimane dopo. I due campioni andrebbero esaminati con la stessa metodologia e nella stessa seduta analitica.
- 3) Bassa avidità delle IgG specifiche<sup>13</sup>. Il test di avidità valuta la forza di legame con l'antigene; in caso di infezione recente, l'avidità delle IgG è bassa (< 30% delle IgG totali), mentre in caso di infezione pregressa e reinfezione l'avidità è elevata (> 30%).
- 4) Isolamento virale positivo su un campione biologico (urine, tampone faringeo o nasale) prelevato in fase acuta. Rappresenta il gold standard per la diagnosi, ma costo eco-

nomico e complessità tecnica ne limitano l'impiego routinario. È indispensabile invece per la diagnosi di RC e s-RC.

- 5) Positività della PCR (genoma virale specifico) su un campione biologico prelevato in fase acuta. Come per l'isolamento virale, si tratta di una metodica complessa, da riservare a Centri di Riferimento<sup>14</sup>. È indispensabile per le essenziali indagini epidemiologiche da condurre in realtà a bassa incidenza, per distinguere i casi generati localmente da quelli importati (da realtà ad alta incidenza).

### Definizioni di caso della rosolia acquisita

Ai fini della sorveglianza epidemiologica, i casi di rosolia possono venire distinti in<sup>15</sup>:

- 1) caso sospetto: qualsiasi esantema generalizzato a insorgenza acuta;
- 2) caso probabile: quando coesistano le seguenti condizioni: a) esantema maculopapulare ad insorgenza acuta, b) Temperatura corporea > 37°C (se misurata), c) almeno uno dei seguenti segni: linfadenopatia (di solito sub-occipitale, retro-auricolare e cervicale), artralgia/artrite, o congiuntivite, in assenza di conferma di laboratorio;
- 3) caso confermato: quando vi sia stata una conferma di laboratorio, oppure in presenza di un caso probabile che sia epidemiologicamente correlato con un caso confermato (contatto con un caso confermato, in un periodo di tempo compatibile con l'incubazione dell'infezione).

## La rosolia congenita

### Patogenesi

La rosolia contratta in gravidanza può essere trasmessa al feto per via transplacentare durante la fase viremica. La probabilità di trasmissione e gli esiti clinici dipendono dall'epoca gestazionale in cui avviene il contagio (Tab. 1)<sup>16</sup>. Se l'infezione materna avviene nel periodo periconcezionale o nelle prime 10 settimane di gestazione, la frequenza di trasmissione e quella degli esiti sono elevatissime (rispettivamente 90% e 100%). Tra le 11 e le 16 settimane la frequenza di trasmissione scende al 67%, quella degli esiti al 50%. In seguito, la trasmissione è occasionale e gli esiti sono rappresentati dalla sola compromissione dell'udito (limitatamente alle 16-20 settimane di età gestazionale). Tuttavia, vi sono numerose segnalazioni di una associazione positiva tra RC e patologie autoimmuni (tiroidite, diabete mellito tipo I) e/o tumorali, nonché psicosi (autismo), anche tra soggetti con RC asintomatica nelle prime epoche della vita<sup>17-20</sup>.

L'infezione fetale da virus della rosolia, infatti, ha un effetto negativo sulla maturazione sia dell'immunità umorale che cellulare<sup>21-25</sup>.

Tabella 1

### RISCHIO DI ROSOLIA CONGENITA IN RAPPORTO ALL'ETÀ GESTAZIONALE

EG (sett)	Infezione	Difetti		Rischio globale
	IgM+ /Totale (%)	Totale	Positivi (%)	(%)
< 11	9/10 (90)	9	100	90
11-12	4/6 (67)	4	50	33
13-14	12/18 (67)	12	17	11
15-16	17/36 (47)	14	50	24
17-18	13/33 (39)	10	-	-
19-22	20/59 (34)	53	-	-
23-26	8/32 (25)			
27-30	11/31 (35)			
31-36	15/25 (60)			
> 36	8/8 (100)			
Totale	117/258 (45)	102	20	9

(Miller F, Craddock-Watson JE, Pollock TM, Lancet 1982; 2: 781, adattata)

### Rischio di rosolia congenita durante una reinfezione

Il rischio di RC dopo reinfezione è molto basso. Infatti, la viremia è stata documentata molto raramente. In particolare, in caso di reinfezione materna nelle prime 16 settimane di gravidanza, il rischio di infezione fetale è stato stimato essere dell'8% circa, ma le forme clinicamente severe alla nascita sembrano sporadiche<sup>26-28</sup>.

### Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche della RC vengono tradizionalmente distinte in transitorie, permanenti e tardive (Tab. 2). Le manifestazioni transitorie sono correlate a una replicazione virale massiva e configurano la cosiddetta Expanded Rubella Syndrome (epatosplenomegalia, ittero, epatite, porpora piastrinopenica, blue-berry muffin rash\*, anemia emolitica, encefalite, polmonite, miocardite, opacità corneali). Le manifestazioni transitorie sono autolimitanti, risolvendo nel giro di giorni o settimane; hanno però valenza prognosticamente negativa; infatti il 35% dei pazienti che presentano una Expanded Rubella Syndrome muore nel corso del primo anno di vita e il 50% conserva disturbi della crescita<sup>29</sup>.

Le manifestazioni permanenti della RC dipendono da alterazioni strutturali provocate o da anomalie del processo organogenetico (retinopatia pigmentosa e difetti cardiaci congeniti), o dagli esiti cicatriziali di estesi fenomeni di infiammazione e necrosi tessutale (encefalite, calcificazioni endocraniche, sordità neurosensoriale).

Le manifestazioni tardive sono conseguenza di una prolungata replicazione virale negli organi bersaglio (sordità ingrave-

\* Manifestazione cutanea caratterizzata da lesioni maculopapulari di color rosso vinoso o bluastro dovute a persistente eritropoiesi eterotopica.

MANIFESTAZIONI CLINICHE DELLA ROSOLIA CONGENITA				
<b>Neonatali</b>		Ritardo crescita intrauterina basso peso alla nascita prematùrità	<b>"Early"</b>	<i>Cardiovascolari</i> Stenosi periferica polmonare Stenosi valvolare polmonare Dotto Arterioso Pervio DIA, DIV Miocardite
<b>"Early"</b> (precoci)	<i>Oculari</i>	aborto spontaneo opacità corneali cataratta corioretinite retinite pigmentosa microftalmia		<i>Diverse</i> Anomalie arco aortico Arresto crescita Polmonite interstiziale Ipoplasmia timica
	<i>SNC</i>	idrocefalia microcefalia Meningoencefalite Fontanella ant. ampia Convulsioni Letargia/ irritabilità	<b>"Late"</b> (tardive)	<i>SNC</i> Stenosi a. renale ± iper-pA Autismo Anomalie comportamento Ipotonia Ritardo mentale Panencefalite progressiva
	<i>Addominali</i>	Epatomegalia Splenomegalia		Ritardo psicomotorio Deficit uditivo/sordità
	<i>Cutanee</i>	ittero Adenopatia Blue-muffin rash Porpora trombocitopenica		<i>Endocrine</i> Deficit GH Iper-/ipo-tiroidismo Diabete mellito Pubertà precoce

Da: S. Baron. Medical Microbiology, IV Ed. Edn Togavirus: Rubella virus manifestations (modificata)

scente, cataratta, glaucoma, perdita del visus, microcefalia, ritardo mentale, autismo, panencefalite) e/o di massivi processi di distruzione e poi cicatrizzazione (ipertensione renale e aortica, radiolucenza di ossa lunghe).

Anomalie visive, nel loro complesso, si manifestano nel 43% dei casi di RC<sup>30,31</sup>. Le più frequenti sono la retinopatia pigmentosa (aspetto sale e pepe) e la cataratta, bilaterali nell'80% dei casi. La retinopatia non compromette la visione e non è progressiva, a meno che non intervengano fenomeni di neovascolarizzazione negli strati sottostanti la macula. La cataratta, generalmente periferica, può non essere rilevabile alla nascita, ma solo dopo mesi.

Il deficit uditivo, caratteristicamente periferico (neurosensoriale), è in assoluto il segno clinico più frequentemente rilevato nella RC, sia in forma isolata (40% dei casi di RC) che combinata con gli altri sintomi di categoria a), riscontrandosi nel 58% dei pazienti. Può essere monolaterale o bilaterale, moderato o grave e passare non rilevato allo screening audiologico neonatale con otoemissioni, come d'altronde quello da CMV congenito. Talvolta si rende rilevabile solo alla fine del I anno di vita.

Difetti cardiaci congeniti (soprattutto anomalie di flusso, quali il Dotto Arterioso Pervio e la stenosi periferica dell'arteria polmonare) isolati, o combinati con difetti settali, sono rilevati nel 50% dei casi di RC acquisiti nelle prime 10 settimane di gestazione.

Essendo causa potenziale di malattia coronarica, cerebrale, renale e vascolare periferica in età adulta, tipo e gravità della cardiopatia sono l'elemento che condiziona la prognosi quoad vitam dei soggetti con RC.

## Diagnosi clinica

La diagnosi clinica di RC poggia essenzialmente sulla messa in evidenza di segni a carico degli organi bersaglio (encefalo, cuore, occhio e orecchio) e non.

Sulla base della loro maggiore o minore specificità diagnostica i segni clinici più comunemente riscontrati sono stati distinti in 2 categorie (a e b)<sup>32</sup>:

- cataratta/glaucoma congenito, malformazioni cardiache congenite (soprattutto Pervietà del Dotto di Botallo e/o stenosi periferica dell'arteria polmonare), deficit uditivo neurosensoriale, retinopatia pigmentosa;
- porpora, epato-splenomegalia, ittero, microcefalia, ritardo dello sviluppo somatico, ritardo dello sviluppo neuromotorio, meningoencefalite, radiolucenza delle ossa lunghe.

I segni di categoria b), se rilevati isolatamente, sono poco utili per la diagnosi di RC, sia perché condivisi da altre infezioni a trasmissione verticale più frequenti (toxoplasmosi, CMV, sifilide), sia perché possono non essere rilevabili al momento della valutazione clinica (alcuni, in quanto transitori come il rash blue-berry muffin, possono essere scomparsi, altri, in quanto tardivi come il ritardo neurologico, possono non essere ancora apprezzabili).

In assenza di conferme di laboratorio, la diagnosi clinica di RC può essere posta sulla base del riscontro di 2 delle manifestazioni cliniche di gruppo a), o una di gruppo a) ed una di gruppo b), in un paziente in cui siano state escluse altre eziologie con quadro clinico sovrapponibile.

## La diagnosi di laboratorio di RC

Gli accertamenti di laboratorio per la conferma della diagnosi di rosolia congenita includono:

1) Ricerca delle IgM, che risultano positive nel 96% dei casi di RC e permangono tali per 6-12 mesi, consentendo la conferma diagnostica anche in epoca non neonatale<sup>33,34</sup>. Quando le IgM risultino negative alla nascita, vanno ripetute almeno 1 volta all'età di 2 mesi per escludere positivizzazioni tardive dovute a trasmissione tardiva dell'infezione materna. Data la sensibilità non assoluta del test, una negatività delle IgM non esclude con certezza l'infezione e occorre far riferimento ad altro/ altri test (per esempio, la scomparsa delle IgG dopo il VI mese di vita) per la diagnosi di certezza.

2) Ricerca delle IgG specifiche (e test di avidità). Poiché le IgG materne passano la placenta e il loro livello nel neonato può risultare più elevato che nella madre, solo la cinetica nel tempo delle IgG specifiche assume valore diagnostico. Livelli di IgG specifiche che non diminuiscono ad un ritmo del 50% per mese sono suggestivi di infezione congenita. A tale proposito va specificato che i campioni prelevati in momenti successivi vanno analizzati con lo stesso test e nella stessa seduta analitica. Inoltre, va tenuto conto del fatto che i comuni test EIA-IgG perdono di precisione quando i livelli anticorpali sono molto vicini al limite alto di lettura, perché si perde la linearità tra densità ottica e concentrazione). Pertanto, per seguire la cinetica delle IgG specifiche nel tempo è più adatto il test IH (inibizione dell'agglutinazione), che ha intervalli di lettura molto ampi e costituisce il test di riferimento su cui tutti gli altri sono standardizzati<sup>33,34</sup>.

La scomparsa delle IgG specifiche nel secondo semestre di vita consente escludere in maniera definitiva la diagnosi di RC anche in assenza di altri dati di laboratorio relativi al periodo neonatale. La loro persistenza intorno all'anno di età, mentre depone per una RC, non consente di escludere con certezza assoluta un'infezione acquisita postnatalmente<sup>35</sup>. In questi casi il test di avidità delle IgG specifiche risulta di grande utilità: infatti, è noto che nella rosolia, come in altre infezioni congenite, il fenomeno della maturazione delle IgG specifiche (passaggio da forze di legame con l'antigene più basse a forze di legame con l'antigene più alte) è ritardato rispetto all'infezione acquisita dopo la nascita. Trovare dunque un'avidità che si mantiene bassa nel tempo, depone fortemente per l'infezione acquisita in utero<sup>36-37</sup>.

3) Isolamento virale. L'isolamento del virus da campioni biologici (quali saliva, urine e liquor) rappresenta lo strumento diagnostico d'elezione, per l'elevata specificità<sup>38</sup>. La percentuale di casi di RC che risultano positivi alla nascita è stimata essere dell'84%; in seguito la proporzione di colture positive decresce rapidamente, risultando del 33% a 6 mesi e del 11% a nove mesi. Positività sono state riscontrate fino ai 2-3 anni di vita, per quanto in una bassa percentuale dei casi<sup>34,38</sup>.

4) PCR. Le più recenti raccomandazioni dei CDC considerano

la PCR equivalente alla coltura in vitro tradizionale, in termini di definizione diagnostica di caso<sup>4,30,32</sup>. Va però detto che negli USA, tenuto conto del ridotto numero di campioni attesi positivi, oltre che della complessità e difficoltà di standardizzazione dei risultati, la qualità del risultato è garantita dall'impiego di un unico laboratorio di riferimento (CDC). Possono essere sottoposti a diagnosi molecolare secreto nasale, tampone faringeo, urine, sangue, liquor e aspirato dal tessuto infiammatorio della lente. In particolare sull'aspirato infiammatorio della lente la determinazione della PCR permette la diagnosi differenziale tra cataratta congenita familiare e cataratta da RC e ciò anche nella fase degli esiti (a isolamento ormai negativo su tampone faringeo e urine)<sup>39</sup>. Il ricorso alla diagnosi molecolare è inoltre cruciale nella fase di eliminazione della RC per l'indagine epidemiologica sui casi indice (identificazione del genotipo).

In conclusione, una positività delle IgM specifiche o una coltura (o anche PCR) positiva nel primo semestre di vita o la persistenza delle IgG specifiche dopo i 6 mesi di vita e prima della prima dose di MPR a 12-15 mesi sono prova assoluta di RC, anche in assenza di sintomi correlabili alla RC.

Una coltura negativa nei primi mesi di vita (come una negatività delle IgM specifiche) depone per una non infezione congenita, ma la diagnosi di esclusione può essere posta solo sulla base della scomparsa delle IgG specifiche, di presumibile origine materna (in genere intorno ai 6 mesi di vita).

In assenza di queste informazioni, la diagnosi di RC (o la sua esclusione) non può considerarsi certa, anche quando, per sospetto diagnostico tardivo, si utilizzino altri indicatori, quali l'avidità delle IgG specifiche<sup>36,37</sup>, che si mantiene bassa nel tempo o la mancata risposta al booster con vaccino MPR<sup>21</sup>.

In conclusione, a partire dall'anno di vita, può risultare impossibile arrivare a una diagnosi certa di infezione, perché, da una parte la vaccinazione con MPR induce la produzione di anticorpi specifici e può innescare la viruria, dall'altra le IgM prodotte durante il periodo fetale e neonatale scompaiono entro 6 mesi di vita e solo il 10-15% dei lattanti infetti ha ancora una viruria dimostrabile. Tutti gli altri test impiegabili, pur promettenti sul piano scientifico, non possono essere considerati alla stregua di quelli di riferimento.

## Definizioni di caso della rosolia congenita

Per RC si intende una situazione clinica generalmente manifesta nel primo anno di vita e caratterizzata da qualunque segno clinico o di laboratorio compatibile con l'infezione congenita da rosolia<sup>4</sup>.

Secondo criteri definiti a livello internazionale<sup>15</sup> un caso di RC può essere classificato come:

- 1) sospetto: in presenza di almeno un segno clinico compatibile con la RC, senza che siano soddisfatti i criteri che definiscono un caso probabile;

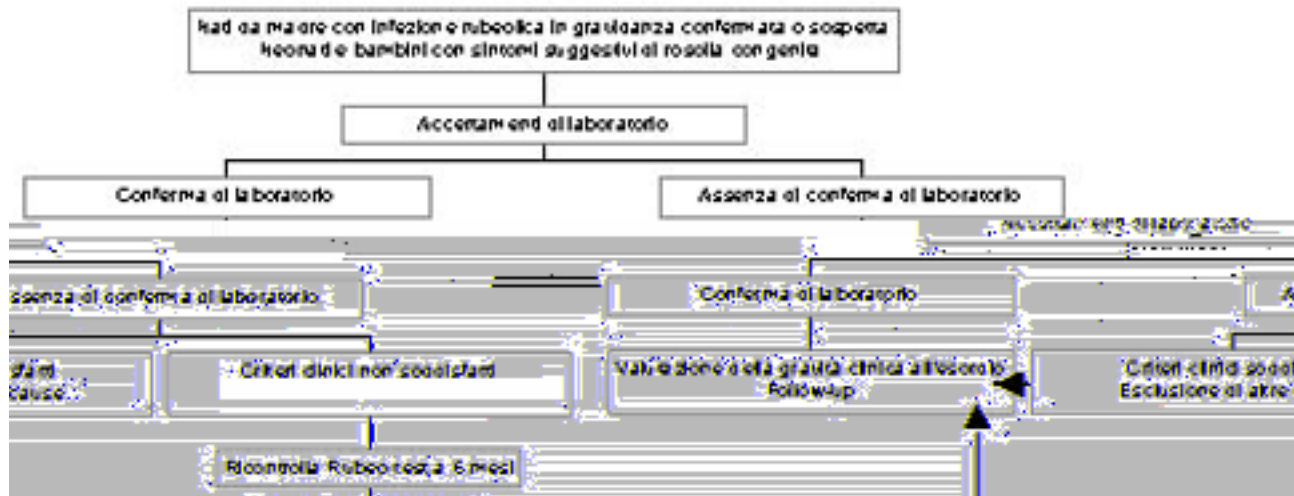


Figura 1

Iter procedurale per la diagnosi e la gestione clinica dei casi di rosolia congenita.

- 2) probabile: in presenza di due manifestazioni cliniche di gruppo a), o di una di gruppo a) ed una di gruppo b), senza che sia disponibile la conferma di laboratorio, ma quando siano state escluse altre eziologie che provocano quadri clinici sovrapponibili;
- 3) confermato: in presenza di un quadro clinico probabile, confermato dagli esami di laboratorio;
- 4) sola infezione: conferma in laboratorio dell'infezione, con esclusione di sintomi o segni clinici caratteristici.

### L'accertamento dei casi di rosolia congenita

La rosolia congenita va sospettata in tre categorie di pazienti:

- 1) nati da madre con diagnosi di infezione rubeolica in gravidanza (sia sospetta che confermata);
- 2) neonati e bambini in cui si rileva la presenza di segni consistenti con la diagnosi di RC (2 segni di categoria a) o un segno di categoria a) e uno di categoria b), e non è possibile escludere con certezza una rosolia in gravidanza;
- 3) neonati e bambini con solo un segno di categoria a) o b) in cui sono state escluse altre possibili cause, infettive o no.

In tutte queste situazioni è necessario effettuare accertamenti di laboratorio per confermare o escludere la diagnosi e strumentali per dirimere tra s-RC e sola infezione.

L'iter procedurale è riassunto in Fig. 1, ed è descritto in dettaglio nelle sezioni che seguono.

#### Nati da madre con infezione rubeolica in gravidanza

La verifica al momento del parto dello stato immunitario materno verso la rosolia costituisce lo strumento più adatto

per identificare i nati da madre con rosolia in gravidanza (documentata o sospetta). Inoltre, questa verifica consente di identificare le donne ancora suscettibili verso la rosolia, e di vaccinarle nel post-partum.

Durante la gravidanza, la procedura raccomandata di screening per la rosolia è l'esecuzione del rubeo-test, che valuta le IgM e IgG specifiche<sup>40</sup>. Al momento del ricovero per il parto è quindi opportuno verificare l'esecuzione del rubeo-test e registrarne i risultati rispetto all'EG sulla documentazione clinica del neonato.

In base alle risposte del Rubeo-test è possibile distinguere tre diverse situazioni (Fig. 2):

- a) IgG positive o documentata vaccinazione prima della gravidanza appena conclusa, o IgG positive e IgM negative durante la stessa. In questo caso, la madre può considerarsi protetta. Di conseguenza sul neonato non va eseguito alcun tipo di accertamento specifico, a meno che anamnesticamente non vi sia stato un contatto stretto noto con un caso di rosolia accertato. Non va dimenticato che la protezione indotta dal virus della rosolia (sia selvaggio che RA/27 modificato) 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 acquisizione naturale e nel 14-18% dei casi di acquisizione attraverso vaccinazione contro la rosolia<sup>26, 41</sup>;
- b) IgM positività documentata nel corso della gravidanza. In questo caso va escluso che il neonato abbia acquisito la rosolia congenita, secondo quanto consigliato in Fig. 2;
- c) assenza di documentazione. In questo caso, il rubeo-test va eseguito nella madre durante il ricovero per il parto, e la stessa va subito vaccinata, se suscettibile. Se l'anamnesi materna è compatibile con una rosolia in gravidanza (rash o esposizione a caso accertato di rosolia) nel neonato va esclusa la RC, secondo quanto consigliato in Fig. 2.

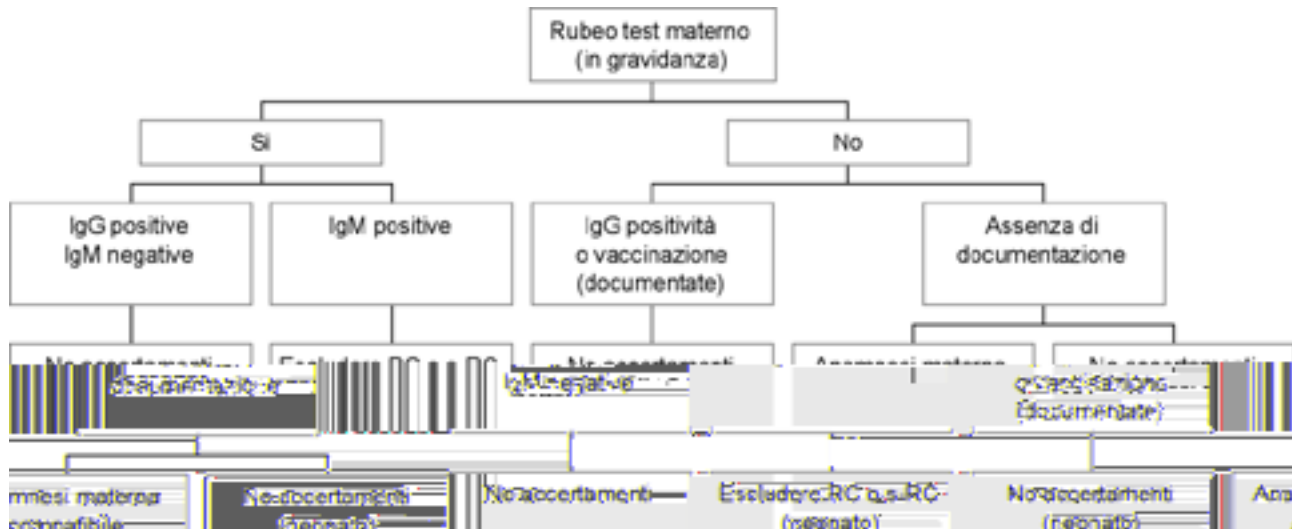


Figura 2

Iter procedurale per l'accertamento di RC in base allo stato immunitario e all'anamnesi materna.

### Neonati e bambini con sintomi suggestivi di RC

Nel caso di neonati e bambini in cui si rileva la compresenza di almeno un sintomo di gruppo a) e due sintomi di gruppo b), o di due sintomi di gruppo a), deve in prima istanza essere valutato lo stato immunitario materno nei confronti della rosolia. Se è disponibile una documentazione di immunità (IgG specifiche positive o vaccinazione documentata) precedente la gravidanza, o una positività delle IgG con IgM negative durante le prime 7-8 settimane di gravidanza, la diagnosi di RC può essere ragionevolmente esclusa e, magari riconsiderata dopo che siano state escluse altre eziologie con sintomatologia clinica potenzialmente sovrapponibile.

In tutti gli altri casi, è necessario sottoporre il neonato alle procedure consigliate in Fig. 2.

### Gestione clinica dei bambini con rosolia congenita

La RC, oltre a forme cliniche anche molto complesse dalla nascita, può dar luogo a infezioni clinicamente silenti nelle prime epoche della vita, che manifestano sintomi in età successive<sup>42-43</sup>.

I bambini con diagnosi di RC confermata o sospetta vanno quindi rivalutati nel tempo, per cogliere quali manifestazioni mantengono carattere di evolutività e quali insorgono più tardivamente.

In generale, la prognosi definitiva andrebbe posta dopo i 5 anni di età. Naturalmente ai genitori non va taciuto che, quando l'esordio è severo, come nella Rubella Expanded Syndrome, la prognosi è spesso severa, con elevati indici di mortalità nel periodo infantile. Va altresì fatto presente che, anche per i bambini con danno neurosensoriale lieve, v'è un

rischio maggiorato (e anticipato) per patologie autoimmuni (diabete giovanile, disfunzioni tiroidee) e tumorali e che il tipo di malformazione cardiaca, quando presente e non correggibile, condiziona pesantemente sia la prognosi quoad vitam che quoad valetudinem.

La gestione clinica dei bambini con rosolia congenita deve quindi prevedere sia la definizione della gravità clinica all'esordio, che il follow-up successivo.

#### A. Definizione della gravità clinica di esordio

I neonati e i bambini con diagnosi sospetta o confermata di RC vanno sottoposti in prima battuta a:

- esame obiettivo generale, con valutazione auxologica;
- valutazione specialistica cardiologica, che includa l'auscultazione cardiaca, la valutazione della pressione arteriosa ai 4 arti e l'esecuzione di una ecocardiografia;
- valutazione specialistica audiologica (otoemissioni o meglio ABR);
- valutazione specialistica oftalmologica (esame diretto e fundoscopico);
- valutazione neurologica che includa almeno l'ecografia cerebrale.

In caso di conferma della diagnosi da parte del laboratorio e negatività delle indagini strumentali di prima battuta, occorre ricorrere a strumenti con livello di accuratezza diagnostica più elevata (fundoscopia indiretta per lesioni "sale e pepe" periferiche, ecografia oculare e/o elettroretinogramma in caso di opacità del vitreo, ABR in caso di otoemissioni normali, TAC cranica a sezioni ultrasottili per migliore definizione delle calcificazioni endocraniche, RMN per evidenziare aree di ipo- o ipotrofia corticale, ecocardiografia bidimensionale).

le con valutazione flussometrica in color Doppler per le stenosi periferiche dell'arteria polmonare).

Nei casi confermati o che restano sospetti alla nascita i controlli clinici e le indagini strumentali vanno ripetute ogni 6-8 settimane per i primi 6 mesi di vita, onde identificare le manifestazioni tardive e intervenire su quelle rapidamente ingrossanti. Naturalmente, patologie specifiche d'organo, con sintomatologia grave o malcontrollate dal trattamento, potranno richiedere interventi più ravvicinati. Questo calendario di ricontrollare le IgM specifiche a 8 settimane, se prima erano negative, e la curva di decadimento delle IgG specifiche nel tempo.

A partire dai 6 mesi di vita e fino ai 24 mesi, i controlli clinici e strumentali potranno diventare semestrali. A 6 e 12 mesi verranno ricontrollati sia i livelli di IgG specifiche (che consentono una diagnosi definitiva di infezione o non infezione) che la viruria.

## B. Identificazione e trattamento degli esiti

Il supporto protesico e neuroriabilitativo e il trattamento chirurgico (ove possibile) della cardiopatia vanno istituiti quanto prima, insieme al supporto psico-sociale.

Un migliore sviluppo del linguaggio e un miglior rendimento scolastico sono stati dimostrati nei soggetti con deficit uditivo protesizzati precocemente<sup>44</sup>. In particolare, l'obiettivo è protesizzare i soggetti ipoacusici entro il 3° mese dopo la nascita, al fine di non compromettere lo sviluppo cognitivo<sup>45-46</sup>. I limiti che hanno finora caratterizzato le metodologie di screening audiologico dei neonati (eccesso di risposte falsamente positive o negative, e necessità di procedere a indagini più sofisticate, costose ed invasive) sembrano oggi superabili con la tecnica ABRs a lettura ed interpretazione automatica dei dati, utilizzabile da personale non specializzato e caratterizzata da un rischio prossimo allo zero di falsi negativi, anche nelle popolazioni dei nati pretermine, purché di età gestazionale > 33 settimane. Tale metodica del tutto non invasiva e con tempi di esecuzione limitati a pochissimi minuti permette nei casi di RC con danno uditivo di avviare un tempestivo piano di terapia-riabilitazione al fine di permettere un soddisfacente sviluppo da parte del bambino dell'apprendimento e dell'utilizzo dei fonemi, con conseguente acquisizione di un normale linguaggio.

Naturalmente, tenuto conto della possibile insorgenza tardiva del danno acustico e della sua possibile evolutività, anche i casi di RC negativi nei primi mesi di vita vanno rivalutati almeno a 7 e 24 mesi.

Glaucoma e cataratta vanno trattati chirurgicamente al massimo entro il III mese di vita per non perdere la funzione visiva, anche se i risultati dell'intervento possono non essere troppo buoni, quando vi è ancora attiva replicazione locale e infiammazione (utile al riguardo eseguire la PCR sul liquido

contenuto nella cataratta, specie se è in diagnosi differenziale una forma genetica). In ogni caso gli eventuali fenomeni di neovascolarizzazione, monitorabili con telecamere a tecnologia 3CCD e ottica ad alta risoluzione, se localizzati in zona maculare, possono essere trattati con successo con terapia fotodinamica<sup>47</sup>.

Per quanto attiene i difetti cardiaci, va sottolineato che in alcune di esse tecniche di cateterizzazione terapeutica possono essere preferibili alla chirurgia (chiusura a ombrello del Dotto Arterioso Pervio, dilatazione ballonare della valvola polmonare).

I casi confermati di RC resteranno negli anni sotto controllo clinico-strumentale multidisciplinare (nell'equipe è necessaria la presenza di almeno un neurologo, un audiologo, un oculista, un cardiologo, un endocrinologo, un riabilitatore) per un corretto trattamento di supporto e inquadramento degli esiti, nonché per la sorveglianza sulle complicazioni tardive (autismo, ipotiroidismo, diabete giovanile, tumori, ipertensione renale e aortica).

Il calendario dei controlli clinico-strumentali va giocoforza adattato alle singole necessità, ma è consigliabile un contatto col centro almeno annuale fino all'età scolare, anche quando il pediatra di famiglia sia stato sensibilizzato alle possibili complicazioni attese.

## Misure precauzionali speciali

I lattanti con RC possono sviluppare un grave distress respiratorio da polmonite interstiziale che richiede il riko vero in terapia intensiva neonatale<sup>48</sup> e che può avere esito infausto. Vanno perciò sorvegliati per questa eventualità e il pediatra di famiglia va informato all'atto della diagnosi o del sospetto diagnostico di RC (con o senza compromissione cardiaca) del rischio connesso a eventuali manifestazioni acute respiratorie.

I bambini con s-RC e RC presentano un'incidenza maggiore di diabete giovanile, la cui base autoimmune non è dimostrata. Vanno perciò sorvegliati per questa eventualità e il pediatra di famiglia allertato.

I bambini con RC sono un importante fonte potenziale per poussée epidemiche e rosolia in gravidanza, perché nelle loro secrezioni sono prodotte per mesi (talvolta anni) molte copie del virus<sup>43</sup>.

Ai fini della prevenzione sul personale sanitario e sulle donne a rischio i limiti temporali di contagiosità dei pazienti con RC andrebbero definiti in base alla viruria; alternativamente il bambino va ritenuto fonte di contagio almeno fino al compimento del 12° mese di età<sup>43,49</sup>. Le persone che si prendono cura di un caso di RC dovrebbero essere protette (da vaccinazione o infezione naturale, che ha prodotto Rubeo-test positivo). Se hanno una gravidanza in corso vanno allontanate. In caso di ospedalizzazione il paziente va isolato fino a

compimento del I anno di vita (o negatività di 2 esami colturali). Particolare attenzione va posta nell'evitare il contatto con persone a rischio (specie donne in gravidanza) che possono frequentare il reparto<sup>49,50</sup>.

### Ringraziamenti

Si ringraziano i dottori S. Salmaso e M. Ciofi degli Atti, Reparto Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma e i componenti del Gruppo Rosolia-Infettivologia Neonatale della SIN per i suggerimenti dati durante la stesura del testo.

### BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Health 21.  
The health for all policy for the WHO European Region.  
Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 1999 (European Health for All Series, No. 6).
- <sup>2</sup> Rubella vaccines.  
WHO position paper.  
Weekly Epidemiological Record 2000; 75 (20): 161-172.
- <sup>3</sup> Schluter WW, Reef SE, Redd SC, Dykewicz CA.  
Changing epidemiology of congenital rubella syndrome in the United States.  
JID 1998; 178: 636-641.
- <sup>4</sup> CDC. Control and Prevention of Rubella.  
Evaluation and management of suspected outbreaks, rubella in pregnant women, and surveillance for congenital rubella.  
MMWR 2001; 50: 1-23.
- <sup>5</sup> Panagiotopoulos T, Antoniadou I, Valassi-Adam E.  
Increase in congenital rubella occurrence after immunisation in Greece: retrospective survey and systematic review.  
BMJ 1999; 319: 1402-1407.
- <sup>6</sup> Tookey P.  
Congenital rubella: down but not out.  
Lancet 2002; 360: 803-804.
- <sup>7</sup> Ministero della Sanità.  
Controllo ed eliminazione di morbillo, rosolia e parotite attraverso la vaccinazione.  
Circolare 12, 13 luglio 1999.
- <sup>8</sup> Salmaso S, Rota MC, Ciofi degli Atti M, Tozzi AE, Kreidl P, ICONA Study Group.  
Infant immunization coverage in Italy by cluster survey estimates.  
WHO Bull 1999; 70: 843-851.
- <sup>9</sup> Buffalano W, Lorenzo E, Lodato S, Parlato A, Pizzuti R, onlus-RePuNaRC.  
Sorvegliare la rosolia congenita: l'esperienza del "Registro Infezioni Perinatali" in Campania.  
BEN 2003; 16: 5.
- <sup>10</sup> Rubella.  
<http://www.cdc.gov/nip/cdc/publications/pink/rubella.pdf>.
- <sup>11</sup> Pattison JR, Dome DS, Mace JE.  
The persistence of specific IgM after natural infection with rubella virus.  
Lancet 1975; 1: 184-187.
- <sup>12</sup> 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.
- <sup>13</sup> Bottiger SP, Panum Jensen I.  
Maturation of rubella IgG avidity over time after acute rubella infection.  
Clin Diagn Virol 1997; 8: 105-111.
- <sup>14</sup> Bosma TJ, Corbett KM, O'Shea S.  
Use of polymerase chain reaction for the detection of rubella virus RNA in clinical samples.  
J Clin Microbiol 1995; 33: 1075-1079.
- <sup>15</sup> CDC.  
Case definitions for infectious conditions under public health surveillance.  
MMWR 1997; 46: 30.
- <sup>16</sup> Miller E, Cradock-Watson JE, Pollock TM.  
Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy.  
Lancet 1982; 2: 781-794.
- <sup>17</sup> 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.
- <sup>18</sup> Orenstein WA, Prebled SR, Bart K, Hinman AR.  
Methods of assessing the impact of congenital rubella infection.  
Rev Infect Dis 1985; 7: 522-528.
- <sup>19</sup> Hutchinson MK, Gendall SR.  
Congenital TORCH infection in infants and young children: neurodevelopmental sequelae and implications for interruption.  
Top Child Educ 1995; 15: 65-82.
- <sup>20</sup> 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.
- <sup>21</sup> Cooper LZ, Florman AL, Ziring PR.  
Loss of rubella hemagglutination-inhibition antibody in congenital rubella.  
Am J Dis Child 1971; 122: 397-401.
- <sup>22</sup> Fitzgerald MG, Pullen GR, Horking CR.  
Low affinity antibody to rubella antigen in patients after rubella infection in utero.  
Pediatrics 1988; 81: 812-814.
- <sup>23</sup> O'Shea S, Best J, Bonatvala JE.  
A lymphocyte transformation assay for diagnosis of congenital rubella.  
J Virol Methods 1992; 37: 549-558.
- <sup>24</sup> 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.
- <sup>25</sup> Ou D, Jonsen LA, Metzger DL, Tingle AJ.  
CD4+ and CD8+ T-cell clones from congenital rubella syndrome patients with IDDM recognize overlapping GAD65 protein epitopes. Implication for HLA class I and II allelic linkage to disease susceptibility.

- Hum Immunol 1999; 60: 652-664.
- <sup>26</sup> Weber B, Enders G, Schlosser R, Wegerich B, Koenig R, Rabenau H, Doerr HW. Congenital rubella syndrome after maternal reinfection. *Infection* 1993; 21: 118-121.
- <sup>27</sup> Best JM, Banatvala JE, Morgan-Capner P, Miller E. Foetal infection after maternal reinfection with rubella: criteria for defining reinfection. *Br Med J* 1989; 299: 773-775.
- <sup>28</sup> Saule H, Ender s G, Zeller J, Bernsau U. Congenital rubella infection after previous immunity of the mother. *Eur J Pediatr* 1988, 147: 195-196.
- <sup>29</sup> Chiriboga-Klein S, Oberfield SE, Casullo AM, Holahan N, Fedun B, Cooper LZ, Levine LS. Growth in congenital rubella syndrome and correlation with clinical manifestations. *J Pediatr* 1989; 115: 251-255.
- <sup>30</sup> Reef SE, Plotkin S, Corsero JF, Katz M, Cooper L, Schwartz B, Zimmermann-Swain L, Danovaro Holliday C, Wharton M. Preparing for elimination of congenital rubella syndrome: Summary of a workshop on CRS elimination in the United States. *CID* 2000; 31: 85-95.
- <sup>31</sup> Ezike E. Congenital Rubella. <http://www.emedicine.com/PED/topic2025.htm>.
- <sup>32</sup> CDC. Rubella Congenital Syndrome, 1999 case definition. [http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/rubella\\_syndrome\\_congenital\\_current.htm](http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/rubella_syndrome_congenital_current.htm).
- <sup>33</sup> Cradock-Watson JE, Ridehalgh HKS, Chandler S. Specific immunoglobulin levels in newborn infants with congenital rubella syndrome. *J Hyg London* 1976; 109: 76-79.
- <sup>34</sup> Cooper LZ, Alford CA. Rubella. In: Remington JS, Klein JO, (eds). *Infectious Diseases of the fetus and newborn infant*. 5th ed. WB Saunders Philadelphia, 2000, 347-388.
- <sup>35</sup> Cutts FT, Robertson SE, Diaz-Ortega JL, Samuel R. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, part 1: burden of disease from CRS. *WHO Bull* 1997; 15: 55-68.
- <sup>36</sup> Thomas HI, Morgan-Capner P, Cradock-Watson JE, Ender s G, Best JM, O'Shea S. Slow maturation of IgG1 avidity and persistence of specific IgM in congenital rubella: implications for diagnosis and immunopathology. *J Med Virol* 1993; 41: 196-200.
- <sup>37</sup> 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.
- <sup>38</sup> Sever JL, Monif G. Limited persistence of virus in congenital rubella. *Am J Dis Child* 1965; 110: 452-456.
- <sup>39</sup> Bosma TJ, Corbett KM, Eckstein MB, O'Shea S, Vijayalakshmi P, Banatvala JE, Morton K, Best JM. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2881-2887.
- <sup>40</sup> Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana. Serie generale n. 245, 20.10.1998; 24-29.
- <sup>41</sup> Chang TW. Rubella reinfection and intrauterine involvement. *J Pediatr* 1974; 84: 617-618.
- <sup>42</sup> Menser MA, Forrest JM. Rubella-high incidence of defects in children considered normal at birth. *Med J Aust* 1974; 1: 123-126.
- <sup>43</sup> Phillips GA, Melnick JL, Yow MD. Persistence of virus in infants with congenital rubella and normal infants with a history of maternal rubella. *JAMA* 1965; 193: 1027-1031.
- <sup>44</sup> Lunner T. Cognitive function in relation to hearing aid use. *Int J Audiol* 2003; 42: 149-151.
- <sup>45</sup> Infant tested for hearing loss. United States, 1999-2001. *MMWR* 2003; 52: 981-984.
- <sup>46</sup> Joint Committee on Infant Hearing. Year 2000 position statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. <http://www.jcih.org/jcih2000>.
- <sup>47</sup> 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.
- <sup>48</sup> Franklin SL, Kelly R. Congenital Rubella and Interstitial Pneumonitis. *Clin Pediatr* 2001; 40: 101-103.
- <sup>49</sup> Zerr DM, Riggert D, Marcuse EK. Congenital Rubella Infection Control Problem. *Pediatrics* 2001; 108: 1389-1390.
- <sup>50</sup> VPD. Surveillance Manual. Congenital Rubella Syndrome. 3rd edition, 2002; 12: 1-12.