

Reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR) per la ricerca e l'identificazione di virus della rosolia. Rapporto di un caso clinico.

M.C. Medici, M. Martinelli, M.C. Arcangeletti, L. Zerbini, A. Calderaro, P. Valcavi, F. De Conto, F. Ferraglia, C. Chezzi, G. Dettori

*Sezione di Microbiologia - Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio
Università degli Studi di Parma*

Questo lavoro è dedicato alla memoria del Prof. Adolfo Turano

Riassunto. Viene descritto il ritrovamento dell'acido nucleico (RNA) di virus della rosolia mediante reazione polimerasica a catena tipo "nested" previa retrotrascrizione (RT-PCR) in campioni di liquor, leucociti del sangue periferico, urina e secrezioni respiratorie (tamponi nasale e faringeo) appartenenti ad una neonata deceduta pochi giorni dopo la nascita. La piccola paziente, nata alla 35^a settimana di gestazione da madre con sospetta infezione da rosolia acquisita in gravidanza, presentava gravi malformazioni riconducibili a sindrome da rosolia congenita. La ricerca di anticorpi sierici specifici ha rivelato nella neonata la presenza di IgM oltre che IgG, a conferma dell'esito positivo all'RT-PCR. Al contrario colture cellulari convenzionali inoculate con i campioni di liquor, urina, tampone nasale e faringeo hanno dato esito negativo.

Sulla base della storia clinica ed in relazione agli esiti delle indagini chimico-cliniche e microbiologiche di laboratorio, condotte sulla neonata e sulla madre durante la gravidanza, viene discussa la possibile eziologia da virus della rosolia nel caso clinico presentato. L'RT-PCR sembra un metodo più sensibile di quello colturale tradizionale per la diagnosi postnatale di rosolia congenita.

Abstract. We report the detection of rubella virus RNA by a reverse transcription (RT) nested polymerase chain reaction (PCR) assay in clinical samples (cerebrospinal fluid - CSF, blood leukocytes, urine, pharyngeal and nasal swabs) from a newborn died a few days after birth. The infant, born at the 35th gestational week from mother with suspected rubella infection in pregnancy, showed a pattern of congenital disorders related to congenital rubella syndrome.

A serum sample from the newborn revealed rubella specific IgM reactivity, in complete agreement with RT-PCR results. Conventional cell culture inoculated with the CSF, urine, pharyngeal and nasal swabs gave no positive results.

According to the clinical history and the results of laboratory testing performed on the infant and on her mother during pregnancy, the possible etiological role of rubella virus in the reported case is discussed. RT followed by PCR amplification seems a potentially more sensitive technique than culture for postnatal diagnosis of congenital rubella infection.

Introduzione

Il virus della rosolia (VR), un membro del genere *Rubivirus* della famiglia *Togaviridae*, è responsabile nei bambini e nei giovani adulti di un'infezione spesso asintomatica o paucisintomatica che, se manifesta, è caratterizzata da una malattia esantematica acuta contagiosa, ma in genere benigna.

Nonostante l'ampia diffusione della vaccinazione abbia notevolmente ridotto già da diversi anni l'incidenza dell'infezione, essa, tuttavia, rimane endemica in ogni paese del mondo e rappresenta ancora una minaccia durante la gravidanza per le donne non immunizzate.

L'infezione, se è acquisita nei primi mesi di gravidanza, può provocare gravi danni al feto, dall'aborto

spontaneo alla morte perinatale o alla comparsa di anomalie che caratterizzano la sindrome da rosolia congenita (SRC). Queste sono state rivelate nel 90% dei neonati nati da madre che hanno contratto l'infezione durante le prime 11 settimane di gestazione [24].

Recenti studi epidemiologici rivelano che VR circola specialmente nei paesi in cui la vaccinazione non esiste o è facoltativa o solo da pochi anni è stata introdotta attraverso programmi adeguati [13]. Dati relativi al Ghana, Israele, Jamaica, Messico, Oman, Panama, Singapore, Sri Lanka, Trinidad e Tobago riportano un'incidenza annuale dei casi di SRC simile a quella osservata nei paesi industrializzati prima dell'introduzione della vaccinazione e solitamente associati ad episodi epidemici [16]. Inoltre nel Regno Unito è stato rilevato che complessivamente la percentuale di soggetti sottoposti a vaccinazione trivalente morbillo-parotite-rosolia all'età di 2 anni dal 1995 alla fine del 1999 è diminuita all'87,8%, un livello insufficiente a prevenire una nuova circolazione di VR nel lungo periodo [34].

Alla luce di queste osservazioni, a causa dei sempre più frequenti spostamenti di soggetti di nazionalità diversa e della vasta immigrazione anche da paesi poco sviluppati, in Italia come in altri paesi in cui la rosolia è stata quasi eradicata da programmi efficaci di immunizzazione, ritorna emergente la necessità di metodi efficaci di laboratorio per l'accertamento precoce dell'infezione nella donna gravida e/o nel prodotto del concepimento.

La diagnosi di infezione da VR è condotta in genere attraverso metodi sierologici (dimostrazione di una sieroconversione o di IgM sieriche specifiche) e il rischio di trasmissione dell'infezione al feto è valutato sulla base dell'età gestazionale al momento dell'infezione materna. La presenza di IgM sieriche specifiche tuttavia non sempre correla con un'infezione recente [3, 29, 32, 33]. Il saggio per la determinazione dell'avidità delle IgG specifiche, di recente introduzione, può aiutare nell'accertamento o nell'esclusione di un'infezione primaria [10, 21, 30, 31].

La diagnosi prenatale e postnatale di infezione congenita può essere condotta mediante determinazione delle IgM specifiche nel sangue fetale [20, 25] o appartenente al neonato, rispettivamente, isolamento virale in coltura cellulare o rivelazione diretta dell'RNA virale mediante ibridazione da diversi materiali patologici [15, 22].

Un metodo più sensibile per la rivelazione dell'RNA di VR è la reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR) [11, 17]. Sulla sua applicazione a scopo diagnostico sono stati pubblicati solo pochi studi che si riferiscono ad indagini condotte in soggetti adulti [8], su materiali fetali

[23, 28] o per la diagnosi prenatale di rosolia congenita [7, 27].

In questa nota viene riferito di un caso di infezione congenita da virus della rosolia osservato in una neonata ricoverata presso l'Ospedale Maggiore di Parma e deceduta pochi giorni dopo la nascita.

Materiali e metodi

Campioni clinici. Sono stati saggiati i seguenti materiali biologici: liquor, urina, tampone faringeo e tampone nasale in terreno di trasporto per virus (TM: soluzione salina di Hank's contenente 0,5% di albumina bovina sierica, 200 µg/ml di streptomina, 200 U/ml di penicillina e 10 µg/ml di fungizone, a pH 7,2), prelevati 24 ore dopo la nascita da una neonata con sospetta infezione da virus della rosolia (VR) unitamente a due campioni di sangue periferico in provette sterili, delle quali una contenente EDTA.

Estrazione di RNA da sangue (leucociti). Il campione è stato preparato utilizzando in parte la preparazione commerciale "EXTRAcell" (Bioline, Italia) per la separazione dei leucociti e la decontaminazione dalle emazie. L'estrazione dell'RNA dai leucociti è stata condotta utilizzando il kit "EXTRAzol" (Bioline) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. In breve, 1 ml di sangue con EDTA, contenente circa 2×10^6 leucociti è stato trattato per 5 min. a temperatura ambiente con 4 ml di soluzione ipotonica ("lysis buffer"). Dopo centrifugazione a 2500 rpm per 5 min. (centrifuga Allegra 21R, Beckman Coulter, Italia) a temperatura ambiente, il sedimento è stato lavato con 1 ml di soluzione isotonica ("cell buffer") e quindi risospeso in 0,5 ml della stessa soluzione a temperatura ambiente. Un'aliquota di 200 µl della sospensione, miscelata con 800 µl di "soluzione di estrazione", contenente guanidinio tiocianato, 2-mercaptoetanololo, fenolo e tampone acetato, e con 100 µl di cloroformio è stata incubata in bagno di ghiaccio per 15 min. Dopo centrifugazione a 12-14.000 rpm per 15 min. (centrifuga Microfuge R, Beckman Coulter) a temperatura ambiente, 600 µl della fase superiore sono stati addizionati di 2 µl di glicogeno e 600 µl di isopropanolo e incubati per 1 ora a -20°C . Dopo centrifugazione a 12-14.000 rpm per 15 min. a 4°C , il sedimento è stato risospeso con 1 µl di etanolo 75% raffreddato a -20°C e nuovamente centrifugato a 12-14.000 rpm per 2 min. a 4°C . Eliminato il soprannatante, il sedimento è stato infine risospeso in 10 µl di acqua ultrapura a temperatura ambiente e conservato a -20°C fino al momento del saggio.

Estrazione di DNA da sangue (leucociti). DNA è stato estratto dai leucociti del sangue periferico utilizzando

la preparazione commerciale "EXTRAcell" (Bioline) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

Estrazione di RNA e DNA da materiali biologici e da siero. RNA e DNA sono stati estratti da 250 µl di ciascuno dei materiali biologici e dal siero utilizzando la preparazione commerciale "EXTRAGEN" (Bioline) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

RT-PCR. cDNA è stato ottenuto mediante retrotrascrizione (RT) da 10 µl di RNA estratto, utilizzando "random primers" esanucleotidici ("RT-Kit", Bioline), in thermal-cycler automatico (Progene, Techne, UK) secondo il seguente protocollo: a 37°C per 1 ora e 30 min. e quindi a 96°C per 5 min.

L'amplificazione del cDNA di VR è stata condotta mediante reazione polimerasica a catena (PCR) "nested" utilizzando la preparazione commerciale "Rosolia - oligomix" (Bioline) che prevede l'impiego di due copie di primer in grado di riconoscere sequenze specifiche della regione codificante per la proteina strutturale E1 di VR [8]. Come controllo positivo di amplificazione è stato impiegato un costrutto plasmidico contenente la sequenza nucleotidica bersaglio (Bioline).

La prima fase di amplificazione è stata condotta su 5 µl di cDNA secondo il seguente protocollo: 1 ciclo di denaturazione a 94°C per 2 min., 35 cicli a 94°C per 30 sec., 60°C per 30 sec. e 72°C per 30 sec. ed 1 ciclo di estensione finale a 72°C per 5 min.

Un µl del prodotto della prima amplificazione è stato quindi utilizzato per la seconda amplificazione nelle seguenti condizioni: 1 ciclo di denaturazione a 94°C per 2 min., 30 cicli a 94°C per 30 sec., 55°C per 30 sec. e 72°C per 30 sec. ed 1 ciclo di estensione finale a 72°C per 5 min.

I prodotti di amplificazione sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi in gel d'agaroso al 2% colorato con bromuro d'etidio. Il tracciato elettroforetico è stato visualizzato mediante transilluminatore U.V. e fotografato. Il prodotto di amplificazione atteso genera una banda elettroforetica corrispondente ad un frammento di DNA di dimensioni pari a 142 pb.

PCR. L'amplificazione genica di citomegalovirus (CMV), virus herpes simplex (HSV), varicella-zoster (VZV) e parvovirus B19 da DNA estratto è stata condotta mediante PCR "nested" utilizzando per CMV "primers" specifici per la regione genomica immediata precoce, per HSV "primers" specifici per i geni codificanti per le glicoproteine D e G, per VZV "primers" specifici per la regione codificante per la "major DNA binding protein" e per parvovirus B19 "primers" per un frammento genomico codificante per una regione antigenica del nucleocapside. A tale scopo sono state impiegate le preparazioni commerciali "CMV early - oligo mix", "HSV multi-

plex 1 e 2 - oligo mix", "VZV - oligo mix" e "Parvovirus B19 - oligo mix" (Bioline), secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

Isolamento virale. L'isolamento virale è stato condotto secondo il metodo convenzionale su colture di cellule RK13, Vero e Sirc [4]. In particolare, aliquote di 200 µl di liquor, urina (a pH 7.0-7.4 con NaHCO₃ 8,8% e trattata per 1 ora a 4°C con 200 µg/ml di streptomina, 200 U/ml di penicillina e 10 µg/ml di fungizone) e tampone faringeo e tampone nasale in TM sono state inoculate su monostrati cellulari allestiti in piastre per colture cellulari a 24 pozzetti. Le colture, osservate al microscopio invertito per 7 giorni per la comparsa dell'effetto citopatico (ECP), sono state congelate e scongelate rapidamente e gli estratti cellulari sono stati inoculati su monostrati freschi. Dopo un ulteriore periodo di osservazione di 7 giorni le colture sono state sottoposte ad un secondo passaggio. È stato considerato negativo il campione che non ha determinato la comparsa di ECP in coltura trascorsi 21 giorni complessivi dalla sua inoculazione.

Ricerca di IgG e IgM. Anticorpi specifici anti-VR, -CMV e -HSV di classe G e M sono stati ricercati nel siero mediante saggi immunoenzimatici qualitativi ("Rubella IgG EIA well" e "Rubella IgM EIA well", "Citomegalovirus IgG EIA Well" e "Citomegalovirus IgM EIA Well", "Herpes Simplex Virus tipo 1 IgG EIA Well", "Herpes Simplex Virus tipo 2 IgG EIA Well" e "Herpes Simplex Virus IgM EIA Well", Radim, Italia) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. I saggi per la ricerca delle IgM sono stati condotti sulla base del metodo "a cattura".

Dati clinici e anamnestici. I dati clinici della neonata e anamnestici della madre sono stati gentilmente forniti dall'Istituto di Neonatologia e Medicina Prenatale dell'Università degli Studi di Parma presso il quale la neonata è stata ricoverata.

Risultati

Evidenza clinica e stato immunitario della neonata alla nascita. La piccola paziente era nata alla 35^a settimana di gestazione e presentava: claudicornea, glaucoma bilaterale, microftalmia, sordità neurosensoriale, dotto arterioso e dotto interatriale pervi, encefalite con segni ecografici di ventricolite, basso peso corporeo, circa 900 grammi, e polmonite interstiziale. Inoltre la neonata mostrava ipoplasia del pollice di entrambe le mani.

Il dosaggio delle immunoglobuline sieriche ha rivelato IgG 555 mg/100 ml, IgA 10 mg/100 ml e IgM 121 mg/100 ml.

Storia clinica della madre. La madre, primipara di 20 anni e di origine indiana, aveva sofferto durante la gravidanza di minaccia d'aborto alla 12^a e 13^a settimana.

In occasione del primo episodio, nell'ambito degli accertamenti sierologici di laboratorio era risultata positiva per IgG e IgM anti-virus della rosolia (VR). Presso un altro laboratorio un secondo prelievo di sangue a distanza di due giorni non aveva evidenziato la presenza di IgM e aveva dimostrato un'avidità delle IgG del 30% (Tabella 1). Tali risultati avevano indotto a ritenere che si trattasse di infezione pregressa alla gravidanza e quindi priva di ripercussioni sul feto.

Ai ripetuti controlli ecografici condotti successivamente nel corso della gravidanza era stato evidenziato un progressivo rallentamento della crescita fetale oltre ad arteria ombelicale unica.

Non risultava che la donna avesse sofferto durante la gravidanza di alcuna malattia febbrile, esantema o linfadenopatia.

Indagini virologiche. La neonata, giunta alla nostra osservazione con sospetto di infezione congenita da VR, è stata sottoposta ad indagini virologiche sia mediante reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR) per la ricerca dell'RNA di VR su liquor, urina, tampone faringeo, tampone nasale e leucociti sia mediante metodo colturale per l'isolamento virale tradizionale sugli stessi materiali, eccetto leucociti per quantità insufficiente. Inoltre è stata condotta mediante PCR la ricerca del DNA di citomegalovirus (CMV), virus

herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV1-2) e varicella-zoster (VZV) su liquor, siero e leucociti e di parvovirus B19 su liquor e siero. Parallelamente il campione di siero è stato sottoposto alla ricerca degli anticorpi sierici anti-VR, -CMV e -HSV.

L'RT-PCR ha rivelato la presenza del genoma di VR in tutti i materiali saggiati (Figura 1). La PCR ha dato invece esito negativo per CMV,

Figura 1. Corsa elettroforetica in gel d'agaroso al 2% dei prodotti di amplificazione ottenuti mediante RT-PCR per la ricerca e l'identificazione di virus della rosolia su campioni clinici appartenenti ad una neonata con sindrome da rosolia congenita. Posizioni 1, 3, 5, 7 e 9: liquor, sangue (leucociti), tampone nasale, tampone faringeo ed urina, rispettivamente; posizioni 2, 4, 8 e 10: "0" RNA; posizione 11: controllo positivo (plasmide); posizione 12: indicatore di pesi molecolari (VCS/Hinf I).

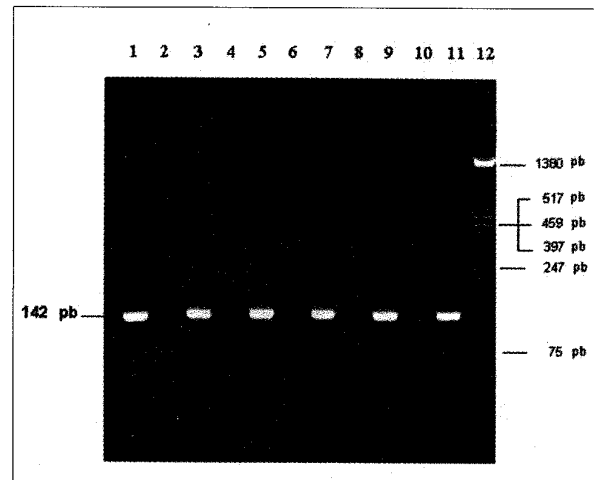


Tabella 1. Esito delle indagini sierologiche per la diagnosi di infezione da virus della rosolia in una donna con minaccia d'aborto (12^a settimana di gestazione).

Data prelievo	Saggio	Esito	Valori di riferimento		
11-04-2001	EIA*	IgG	126 UI/ml		
			6,7	Negativo	
			>8,7	Positivo	
			6,8-8,7	"Border line"	
		IgM	1.9 Indice		
			0,0-0,8	Negativo	
			1,3-18,0	Positivo	
			0,9-1,2	"Border line"	
13-04-2001	ELISA^	IgG	170 UI/ml		
			<15	Negativo	
			15	Dubbio	
			15-60	Positivo debole	
			60-240	Positivo medio	
			>240	Positivo forte	
		IgM	negativo	negativo	
		Avidità IgG	30 %	<15	Infezione in atto
				15-25	Infezione in atto
				>25	Infezione pregressa

Note: * EIA: Enzyme Immuno Assay; ^ ELISA: Enzyme Linked Immuno Assay. [Dati riportati in cartella clinica e ottenuti presso altri laboratori].

HSV, VZV e parvovirus B19. Le indagini colturali non hanno rivelato la presenza di alcun agente citopatogeno. Le indagini sierologiche hanno dato esito positivo per la presenza di IgG e IgM anti-VR, IgG anti-CMV e anti-HSV tipo 1 e negativo per IgG anti-HSV tipo 2 e per IgM anti-CMV e anti-HSV.

Discussione

In questa nota è stato descritto un caso di rosolia congenita accertato attraverso il ritrovamento dell'acido nucleico del virus della rosolia (VR) nei materiali patologici prelevati da una neonata deceduta pochi giorni dopo la nascita per le gravi anomalie congenite e confermato dall'esito positivo per la presenza di IgM anti-VR nel siero della neonata.

Le manifestazioni cliniche osservate alla nascita (opacizzazione della cornea, glaucoma, sordità neurosensoriale, dotti arterioso e interatriale pervi, encefalite, polmonite interstiziale e ritardo di crescita intrauterina) sono elencate tra i segni e i sintomi clinici descritti nella sindrome da rosolia congenita (SRC), definiti dai "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC), Atlanta, Georgia [12]. La neonata, inoltre, evidenziava al dosaggio dell'intero patrimonio immunitario iperproduzione di IgM, ad ulteriore conferma dello stato di infezione.

Gli esiti delle indagini virologiche e il quadro clinico della neonata giunta alla nostra osservazione hanno soddisfatto pienamente i criteri di classificazione fissati dal CDC per la diagnosi di rosolia congenita nella piccola paziente.

Studi epidemiologici recenti condotti negli Stati Uniti hanno rivelato che nell'ambito della popolazione adulta la percentuale dei casi di infezione/malattia da VR è aumentata nell'ultimo decennio a favore dei soggetti residenti nativi di paesi nei quali non esiste o è stato istituito solo di recente un programma di vaccinazione. Parallelamente, associato a questo gruppo di soggetti, è stato registrato un aumento dei casi di SRC [36].

Il caso di SRC descritto in questa nota si riferisce ad una neonata nata da madre di origine indiana e da alcuni anni residente in Italia. La donna aveva soggiornato nel paese d'origine in coincidenza con le prime settimane di gestazione. Dati epidemiologici relativi all'infezione da VR in India riferiscono una prevalenza di sieronegatività per anticorpi anti-VR nelle donne in età fertile relativamente alta, dal 15% a più del 30%, un numero di casi confermati di SRC pari al 7-12% dei neo-

nati con sospettata infezione congenita e, in uno studio casi-controllo, una prevalenza di anticorpi IgG anti-VR nei bambini con malformazioni SRC-compatibili del 62% verso il 10% dei controlli [16].

E' verosimile che l'infezione nella madre della neonata giunta alla nostra osservazione possa essere stata contratta molto precocemente nel corso della gravidanza, non escluso nel paese d'origine. Le anomalie al cuore e agli occhi della piccola paziente confermerebbero l'infezione materna acquisita durante la fase critica dell'organogenesi nelle prime otto settimane di gestazione [5].

Complessivamente il quadro clinico della neonata induce ad ipotizzare che la madre non fosse immunizzata contro VR al momento dell'infezione. D'altra parte, non essendo noto lo stato immunitario antecedente alla gravidanza, non può essere neppure esclusa l'ipotesi di una reinfezione materna.

Il reale rischio per il feto e il neonato in seguito a reinfezione non è ancora chiaro. Più spesso la reinfezione materna durante la gravidanza è stata dimostrata priva di rischi per il feto [1, 5, 14].

Tuttavia in letteratura sono stati documentati alcuni casi di SRC in seguito a reinfezione materna e di questi una parte, seppur rara, caratterizzata da coinvolgimento di molteplici organi [2, 4, 6, 9, 18, 19, 26, 34, 35].

A favore dell'ipotesi che nel caso giunto alla nostra osservazione si fosse trattato di una reinfezione nella madre deporrebbe l'alta avidità delle IgG specifiche materne rivelate alla 12^a settimana di gestazione.

In conclusione, il caso descritto sembra suggerire che è necessaria una maggior consapevolezza del rischio di SRC nella sorveglianza dell'infezione in particolari categorie di soggetti adulti.

Inoltre lo stesso evidenzia che nelle circostanze in cui la stima del rischio teratogeno risulti difficile solo sulla base degli esiti delle indagini sierologiche sia prudente approfondire gli accertamenti virologici attraverso l'impiego di metodi rivolti alla rivelazione dell'agente e/o di suoi componenti.

Nell'ambito dei metodi disponibili l'RT-PCR sembra soddisfare le esigenze di sensibilità e rapidità. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che l'RT-PCR per la rivelazione di VR da materiali patologici sembra essere più sensibile del metodo colturale tradizionale e il suo impiego può rappresentare un valido supporto diagnostico nel neonato infettato, il quale peraltro costituisce una importante sorgente di infezione.

Bibliografia

- Aboudy Y, Barnea B, Yosef L, Frank T, Mendelson E. Clinical rubella reinfection during pregnancy in a previously vaccinated woman. *J Infect* 2000; 41: 187-9.
- Alem A and Tamourt O. [Congenital rubella resulting from maternal reinfection.] *Arch Inst Past Alger* 1998; 62: 226-31.
- Banatvala JE, Best JM, O'Shea S and Dudgeon JA. Persistence of rubella antibodies after vaccination: detection after experimental challenge. *Rev Infect Dis* 1985; 7: S86-90.
- Best J and O'Shea S. Rubella Virus. In: Schmidt NJ and Emmons RW, eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydia infections*, 6th ed. American Public Health Association, Washington DC, 731-95, 1989.
- Best JM and Banatvala JE. Rubella. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, eds. *Principles and practice of clinical virology*. Wiley, Chichester, England, 3rd ed., 363-400, 1994.
- Best JM, Banatvala JE, Morgan-Capner P, Miller E. Fetal infection after maternal reinfection with rubella: criteria for defining reinfection. *Br Med J* 1999; 299: 773-5.
- 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: 2881-7.
- Bosma TJ, Corbett KM, O'Shea S, Banatvala JE, Best JM. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1075-9.
- Bott LM and Eizenberg DH. Congenital rubella after successful vaccination. *Med J Aust* 1982; 1: 514-5.
- Böttiger B and Jensen IP. Maturation of rubella IgG avidity over time after acute rubella infection. *Clin Diagn Virol* 1997; 8: 105-11.
- Carman WF, Williamson C, Cunliffe BA, Kidd AH. Reverse transcription and subsequent DNA amplification of rubella virus RNA. *J Virol Methods* 1989; 25: 21-30.
- CDC. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR* 1997; 46 [N° RR-10]: 30.
- CDC. Control and prevention of rubella: evaluation and management of suspected outbreaks, rubella in pregnant women, and surveillance for congenital rubella syndrome. *MMWR* 2001; 50: 1-23.
- Chen FP and Chu KK. Subclinical rubella reinfection in pregnancy: report of a case. *J Formos Med Assoc* 1993; 92: 294-5.
- Cradock-Watson JE, Miller E, Ridehalgh MKS, Terry GM, Ho-Terry L. Detection of rubella virus in fetal and placental tissues and in the throats of neonates after serologically confirmed rubella in pregnancy. *Prenat Diagn* 1989; 9: 91-6.
- Cutts FT, Robertson SE, Diaz-Ortega J-L, Samuel R. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, part 1: burden of disease from CRS. *Bulletin of the World Health Organization* 1997; 75: 55-68.
- Eggerding FA, Peters J, Lee RK, Inderlied CB. Detection of rubella virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 945-52.
- Forsgren M, Carlstrom G, Strangert K. Congenital rubella after maternal reinfection. *Scand J Infect Dis* 1979; 11: 81-3.
- Gilbert J and Kudesia G. Fetal infection after maternal reinfection with rubella. *Br Med J* 1989; 299: 1217.
- Grangeot-Keros L, Pillot J, Daffos F, Forestier F. Prenatal and postnatal production of IgM and IgA antibodies to rubella virus studied by antibody capture immunoassay. *J Infect Dis* 1988; 158: 138-43.
- Hedman K and Rouseau SA. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J Med Virol* 1989; 27: 288-92.
- Ho-Terry L, Terry GM, Londesborough P, Rees KR, Wielaard F, Denissen A. Diagnosis of fetal rubella infection by nucleic acid hybridization. *J Med Virol* 1988; 24: 175-82.
- Ho-Terry L, Terry GM, Londesborough P. Diagnosis of foetal rubella virus infection by polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1990; 71: 1607-11.
- Miller E, Crodock-Watson JE, Pollock TM. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet* 1982; 2: 781-94.
- Morgan-Capner P, Rodeck CH, Nicolaides KH, Craddock-Watson JE. Prenatal detection of rubella -specific IgM in fetal sera. *Prenatal Diagn* 1985; 5: 21-6.
- Partridge JW, Flewett TH, Whitehead JE. Congenital rubella affecting an infant whose mother had rubella antibodies before conception. *Br Med J* 1981; 282: 187-8.
- Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, Zavattoni M, Torsellini M, Gerna G. Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 708-13.
- Tanemura M, Suzumori K, Yagami Y, Katow S. Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction: a study of 34 cases diagnosed in fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 578-82.
- Thomas HI, Morgan-Capner P, Enders G, O'Shea S, Caldicott D, Best JM. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. *J Virol Methods* 1992; 39: 149-55.
- Thomas HIJ and Morgan-Capner P. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidemiol Infect* 1988; 101: 591-8.
- Thomas HIJ and Morgan-Capner P. The avidity of specific IgM detected in primary rubella and reinfection. *Epidem Infect* 1990; 104: 489-97.
- 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: 107-18.
33. Thomas HIJ, Morgan-Capner P, Roberts A, Hesketh L. Persistent rubella specific IgM reactivity in the absence of recent primary rubella and rubella reinfection. *J Med Virol* 1992; 36: 188-92.
34. Tookey P, Molyneaux P, Helms P. UK case of congenital rubella can be linked to Greek cases. *Br Med J* 2000; 321: 766-7.
35. Weber B, Enders G, Schlosser R, Wegerich B, Koenig R, Rabenau H, Doerr HW. Congenital rubella syndrome after maternal reinfection. *Infection* 1993; 21: 118-21.
36. Zimmerman L. and Reef S. Incidence of congenital rubella syndrome at a hospital serving a predominantly hispanic population, El Paso, Texas. *Pediatrics* 2001; 107: E40.