

## Actualités dans les stratégies diagnostiques des infections maternelles à risque de transmission fœtale

### C. Vauloup-Fellous

MCU-PH Virologie, Service de Microbiologie Immunologie biologique, CNR des Infections Rubéoleuses Materno-Fœtales. Hôpitaux Universitaires Paris-Sud

Les infections materno-fœtales sont fréquentes et posent de délicats problèmes de diagnostic et de conduite thérapeutique.

Différents virus, bactéries et parasites peuvent être transmis d'une femme enceinte à son fœtus, et être à l'origine (selon l'agent responsable et la période de contamination) : d'un avortement spontané, d'une embryopathie (malformation congénitale), de pathologies fœtales, d'atteintes du nouveau-né (naissance d'un enfant mort-né ou maladie néonatale clinique), ou avoir des conséquences post-natales différées de quelques mois à quelques années alors que l'infection était inapparente à la naissance. Le retentissement embryo-fœtal d'une infection verticale est variable selon le micro-organisme en cause et également selon le terme de la grossesse où survient l'infection.

Les principaux micro-organismes responsables d'infections acquises in utero sont *Treponema pallidum*, *Listeria monocytogenes*, le cytomégalo virus (CMV), le virus de la rubéole, le parvovirus B19, le virus de la varicelle et du zona (VZV), les entérovirus, et le toxoplasme. Tandis que d'autres micro-organismes infectent l'enfant préférentiellement au moment de l'accouchement, tels que *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae*, les virus herpès simplex (HSV), le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH), les virus des hépatites B (VHB) et C (VHC), les papillomavirus, le CMV et le VZV. Enfin, quelques virus sont également transmissibles par l'allaitement maternel comme les virus T-lymphotropiques humains (HTLV), le VIH, le VHB et le CMV.

Les circonstances du diagnostic de l'infection maternelle et/ou fœtale sont variables selon l'agent infectieux : dépistage systématique, constatation de signes cliniques maternels évocateurs ou anomalies échographiques. Les techniques diagnostiques aujourd'hui à notre disposition ont connu des développements récents et importants. Enfin, la prise en charge des infections virales materno-fœtales, souvent difficile, repose sur l'évaluation des risques encourus par le fœtus/le nouveau-né, et doit s'effectuer au sein d'une équipe pluridisciplinaire ayant l'agrément nécessaire.

A l'occasion de cet article, nous proposons un focus sur le diagnostic des infections materno-fœtales pour lesquels le biologiste est particulièrement sollicité en terme d'interprétation des examens sérologiques et moléculaires : la syphilis, la toxoplasmose, la rubéole, et les infections à CMV et HSV.

### Syphilis

La prévention de la syphilis congénitale passe par le dépistage sérologique et le traitement de la syphilis maternelle le plus tôt possible au cours de la grossesse. Un 2<sup>ème</sup> dépistage peut être justifié lors de l'accouchement s'il existe des facteurs de risque de contracter la syphilis pendant la grossesse (notamment si le partenaire a des comportements sexuels à risque).

Chez la mère, il est possible de mettre en évidence au microscope à fond noir des bactéries mobiles et spiralées, évocatrices de *Treponema pallidum*, à partir de prélèvement de sérosité effectué au niveau d'un chancre ou de plaques muqueuses génitales. Toutefois, en pratique courante, le diagnostic repose essentiellement sur la sérologie.

Il s'agit d'une sérologie tréponémique qui ne permet pas de différencier *Treponema pallidum* d'une infection à tréponématose endémique, telle que le Pian (retrouvé dans toutes les régions chaudes et humides), le Bejel (retrouvé en Afrique sub-saharienne, au Maroc, en Afghanistan et en Iran) ou la Pinta (retrouvée en Amérique centrale, en Amérique du Sud et au Mexique). De plus, nous ne disposons actuellement pas d'outil biologique permettant de différencier avec certitude une syphilis latente d'une cicatrice sérologique.

L'interprétation du dépistage sérologique repose sur la combinaison de plusieurs tests tréponémiques (TPHA, TPLA, FTA, Immunoblot...) et non tréponémiques (VDRL, RPR...) (Figure1).

## Toxoplasmose

L'interprétation de la sérologie toxoplasmose de dépistage s'inscrit actuellement dans un algorithme général détaillé dans la Figure 3. La maturation de l'avidité des IgG anti-toxoplasmiques est en général lente et il est donc courant qu'une faible avidité persiste plusieurs années après primo-infection [1]. Par ailleurs, les IgM peuvent persister plusieurs mois voir plusieurs années après primo-infection. En revanche, la recherche de signes cliniques, bien que rares et non spécifiques (adénopathies, syndrome grippal), peut aider à la datation.

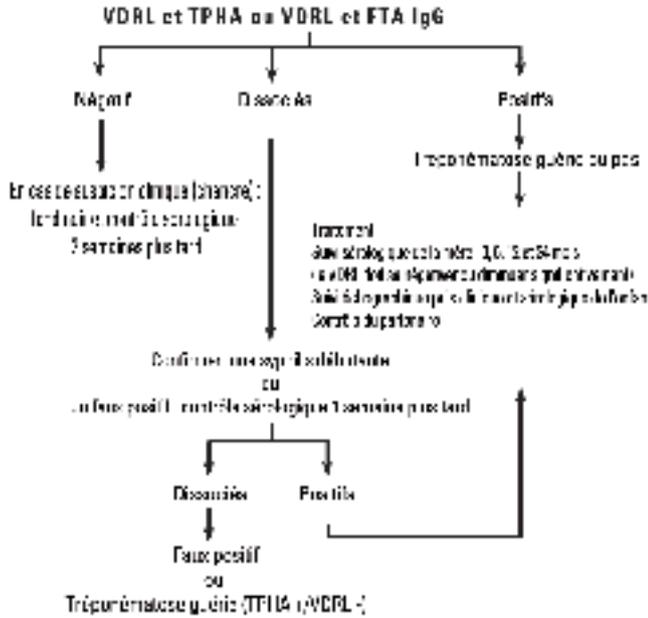


Figure 1 : Interprétation de la sérologie syphilis chez la femme enceinte

Chez le nouveau-né, outre le diagnostic clinique (observation de lésions cutanées ou recherche d'une méningite lymphocytaire), le diagnostic biologique peut être également bactériologique dans le cas de lésions cutanées, (y compris l'examen du placenta) et sérologique par la surveillance de la non disparition des anticorps maternels transmis à partir de l'âge de 6 mois et la mise en évidence d'IgM spécifiques (Figure 2).

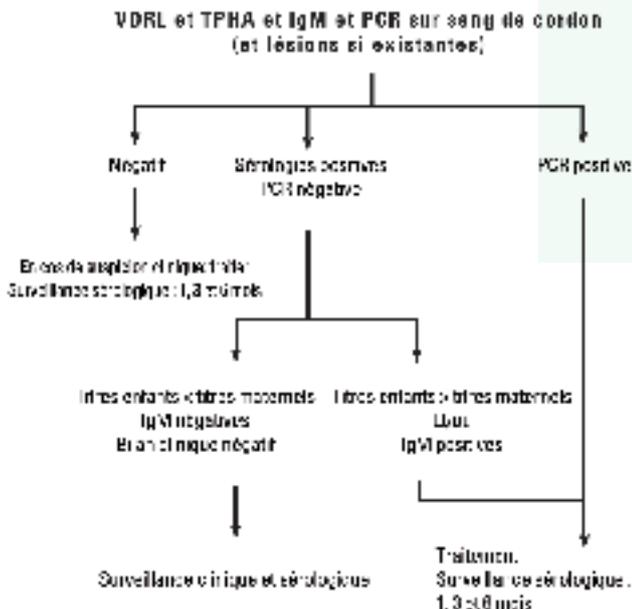


Figure 2 : Diagnostic biologique de la syphilis congénitale à la naissance

### Détermination du statut immunitaire maternel

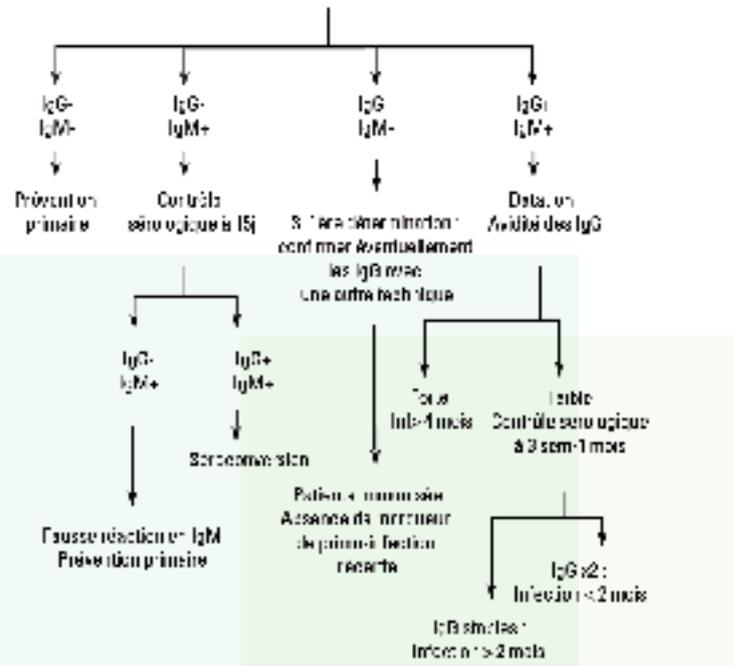


Figure 3 : Interprétation du dépistage sérologique de la toxoplasmose en cours de grossesse

L'amniocentèse à la recherche de l'infection fœtale est réalisée à partir de la 18<sup>ème</sup> semaines d'aménorrhée (SA) et au moins 4 semaines après l'infection maternelle. Son indication peut être discutée pour les infections maternelles précédant la 8<sup>ème</sup> SA, compte tenu du faible risque de transmission à ce terme [2]. La recherche de toxoplasme se fait par PCR dont la sensibilité est de 88 % et la valeur pronostic négative de 98 %. La mise en évidence d'ADN parasitaire dans le liquide amniotique (LA) prouve définitivement l'infection congénitale mais ne renseigne pas sur la forme clinique de cette infection. Toutefois, l'estimation de la charge parasitaire peut être utile à l'évaluation du pronostic fœtal : il a été montré qu'une infection maternelle acquise avant 20 SA associée à une concentration de parasite supérieure à 100/ml, était prédictive à presque 100 % d'une fœtopathie sévère [3].

## Virus Herpès Simplex

On distingue 2 types d'HSV qui peuvent être responsables de l'herpès génital : le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) et celui de type 2 (HSV-2).

L'isolement du virus constitue la méthode de référence. Toutefois, les tests de biologie moléculaire sont plus rapides et plus sensibles que la culture virale. Dans la mesure où les antiviraux disponibles limitent la progression de l'infection vers le système nerveux central et la dissémination, ils modifient nettement le pronostic de l'infection herpétique néo-natale. Un diagnostic rapide permettra donc l'instauration précoce du traitement. Le virus herpès étant fragile, il convient d'effectuer les prélèvements avant l'application d'un désinfectant puis de les placer immédiatement dans un milieu de transport adéquat avant l'acheminement au laboratoire qui réalisera l'analyse.

En cas d'épisode clinique évocateur pendant la grossesse, un examen virologique des lésions génitales est souhaitable afin de certifier le diagnostic. En cas d'antécédents d'herpès génital, un prélèvement au niveau vulvaire ou du col utérin peut également être pratiqué quelques jours avant l'accouchement, à la recherche d'une excrétion virale asymptomatique. Chez le nouveau-né, plusieurs sites de prélèvements sont possibles : lésions cutanées, urines, pharynx, yeux, LCR...

Il est possible de réaliser des sérologies spécifiques de type, mais les performances des tests utilisés sont variables en terme de sensibilité et de spécificité, tandis que le délai d'apparition des anticorps peut varier de 3 semaines à 3 mois. De plus, la recherche des anticorps spécifiques ne présente pas d'intérêt pour le diagnostic des infections génitales.

## Cytomégalovirus

La prévalence de l'infection à CMV chez les femmes en âge de procréer varie en fonction du statut socio-économique, de l'âge, de la profession, de la parité et de l'origine ethnique. Les femmes non immunisées sont exposées au risque de primo-infection à CMV. Il a également été rapporté, en particulier dans les populations à forte prévalence, des cas d'infection congénitale à CMV, symptomatiques ou non, consécutifs à une infection maternelle secondaire (réinfection ou réactivation). Les femmes les plus exposées sont les femmes séronégatives au contact de très jeunes enfants [4].

Le dépistage systématique de l'infection à CMV pendant la grossesse n'est actuellement pas recommandé dans la plupart des pays, et seules des mesures d'hygiène peuvent être proposées pour réduire significativement l'incidence des infections maternelles à CMV [5]. Néanmoins, une recherche d'IgG en début de grossesse est parfois

pratiquée afin de déterminer le statut sérologique maternel, notamment lorsque les patientes exercent une profession à risque (personnel de crèche, infirmière, puéricultrice, mère de famille...). Le diagnostic de l'infection maternelle peut également être effectué en cas de symptômes maternels. Enfin, de nombreuses infections à CMV au cours de la grossesse passent inaperçues, mais en présence d'anomalies échographiques évocatrices (RCIU, anomalies cérébrales, oligoamnios, intestin hyperéchogène, anarsaque...), une infection maternelle/congénitale à CMV doit être envisagée et recherchée.

La virémie, chez l'individu immunocompétent, serait un marqueur d'une primo-infection récente mais n'est pas utilisée dans la pratique courante dans un but diagnostique. La virurie maternelle n'est pas un bon outil pour le diagnostic de primo-infection à CMV puisqu'elle est aussi souvent positive à l'occasion de réactivations, qui ne sont à l'origine que de très rares cas d'infections congénitales symptomatiques. Le diagnostic de la primo-infection à CMV chez la femme enceinte repose donc essentiellement sur la sérologie (Figure 4).

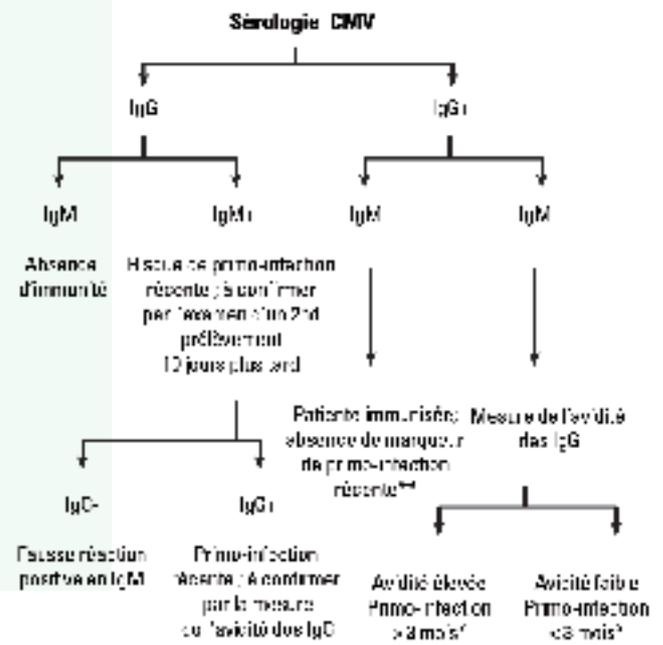


Figure 4 : Algorithme d'interprétation de la sérologie CMV

\* Résultat à interpréter en fonction du terme de la grossesse et de la technique utilisée

\*\* Attention! Si la sérologie est pratiquée au moment de la constatation des anomalies échographiques, les IgM peuvent avoir disparu!!

La recherche d'IgG et d'IgM s'effectue en général par des techniques de type ELISA. La présence d'IgG spécifiques signe un contact avec le virus, mais interprétée isolément, leur titre n'est en aucun cas indicatif de la date de survenue

de la primo-infection maternelle. La détection des IgM est pratiquement constante au cours des primo-infections récentes, mais elles peuvent également être détectées en raison de réactions croisées (avec l'EBV par exemple), longtemps après le début de la primo-infection (lors de l'utilisation de techniques très sensibles), au cours d'une infection secondaire, ou à l'occasion d'une autre infection évolutive entraînant une stimulation polyclonale non spécifique du système immunitaire. Il est donc clairement établi que la détection des IgM spécifiques est insuffisante pour poser le diagnostic de primo-infection, et que leur présence peut être difficile à interpréter. Pour ces raisons, le recours à la mesure de l'avidité des IgG spécifiques et à l'étude comparative des sérums antérieurs et/ou ultérieurs est donc le plus souvent nécessaire pour préciser le caractère éventuellement post-conceptionnel de l'infection. La mesure de l'avidité des IgG représente la mesure de la force de liaison entre des antigènes multivalents (contenus dans le réactif) et les anticorps polyclonaux, de classe IgG, de la patiente (sérum). L'utilisation de cette technique repose sur le fait que l'indice d'avidité des IgG spécifiques augmente au cours de la réponse immunitaire : en début d'infection, l'indice d'avidité des IgG est faible, et plus on s'éloigne du début de l'infection, plus cet indice est élevé. Le plus souvent, la mesure de l'indice d'avidité repose sur l'utilisation d'agents dénaturants (en général l'urée à concentration élevée) dans des tests de type ELISA. L'agent dénaturant est alors, soit inclus dans le diluant du sérum pour empêcher la formation de complexes antigène/anticorps (principe de dilution), soit ajouté aux solutions de lavage après la formation des complexes antigène/anticorps (principe d'éluion).

Il est ainsi possible d'obtenir pour un même sérum une mesure d'absorbance avec et sans utilisation de l'agent dénaturant. L'avidité est alors calculée de la façon suivante : DO en présence d'agent dénaturant / DO sans agent dénaturant. L'indice d'avidité permet en général d'exclure ou de confirmer une primo-infection récente de moins de 3-4 mois. Le résultat de l'avidité est donc à interpréter en fonction du terme de la grossesse et au-delà du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse, une avidité élevée ne permettra en général pas d'exclure une infection post-conceptionnelle. L'indice d'avidité est également fonction des individus testés ainsi que des techniques utilisées. Enfin, il faut noter que lorsque le titre d'IgG est faible, l'indice d'avidité peut être erroné. Sa valeur n'est donc pas toujours aisée à interpréter.

Actuellement, même s'il est couramment admis que l'augmentation des IgG spécifiques (en présence ou en absence d'IgM spécifiques) chez une femme immunisée avant sa grossesse, signe une infection secondaire, cette situation se rencontre également, et certainement beaucoup

plus fréquemment, lors de stimulations polyclonales non spécifiques du système immunitaire. La mesure de l'avidité des IgG n'est pas contributive dans ce cas puisqu'elle sera élevée dans les deux situations. Tout au plus, peut-on supposer rétrospectivement cette infection secondaire lorsqu'un enfant naît infecté d'une mère séropositive pour le CMV avant sa grossesse. En pratique, le diagnostic d'infection maternelle secondaire est donc difficilement réalisable n'est que très rarement effectué.

Lorsque des anomalies échographiques évocatrices d'une infection congénitale à CMV sont observées, une recherche de l'infection maternelle doit être effectuée. Si les IgG sont négatives (quelle que soit la valeur des IgM), la responsabilité du CMV, pour expliquer les anomalies échographiques, peut être exclue. Si les IgG sont positives, il est indiqué d'effectuer une mesure de l'indice d'avidité des IgG afin de dater l'infection, et/ou d'examiner un sérum du début de grossesse (sérum prélevé pour d'autres sérologies, pour le dosage des bHCG, pour le dépistage de la trisomie...), et ce, quelle que soit la valeur des IgM. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la présence d'IgM ne signifie pas obligatoirement primo-infection. De plus, lors de la constatation des anomalies échographiques, les IgM peuvent avoir déjà disparues. Si les résultats obtenus sur un sérum du début de grossesse ne sont pas évocateurs d'une primo-infection à CMV (IgG+/IgM- ou IgG+/IgM-/avidité élevée) un diagnostic anténatal peut toutefois être recommandé, car les IgM peuvent être fugaces, et une infection survenant dans les semaines précédant la conception ou une infection secondaire peuvent être à l'origine d'une infection fœtale symptomatique.

L'indication du diagnostic prénatal suite à une primo-infection maternelle, mais sans signe échographique est discutée, dans la mesure où les traitements pouvant être proposés en cas de recherche positive dans le LA, et donc en cas d'infection fœtale, sont encore en cours d'évaluation, tandis que le risque de l'amniocentèse n'est pas nul. De plus, en l'absence d'anomalies échographiques, il est encore difficile actuellement d'évaluer le risque fœtal, car il n'existe pas de paramètres fiables pour faire la distinction entre un fœtus infecté et un fœtus cliniquement atteint.

Le diagnostic d'infection fœtale est réalisé par la mise en évidence du génome viral (par PCR) dans le LA. La spécificité de la PCR est proche de 100 % et sa sensibilité est supérieure à 95 % si l'amniocentèse est réalisée au moins 6 semaines après l'infection maternelle et à partir de la 22<sup>ème</sup> SA (terme à partir duquel la maturation du système urinaire fœtal est acquise), ou dès la constatation des anomalies échographiques. Une meilleure sensibilité de la PCR par rapport à la culture dans ce contexte a clairement été démontrée dans la littérature [6].



La vérification de la négativation de la virémie maternelle, avant de pratiquer un diagnostic anténatal, est souhaitable pour éviter tout risque d'infection fœtale iatrogène. Même ce risque est probablement exceptionnel. En effet, le virus peut persister dans le sang pendant plusieurs semaines, expliquant qu'une infection acquise dans les semaines précédant la conception peut entraîner une infection fœtale. La recherche du génome viral est constamment positive si le CMV est responsable des anomalies échographiques observées. Cependant, même si la détection du CMV dans le LA est étroitement corrélée à l'infection fœtale (la valeur prédictive positive du diagnostic anténatal étant proche de 100%), la présence du virus dans le LA ne préjuge en rien du degré de l'atteinte clinique du fœtus. La ponction de sang fœtal, en vue de la recherche des IgM ou de l'ADN viral n'est pas recommandée car, quelle que soit la technique utilisée, elle ne permet pas de détecter avec une sensibilité suffisante l'infection à CMV.

A la naissance, la recherche des IgM dans le sang du nouveau-né n'est positive que dans la moitié des infections congénitales à CMV. Plus couramment, la recherche de CMV est effectuée par culture et/ou PCR dans les urines. C'est un examen d'une excellente sensibilité et spécificité si le prélèvement est effectué dans les 10-15 jours qui suivent l'accouchement. Le prélèvement de salive peut s'avérer plus pratique à réaliser, mais toute positivité salivaire doit être confirmée par une recherche de virus sur les urines (contamination possible du prélèvement de salive par le lait maternel infecté en cas d'allaitement maternel). La recherche du virus est également possible à partir du liquide céphalo-rachidien ou de différents organes/fluides selon le contexte clinique.

Les infections périnatales étant très fréquentes, lorsque des anomalies (notamment, la surdité) sont constatées plusieurs mois après la naissance, ni la sérologie, ni la détection du virus dans les urines ne permettent d'incriminer le CMV

comme agent responsable de ces manifestations cliniques. Il faut alors avoir recours à la recherche rétrospective du génome viral par PCR à partir du sang séché conservé sur les cartes de Guthrie [7].

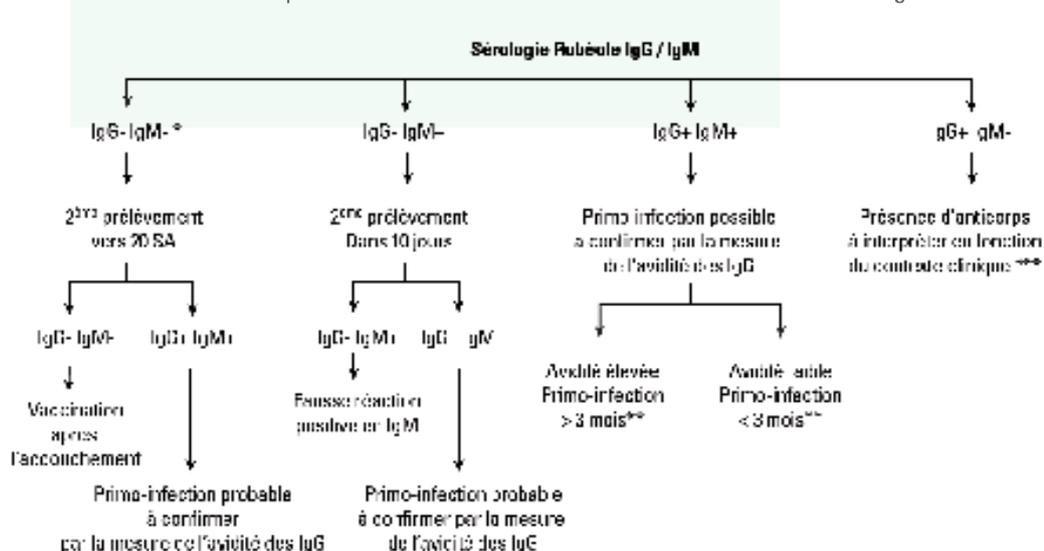
## Rubéole

La rubéole est asymptomatique dans 50 % des cas ce qui rend indispensable le diagnostic biologique.

L'isolement du virus ou la recherche du génome viral est possible à partir de prélèvements de gorge ou d'urine mais, en raison des difficultés pratiques de ces examens et de leur caractère aléatoire, ils ne sont pas réalisés dans le cadre du diagnostic de l'infection maternelle. Le diagnostic est donc essentiellement sérologique : mise en évidence d'une séroconversion et/ou détection d'IgG et d'IgM spécifiques. Toutefois, en l'absence de contexte clinique évocateur de rubéole, la séroconversion et/ou la présence d'IgM spécifiques doit être interprétée et annoncée avec prudence. La réalisation d'examen complémentaires dans des laboratoires spécialisés (avidité des IgG spécifiques et/ou western blot à la recherche d'anticorps protecteurs) peut être justifiée.

Une sérologie de dépistage peut être effectuée pendant la grossesse en vue de dépister les femmes enceintes séronégatives afin de leur proposer la vaccination après l'accouchement. Par ailleurs, le biologiste peut être amené à faire le diagnostic d'une primo-infection rubéoleuse maternelle dans les circonstances suivantes : contage, signes cliniques évocateurs et sérologies évocatrices d'une infection active : séroconversion, augmentation du titre des anticorps.

La conduite à tenir et l'interprétation des résultats de la sérologie rubéoleuse effectuée en cours de grossesse sont détaillées dans la Figure 5.



**Figure 5 :** Interprétation du dépistage systématique de la rubéole.

\* Attention, en cas d'éruption il faut renouveler la sérologie 5-7 jours plus tard car les IgM apparaissent quelques jours après le début des signes cliniques

\*\* Interprétation en fonction du terme de la grossesse

\*\*\* Terme de la grossesse, notion d'éruption ou de contage



Par ailleurs, pour effectuer correctement un diagnostic d'infection rubéoleuse, il convient de savoir que :

- Les IgM spécifiques apparaissent dans les 3 jours qui suivent l'éruption et disparaissent en général en 4 à 8 semaines, selon les sujets et les techniques utilisées (le premier jour de l'éruption, les IgM sont très fréquemment absentes)

- Les IgG apparaissent, en général, un peu plus tardivement (environ 5-8 jours après le début de l'éruption), leur titre maximal au plateau, ainsi que le titre résiduel, sont extrêmement variables et un titre élevé d'IgG n'est pas en soi un marqueur de primo-infection récente

- Les IgM spécifiques sont pratiquement toujours détectées au cours des primo-infections récentes (datant de moins de 2 mois), lorsque l'on utilise des techniques suffisamment sensibles. Mais, elles peuvent aussi être mises en évidence dans d'autres situations (plusieurs mois/années après vaccination, au cours des réinfections, en raison de stimulations polyclonales non spécifiques du système immunitaire)

- Lorsque des IgM spécifiques sont présentes, il est recommandé d'avoir recours à la mesure de l'avidité des IgG pour infirmer ou confirmer une primo-infection. Une faible avidité correspond généralement à une primo-infection récente (< 1-3 mois), une forte avidité correspond à une primo-infection datant en général de plus de 3 mois. Il est à noter qu'après vaccination, l'avidité "mature" plus lentement qu'après infection naturelle et se stabilise souvent à des niveaux d'indice moyen [8]

- Lorsque le titre d'IgG est faible, le résultat de la mesure de l'indice d'avidité doit être interprété avec prudence car il peut être faussement bas. Attention : souvent l'observation de titres stables d'anticorps est considérée comme rassurante ; en fait, selon les sujets testés et la technique utilisée, les anticorps peuvent atteindre un plateau en quelques jours ou en quelques semaines après le début de l'infection

- Il existe des différences, importantes de sensibilité entre les techniques de dosages des IgG et, malgré l'utilisation d'unités internationales, les résultats ne peuvent pas être comparés s'ils n'ont pas été obtenus avec la même technique. On peut donc, avoir recours au Western blot pour déterminer la spécificité des anticorps en cas de discordance.

Le diagnostic prénatal de l'infection fœtale repose soit sur la mise en évidence des IgM rubéoleuses dans le sang fœtal, soit sur la mise en évidence du génome viral dans le LA par RT-PCR. La spécificité de ces deux procédures est voisine de 100 % et leur sensibilité est supérieure à 90 %, à condition que :

- Un délai d'au moins 6 semaines entre l'infection

maternelle et la ponction de LA soit respecté

- Les prélèvements ne soient pas effectués avant la 22<sup>ème</sup> SA

- Le sang fœtal soit conservé et transporté à +4°C au laboratoire et que le LA soit impérativement conservé et transporté congelé (en raison de l'extrême fragilité de ce virus).

Le diagnostic post-natal de l'infection congénitale repose sur la mise en évidence des IgM spécifiques, de préférence par une technique d'immunocapture. La sensibilité et la spécificité de cet examen sont voisines de 100 %. Le diagnostic post-natal de l'infection congénitale doit être réalisé même si l'enfant est asymptomatique, car un enfant infecté in utero peut développer des séquelles, notamment auditives, à distance de la naissance. De plus, ces enfants vont excréter du virus dans leur salive et dans leurs urines pendant plusieurs mois (voire plusieurs années) et seront donc potentiellement contaminants pour l'entourage. L'absence ou la présence d'excrétion virale pourra être contrôlée par PCR sur la salive ou sur les urines (le transport de ces prélèvements doit également être effectué à -20°C).

## Références

- 1- Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17(1):32-6.
- 2- Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissoud C, Peyron F, Garcia-Meric P et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet Gynecol.* 2010;115(4):727-33.
- 3- Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognosis marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(3):797-802.
- 4- Fowler KB and Pass RF. Risk factor for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women : exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics.* 2006;118(2):286-92.
- 5- Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier AG, Parent-du-Châtelet I, Senat MV, Frydman R et al. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy ? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol.* 2009;46 Suppl 4:S49-53.
- 6- Revello MG, Sarasini A, Zavattoni M, Baldanti F, Gerna G. Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus by a modified nested polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1998;56(1):99-103.
- 7- Vauloup-Fellous C, Ducroux A, Couloigner V, Marlin S, Picone O, Galimand J, et al. Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots : retrospective study of CMV congenital infection. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3804-6.
- 8- Vauloup-Fellous C and Grangeot-Keros L. Humoral immune response after rubella primary infection and after vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(5):644-7. ■