

Mycoplasma pneumoniae: IgG and IgM antibody response in presence of different antigens. Evaluation of commercial tests

Mariella Tonella, Antonietta Maronati, Cinzia Giraldo, Antonella Pozzoni, Maria Rosaria Cassani, Susanna Maltagliati, Luisa Colombo, Valeria Contato, Martina Iemmolo, Angelo Vincenzi, Laura Vismara, Giulio Vignati, Bianca Osnaghi

U.O. Laboratorio Analisi e Microbiologia, Ospedale "G. Fornaroli"

Key words: Antibodies, chemiluminescenza, ELISA, IgG, IgM

***Mycoplasma pneumoniae*: quale risposta anticorpale IgG e IgM in presenza di diversi antigeni. Valutazione di test commerciali**

SUMMARY

Background. PI adhesin protein (170-kDa) is responsible for the interaction between *M. pneumoniae* and the host. Such protein is the target of specific antibodies produced by the host in response to *M. pneumoniae* infection.

Objectives. The aim of this study was to evaluate the performance of serological tests for *Mycoplasma pneumoniae* IgG and IgM on chemiluminescence analyzer LIAISON® and to demonstrate how the determination of specific antibodies is the main tool for accurate diagnosis of *Mycoplasma* infection.

Study Design. Eighty-one unselected samples were assayed by ELISA kits Vircell IgG and IgM (bacterial lysate) and LIAISON® *Mycoplasma* IgG and IgM (recombinant protein PI). The discordant samples were tested with ELISA Savyon Serorecombinant IgG and IgM (recombinant protein PI) and reclassified according to the consensus rule.

Results. Fifty-one samples were concordant between ELISA Vircell IgG and LIAISON® *Mycoplasma* IgG. After resolution of the 30 discordant: twenty-eight samples were classified concordant negative and one positive. Seventy-seven samples were concordant between ELISA Vircell IgM and LIAISON® *Mycoplasma* IgM. After resolution of 4 discordant samples: three samples were classified as negative.

Conclusions. The higher correlation between LIAISON® and Savyon Serorecombinant is determined by the use of recombinant protein PI in the solid phase and the type of cut-off calculation allows high specificity and sensitivity. The *Mycoplasma pneumoniae* IgG and IgM kits, performed in full automation on LIAISON® analyzer, show characteristics comparable to other kits and an easy handling of the sample.

INTRODUZIONE

Mycoplasma pneumoniae è un comune agente di polmonite acquisita in comunità (6,8). È stato riportato essere l'agente eziologico di fino al 30% di tutti i casi di polmonite (5). È prevalente nelle prime due decadi di vita, ma può essere riscontrato anche in età adulta.

Mycoplasma pneumoniae aderisce all'epitelio respiratorio ciliato dell'ospite tramite la proteina denominata P1 con peso molecolare di 170-kDa che svolge funzione di adesina ed è responsabile dell'interazione tra *Mycoplasma pneumoniae* e l'ospite. L'azione patogena consiste nel danneggiamento degli epitelii della mucosa respiratoria con infiltrazione di citochine e cellule mononucleari. La proteina P1 è il target specifico degli anticorpi prodotti dall'ospite in risposta all'infezione da *Mycoplasma pneumoniae* (1-4). Gli anticorpi IgM specifici compaiono precocemente

all'inizio della malattia e raggiungono il picco massimo in 1-4 settimane per poi declinare rapidamente (7), mentre i livelli di IgG si alzano più lentamente delle IgM, ma rimangono determinabili più a lungo.

Lo scopo di questo studio è valutare la performance dei saggi sierologici *Mycoplasma pneumoniae* IgG ed IgM, recentemente introdotti sul mercato sull'analizzatore in chemiluminescenza LIAISON® e dimostrare, come la determinazione specifica di anticorpi diretti contro *Mycoplasma pneumoniae* sia il principale strumento per una diagnosi sierologica accurata ed affidabile dell'infezione da *Mycoplasma pneumoniae*.

MATERIALI E METODI

Ottantuno campioni non selezionati ed afferenti al Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Magenta (MI) sono stati saggiati con i kit ELISA

Corresponding author: Bianca Osnaghi

U.O. Laboratorio Analisi e Microbiologia, Ospedale "G. Fornaroli"

Via al Donatore di Sangue, 50 - 20013 Magenta - Tel.: 02 97963331 - Fax: 02 97963842

E-mail: bianca.osnaghi@ao-legnano.it

Mycoplasma pneumoniae VIRCELL IgG e IgM (utilizzanti come antigene un lisato batterico) (VIRCELL S.L., Santa Fe, Spain) sullo strumento DSX ed i kit LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgG (utilizzante la proteina ricombinante P1), LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgM (con proteina ricombinante P1 e lisato batterico) sull'analizzatore LIAISON® (DiaSorin S.p.A, Saluggia, Italy). I campioni discordanti sono stati dosati con i kit ELISA SAVYON Serorecombinant IgG (con

proteina ricombinante P1), ed ELISA SAVYON Serorecombinant IgM (con proteina ricombinante P1 e antigene nativo) (SAVYON Diagnostics Ltd, Ashdod, Israel) e riclassificati con interpretazione finale basata sulla regola del consenso secondo cui si accetta la concordanza di due su tre risultati ottenuti. Il valore soglia discriminante tra presenza ed assenza di IgG *anti-Mycoplasma pneumoniae* per LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgG è di 10 AU/mL, per ELISA VIRCELL IgG è

Tabella 1. Confronto tra i risultati ottenuti con il kit LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgG e VIRCELL IgG (su strumento DSX).

Risultati con il kit LIAISON® IgG	Risultati con il kit VIRCELL IgG			
	positivi	equivoci	negativi	totale
positivi	13		1*	14
negativi	25**	4**	38	67
totale	38	4	39	81

Consenso su Positivi: 34,21%

Consenso su Negativi: 97,44%

Agreement/Concordanza: 62,96%

* Positivo al consensus;

** 28/29 negativi al consensus

Tabella 2. Confronto tra i risultati ottenuti con il kit LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgG e consensus.

Risultati con il kit LIAISON® IgG	CONSENSUS			
	positivi	equivoci	negativi	totale
positivi	14			14
negativi	1		66	67
totale	15		66	81

Consenso su Positivi: 93,33%

Consenso su Negativi: 100%

Agreement/Concordanza: 98,77%

Tabella 3. Confronto tra i risultati ottenuti con il kit LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgM e VIRCELL IgM (su strumento DSX).

Risultati con il kit LIAISON® IgM	Risultati con il kit VIRCELL IgM			
	positivi	equivoci	negativi	totale
positivi	5	1*		6
negativi	2**	1**	72	75
totale	7	2	72	81

On pos: 71,43% - On Neg: 100% - Agr: 95,06%

* Negativo al consensus;

** 3/3 negativi al consensus

Tabella 4. Confronto tra i risultati ottenuti con il kit LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgM e consensus.

Risultati con il kit LIAISON® IgM	CONSENSUS			
	positivi	equivoci	negativi	totale
positivi	5		1	6
negativi			75	75
totale	5		76	81

On pos: 100%

On Neg: 98,68%

Agr: 98,77%

di 10 Index (con un valore equivoco pari al valore Index \pm 10%), per ELISA SAVYON Serorecombinant IgG è di 10 BU/mL. Il valore soglia per LIAISON® *Mycoplasma Pneumoniae* IgM è stato fissato a 10 Index, per ELISA VIRCELL IgM è di 10 Index (con un valore equivoco pari al valore Index \pm 10%), per ELISA SAVYON Serorecombinant IgM è di 10 COI o cut-off Index (con un valore equivoco pari al valore Index +10%).

RISULTATI

Per la ricerca delle IgG, 51 degli 81 campioni sono risultati concordanti con i metodi ELISA VIRCELL IgG e LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgG e 30 sono risultati discordanti. I campioni equivoci sono stati inseriti nell'analisi. I dati sono riportati in tabella 1.

Dopo risoluzione dei 30 discordanti, utilizzando il kit ELISA SAVYON Serorecombinant IgG, 28/29 campioni (negativi al test LIAISON®) sono stati classificati negativi e 1/1 (positivo con il metodo LIAISON®) è stato classificato positivo. I risultati sono stati riclassificati come indicato in tabella 2. Il campione discordante rimasto, confrontato con i dati clinici disponibili, potrebbe indicare una maggiore sensibilità del metodo di riferimento per determinare le IgG.

Per la ricerca delle IgM, 77 campioni sono risultati concordanti con i metodi ELISA VIRCELL IgM e LIAISON® *Mycoplasma pneumoniae* IgM e 4 campioni discordanti. I campioni equivoci sono stati inseriti nell'analisi. I dati sono riportati in tabella 3.

Dopo risoluzione dei 4 discordanti con kit ELISA SAVYON Serorecombinant IgM, 3/3 campioni (classificati negativi con il metodo LIAISON®) sono stati classificati negativi e il campione positivo (al test LIAISON®) è stato classificato negativo. I risultati sono stati riclassificati come indicato in tabella 4. Il campione discordante rimasto presenta valori compatibili

con una infezione in fase transiente in risoluzione.

DISCUSSIONE

Dai nostri dati risulta una ottima concordanza tra metodi LIAISON® e SAVYON Serorecombinant determinata dall'utilizzo per entrambi i metodi della proteina ricombinante P1 come antigene assorbito sulla fase solida e dal calcolo del cut-off in modo tale da permettere una elevata specificità e sensibilità. I kit *Mycoplasma pneumoniae* IgG e IgM eseguibili in completa automazione sull'analizzatore LIAISON® dimostrano caratteristiche comparabili ad altri kit presenti sul mercato ed una agevole gestione del campione.

BIBLIOGRAFIA

1. Lieberman D, Lieberman D, Ben-Yaakov M, et al. Infectious aetiologies in elderly patients hospitalised with non-pneumonic lower respiratory tract infection. *Age Ageing* 2003; 32: 95-101.
2. Lieberman D, Lieberman D, Ben-Yaakov M, et al. Serological evidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in acute exacerbation of COPD. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 1-6.
3. Lieberman D, Lieberman D, Korsonsky I, et al. A comparative study of the etiology of adult upper and lower respiratory tract infections in the community. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 21-8.
4. Lieberman D, Lieberman D, Printz S, et al. Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 406-10.
5. Lieberman D, Schlaeffer F, Boldur I, et al. Multiple pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia: a one year prospective study of 346 consecutive patients. *Thorax* 1996; 51: 179-84.
6. Loens K, Goossens H, Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1055-69.
7. Seggev JS, Sedmak GV, Kurup VP. Isotype-specific antibody responses to acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 67-73.
8. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 697-728.