

Ricerca di anticorpi IgA anti-*Chlamydia trachomatis* nel liquido seminale mediante un test ELISA sperimentalmente modificato

Gino Ciarrocchi¹, Angela Maria Neri¹, Giuseppe Rondello¹, Giorgio Verna¹, Giancarlo Gherardi¹, Massimo Tocchini¹, Giancarlo Balercia², Massimo Polito³, Giovanni Muzzonigro³

¹ U.O. Laboratorio Analisi, settori Sierologia e Microbiologia, Ospedali Riuniti "Torrette-Lancisi-Salesi" di Ancona;

² U.O. Clinica di Endocrinologia, Università degli Studi di Ancona;

³ U.O. Clinica di Urologia, Università degli Studi di Ancona

Key words: *Chlamydia trachomatis* infection, genital tract, ELISA test

SUMMARY

Chlamydia trachomatis (Ct) is a relevant agent of male genital tract infections and some correlated complications, such as epididymitis. The diagnosis of infection by the highly sensitive nucleic amplification test is hampered on semen specimen because of many inhibitory factors. Instead, a reliable serologic test able to demonstrate the involvement of the upper genital tract should be of clinical utility.

Two groups of a total of 505 male patients, suspected for infertility and/or genital infections were examined for detecting direct and serologic markers of chlamydia on urethral swabs, semen and serum specimen, respectively. By the amplified nucleic DNA-*Chlamydia trachomatis* LCR test ("gold standard"), a total of 16 patients resulted as positives. On the semen specimen a positive detection of specific Ct-IgA antibodies was obtained by the ELISA and the referenced MIF test in 15 patients, thus demonstrating a local immune response to *Chlamydia* infection. Nevertheless, a few of these Ct-IgA positive patients resulted with negative DNA-Ct detection and with Ct-IgA negative results in serum.

The significance of the study points out on the previously demonstrated local immune response, often without detection of circulating specific IgG and/or IgA anti-Ct antibodies. Furthermore, it is emphasized that the presence of Ct-IgA on semen may not correlate with the amplified direct test results, due to the fact that the infection can already have ascended to the epididymis, and thus escapes from peripheral direct detection.

On the basis of the above experienced results, the local specific Ct-IgA antibodies detection seems to be a previous marker of an especially silent ongoing *Chlamydia* infection.

INTRODUZIONE

Chlamydia trachomatis (Ct) è un importante agente eziologico di infezioni del tratto genitale maschile e di severe sequele quali epididimiti (4). Tuttavia, differenti studi hanno fornito solo parzialmente una convincente evidenza di una correlazione tra infezione da Ct e qualità morfo-cinetica del seme, ovvero di compromessa fertilità. D'altra parte, reazioni infiammatorie locali sono associate ad azospermia ostruttiva e ridotta motilità nemaspermica (2, 5, 10).

L'affidabile ed altamente sensibile metodo di amplificazione nucleica per la rilevazione di DNA di Ct, applicato su campioni uretrali o urine di primo mitto, appare inefficace sui campioni spermatici a causa di molteplici fattori di inibizione (7). Di conseguenza, un test sierologico affidabile e non invasivo, capace di rivelare una silente infezione da Ct, ascesa nel tratto genitale maschile profondo (epididimo e ghiandola prostatica) potrebbe costituire un utile presidio nella definizione diagnostica e nel follow up clinico di pazienti con turbe non acute della sfera genito-urinaria.

SCOPO

Verificare il ruolo diagnostico di anticorpi IgA

anti-Ct presenti nel fluido seminale mediante un test ELISA sperimentalmente modificato.

MATERIALI E METODI

Un totale di 505 soggetti maschi in età fertile furono studiati in due differenti periodi di tempo. Il primo: durante sei mesi, da aprile a settembre 2003, 242 soggetti maschi, afferenti presso le U.O. di Clinica endocrinologica e di Clinica urologica dell'Ospedale Policlinico "Umberto I" di Ancona, furono esaminati per sospetto diagnostico di infertilità e/o di infezioni genito-urinarie.

Il secondo: durante undici mesi, da gennaio a novembre 2004, 263 pazienti maschi con analoghe caratteristiche cliniche e diagnostiche furono altresì studiati.

Da tutti i pazienti furono raccolti campioni di seme per esame morfo-cinetico, coltura microbiologica e ricerca di IgA specifiche anti-Ct.

Tamponi uretrali o campioni di urina primo mitto furono raccolti per la ricerca di DNA di Ct; infine, campioni di sangue furono prelevati per la ricerca serica di IgG e IgA anti-Ct.

Allo scopo, tre test di laboratorio furono impiegati:

- Un test ELISA per ricerca di IgA-Ct (Sero-Ct IgA - Savyon Diagnostics Israel/Eurospital Italia

- Un test di microimmunofluorescenza (MIF) per ricerca di IgA-Ct (Savyon Diagnostics Israel/Eurospital Italia)
- Un test di amplificazione genica con metodo Ligase Chain Reaction (LCR) per ricerca di DNA di Ct (Abbott Ltd USA)

I campioni di seme furono centrifugati per 10 minuti a 2000 rpm; il surnatante fu separato dal pellet e conservato a -20°C fino al momento della seduta analitica.

Modifica sperimentale del test ELISA

Con lo scopo di poter impiegare il test ELISA, validato per campioni di siero, anche su campioni di liquido seminale, fu condotta una seduta analitica preliminare:

- 10 campioni di liquido seminale di pazienti non infettati da Ct (DNA-Ct e MIF IgA-Ct negativi) furono diluiti con il sample diluent del test ELISA a diluizioni scalari da 1:2 a 1:32 (verifica di falsa positività).
- Diluizioni scalari (da 1:2 a 1:32) del Siero di Controllo Positivo del test ELISA, contenente IgA anti-Ct, furono aggiunte ad un campione di liquido seminale negativo per Ct, ripetendo la prova per quattro volte (verifica di falsa negatività).

RISULTATI

I criteri adottati per stabilire una vera infezione da Ct furono i seguenti:

- ricerca positiva di DNA-Ct da tamponi uretrali o campioni di urina (“gold standard”), accompagnata o non da rivelazione di IgA nel seme e/o di IgG e IgA nel siero;
- ricerca positiva di IgA-Ct nel seme e/o nel siero di pazienti in precedenza positivi per DNA-Ct.

Sulla base delle prove sperimentali preliminari (tabelle 1 e 2), la diluizione dei campioni di seme ritenuta più attendibile fu quella compresa tra 1:8 e 1:16.

Nel primo gruppo di 242 pazienti studiati, 15/242 mostravano nel liquido seminale presenza di IgA-Ct al test ELISA vs. i 12/242 positivi ottenuti con il test MIF IgA-Ct (tabella 3).

I risultati di IgG e IgA nel siero non sono mostrati poiché i campioni furono raccolti solo parzialmente.

La ricerca di DNA-Ct risultò positiva in 5 pazienti; tutti i cinque soggetti mostravano nel contempo elevati valori di IgA-Ct sia al test ELISA che al test MIF di riferimento (tabella 4).

Nel secondo gruppo di 263 pazienti, un totale di 15/263 mostravano markers suggestivi di infezione da Ct: di questi, 11/15 risultavano positivi per DNA-Ct; 10/15 avevano elevati livelli di IgA-Ct nel liquido seminale al test ELISA, confermati in 9/10 con il test MIF; solamente 6/15 pazienti mostravano livelli significativi di IgA.

I risultati complessivi di questo secondo gruppo sono riassunti nella tabella 5.

Tabella 1. Verifica di falsa positività di IgA-Ct in 10 campioni di liquido seminale raccolti da pazienti negativi per DNA-Ct e IgA-Ct nel siero

LIQUIDO SEMINALE	DILUIZIONE 1:2	DILUIZIONE 1:4	DILUIZIONE 1:8	DILUIZIONE 1:16	DILUIZIONE 1:32
	Falsa positività IgA-Ct	Falsa positività IgA-Ct	Falsa positività IgA-Ct	Falsa positività IgA-Ct	Falsa positività IgA-Ct
1	si	si	si	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	si	si	dubbio	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	si	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

Tabella 2. Verifica di falsa negatività di IgA-Ct con test ELISA ripetuto in un campione di liquido seminale aggiunto di Siero Controllo positivo IgA-Ct a crescente diluizione

Liquido seminale + sample buffer	Controllo Positivo IgA-Ct (PC)	Diluizione 1:2	Diluizione 1:16	Diluizione 1:4	Diluizione 1:8	Diluizione 1:32
diluizione 1:2	diluizione finale	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
		D.O.	D.O.	D.O.	D.O.	D.O.
I° test		1.132	0.908	0.610	0.418	0.213
II° test		1.160	0.882	0.652	0.390	0.185
III° test		1.108	0.850	0.670	0.435	0.170
IV° test		1.202	0.931	0.702	0.480	0.140
CUT-OFF D.O.	0.510					
PC non dil. D.O.	1.460					
NC non dil. D.O.	0.255					

Tabella 3. Prevalenza di IgA-Ct in campioni di liquido seminale di 242 pazienti maschi (gruppo 1) ottenuta con i test ELISA e MIF

	TEST ELISA IGA-CT	TEST MIF IGA-CT
positivo	15	12
border-line	0	1
negativo	227	229
Totale	242	242

Tabella 4. Prevalenza di IgA-Ct in 5 liquidi seminali di pazienti positivi al test di amplificazione genica DNA-Ct (LCR)

PAZIENTI POSITIVI AL TEST DNA-CT (LCR)	RISULTATI AL TEST ELISA IGA-CT	RISULTATI AL TEST MIF IGA-CT
	(VALORI NORMALI: <100 U)	(VALORI NORMALI: TITOLO<1:2)
1	267	1:16
2	381	1:16
3	465	1:32
4	196	1:16
5	351	1:16

Tabella 5. Riassunto della prevalenza di markers clamidiali diretti e sierologici in 263 pazienti maschi (gruppo 2)

	ELISA IgA-Ct liq.seminale	MIF IgA-Ct liq.seminale	LCR DNA-Ct t. uretra/urina	IgG/IgA-Ct siero	clinica
Valori normali	<0,9 index	<1:2 titolo	negativo	<0,9 index	
1	Pos 2,10	Pos 1:8	Pos	IgG + IgA-	secrez. uretr.
2	Pos 1,60	Pos 1:4	Pos	IgG - IgA+	asintomatico
3	b.l. 1,09	-	-	IgG + IgA-	asintomatico
4	Pos 2,02	Pos 1:8	Pos	IgG + IgA+	nd
5	Pos 1,36	Pos 1:2	Pos	IgG + IgA-	secrez. uretr.
6	b.l. 0,93	-	-	IgG + IgA-	nd
7	Pos 2,9	Pos 1:8	Pos	IgG + IgA+	secrez. uretr.
8	Pos 2,16	Pos 1:16	-	IgG + IgA+	nd
9	Pos 1,8	Pos 1:8	Pos	IgG + IgA-	secrez. uretr.
10	Pos 1,10	-	Pos	IgG - IgA-	Secrez.uretr.
11	-	-	-	IgG - IgA-	asintomatico
12	-	-	Pos	IgG - IgA-	nd
13	-	-	Pos	IgG + IgA-	nd
14	Pos 5,35	Pos 1:16	Pos	IgG - IgA-	secrez. uretr.
15	Pos 4,45	Pos 1:64	Pos	IgG +- IgA-	secrez. uretr.

DISCUSSIONE

I risultati preliminari ottenuti mediante l'impiego di una procedura ELISA, modificata ed applicata alla ricerca di IgA anti-*Chlamydia trachomatis* nel liquido seminale, sembrano fornire un interessante presidio diagnostico nelle infezioni inerenti il tratto genitale maschile, in specie quelle che mostrano marker d'infezione ancora attiva, senza tuttavia la dimostrazione diretta dell'antigene o parti di esso.

Eseguito il test come sopra descritto, si attenuano gli effetti interferenti di inibitori legati alla matrice del seme e ad enzimi proteolitici agenti nel campione. La diluizione 1:8 dei campioni mostra di aver fornito i risultati migliori, poiché diminuendo la concentrazione di (potenziali) inibitori, permette nel contempo la rivelazione di anticorpi specifici IgA anti-Ct.

È significativa a nostro avviso l'associazione di DNA-Ct presente nell'uretra ed elevati livelli di IgA-Ct nel seme, prova del coinvolgimento del tratto genitale nell'infezione. Inoltre, il test MIF

IgA-Ct ha confermato in larga parte quanto rivelato con il test ELISA nei campioni di seme.

Riguardo ai caratteri morfo-cinetici degli sperma, il nostro studio non ha rivelato una significativa differenziazione (dati non mostrati) tra pazienti con infezione da Ct e quelli non infettati.

Lo studio conferma, altresì, precedenti ed analoghe esperienze (9), in cui fu mostrata la discrepanza tra presenza di anticorpi IgA-Ct nel seme e loro assenza nel circolo sanguigno. Secondo Witkins (9), il tratto genitale maschile è capace di instaurare una risposta immune localizzata, senza un riscontro sistemico; inoltre, non è infrequente una esposizione asintomatica a *Chlamydia trachomatis*.

Infine, viene sottolineato che la rivelazione di IgA-Ct locali non sempre correla con i risultati ottenuti con i test diretti di amplificazione nucleica, ciò derivando dal fatto che l'infezione può già essere risalita all'epididimo ed alla prostata, nel qual caso si sottrae alla rivelazione periferica.

Sulla base di quanto osservato, la ricerca di IgA

anti-Ct nel fluido seminale e, potenzialmente, in altri fluidi biologici, appare di grande interesse, in specie nelle infezioni silenti cronicizzate, foriere di rilevanti sequele cliniche.

BIBLIOGRAFIA

1. Ciarrocchi G, et al. *Chlamydia trachomatis* in male infertility. *Microbiologia Medica* 1997; 12 (2): 58-9.
2. Keck C, Gerber-Shafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 1998; 4 (6): 891-903.
3. Mazzoli S. Can the detection of antibodies to *Chlamydia* support the specific diagnosis in the various manifestation of *Chlamydia* infections? In: Proceedings of the Third Meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Wien, 1996 sept 11-14: 354.
4. Nickel JC. Chronic Prostatitis: an infection disease? *Infect Urol* 2000; 13 (2): 31-8.
5. Ochsendorf FR, Ozdemir K, Rabenau H, et al. *Chlamydia trachomatis* and male infertility: *Chlamydia*-IgA antibodies in seminal plasma are *Chlamydia trachomatis* specific and associated with an inflammatory response. *Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 12 (2): 143-52.
6. Shuppe HC, Bispink G, Peet DJ, Propping D, Bottcher M, Dettlaff S. The significance of antibodies against *Chlamydia trachomatis* in seminal plasma. IVth European *Chlamydia* Congress. 2000 Helsinki
7. Weidner W, Krause W, Ludwig M. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 1999; 5 (5): 421-32.
8. Witkin SS, Munoz MG, Jeremias J. The 60 kDa heat shock protein in human semen: relationship with antibodies to spermatozoa and *Chlamydia trachomatis*. *Hum Reprod* 1996; 11 (12): 2600-3.
9. Witkin SS, Engel S, Eggert-Kruse W, et al. Secretory and circulating anti-*Chlamydia* IgA antibodies in infertility. Medac workshop in "Xth Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Infertility". Hamburg, June 28th 1995.
10. Wolff H, Neubert U, Zebhauser M, Bezold G, Korting HC, Meurer M. *Chlamydia trachomatis* induces an inflammatory response in the male genital tract and is associated with altered semen quality. *Fertil Steril* 1991; 55 (5): 1017-9.

Gino Ciarrocchi

U.O. Laboratorio analisi
A.O. Ospedali Riuniti Ancona
Via Conca 60020 - Torrette di Ancona
Tel 071-5964251; Fax 071-5964638
E-mail: ciarrokki@libero.it