

SHORT COMMUNICATIONS

Comparative evaluation of RAD 120 in the TORCH diagnostic

Giuseppe Ivan Potente¹, Salvatore Nisticò¹, Maria Teresa Cerminara², Emilia Zangari²,
Angela Luciano¹

¹S.C. Microbiologia e Virologia ASP Catanzaro

²Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia Università Magna Grascia di Catanzaro

KeyWords: Torch, Elisa, Fluorescent assay

Valutazione comparativa di RAD 120 nella diagnostica TORCH

SUMMARY

This work is a comparative clinical trial about the performance of a new automatic system RAD 120, with final fluorescent determination, and ALISEI, a referential system that works in classical ELISA. This comparison show that RAD120 has some hardware and software problems, that determinate false positive dosages, especially in IgM of Toxoplasmosis and Cytomegalovirus. This system is in evaluation too after adjournment, and only after this second test, we could be sure if RAD 120 can be became another referential system in torch diagnosis.

Received August 5, 2008

Accepted October 8, 2008

INTRODUZIONE

Le patologie dello sviluppo prenatale appartengono ad un gruppo eterogeneo di malattie e vengono generalmente suddivise in:

- malattie causate da agenti teratogeni (chimici, fisici, biologici)
- malattie geneticamente determinate.

L'insorgere di una di queste nella fase di sviluppo intrauterino del nascituro può avere come conseguenza la perdita del feto o lo sviluppo di malformazioni congenite.

In tali situazioni il quadro patologico si presenta estremamente diversificato e dipende da:

- l'agente etiologico
- il periodo di sviluppo fetale in cui l'infezione si determina ed agisce.

In tale ambito sono da inquadrare le infezioni causate dagli agenti del gruppo TORCH, acronimo utilizzato per indicare principalmente infezioni da agenti come *Toxoplasma*, *rubella virus* e *citomegalovirus*, oltrechè *Coxsackie*, *EBV*, *VZV*, *Parvovirus* umano, *Treponema pallidum*, ecc. (lettera O dell'acronimo come abbreviazione dell'inglese other). La sigla fu coniata nel 1971 da Nahamias e successivamente è diventata di uso comune principalmente per valutare e monitorare lo stato immunologico delle gestanti (27).

Statisticamente è noto che il 2-3% delle anomalie congenite sono da imputare ad infezioni da agen-

ti TORCH, contratte durante la gravidanza (24). La loro patogenicità è legata alla capacità di attraversare la placenta ed infettare il feto, con trasmissione di tipo verticale.

Le infezioni del complesso TORCH possono essere clinicamente asintomatiche oppure presentarsi con sintomatologie a volte sovrapponibili e difficilmente differenziabili su base clinica, per cui risulta di assoluta utilità la determinazione dello stato immunologico delle donne in età fertile e delle gravide, mediante la ricerca delle immunoglobuline della classe IgG ed IgM. Uno studio effettuato su campioni sierici provenienti da donne in gravidanza, con una anamnesi caratterizzata da aborti spontanei, è stata dimostrata la presenza di immunoglobuline appartenenti alla classe M specifiche per il *rubeovirus*, che sembrerebbero quindi correlabili all'alto indice di abortività spontanea evidenziato in queste pazienti (28).

Principali agenti etiologici TORCH oggetto del nostro studio sono:

- *Toxoplasma gondii*.

La trasmissione materno fetale del *Toxoplasma* avviene nella fase parassitemica dell'infezione primaria, fase in cui il patogeno è in grado di attraversare la placenta.

Con il progredire della gravidanza, progressivamente aumenta la frequenza di trasmissione

Corresponding author: Giuseppe Ivan Potente

Viale dei Normanni, 117 - 88100 Catanzaro

Cell. 334 9457269 - E-mail: pinopotente@libero.it

materno - fetale ma diminuisce la gravità dell'infezione connatale. Esiste una frequenza di trasmissione del 10 - 15% nel 1° trimestre, del 40% nel 2°, oltre il 70% nel 3°, con un massimo del 90% nel caso di infezione materna nel 9° mese.

Se l'infezione primaria viene contratta nella prima metà della gravidanza, il passaggio transplacentare causa patologie connatali congenite nelle forme più gravi ma anche più rare poiché l'infezione è spesso abortiva. La manifestazione clinica più comune è la cosiddetta "triade di Sabin" con calcificazioni endocraniche, idrocefalo, coriorretinite e convulsioni.

Se l'infezione primaria viene contratta nella seconda metà della gravidanza sono più frequenti le forme pauci o asintomatiche alla nascita, che non escludono la comparsa di coriorretinite e/o lesioni cerebrali che spesso si manifestano precocemente entro il 1° anno di vita o nell'età adolescenziale.

- *Rubella Virus*:

L'importanza della Rosolia è legata alla possibilità che una donna in gravidanza, sieronegativa, possa contrarre l'infezione nei primi mesi e trasmetterla all'embrione con conseguenze che sono relative all'epoca gestazionale e quindi all'organogenesi (3, 13, 16, 17). Nel corso della viremia materna, il virus raggiunge la placenta infettandola; la placentite diventa fonte di disseminazione virale per il feto o per l'embrione. Le lesioni anatomo-patologiche a livello placentare, determinano una diminuzione dell'apporto ematico con ritardo nell'accrescimento intrauterino ed effetti citopatici diretti su miocardio, orecchio, cervello, ma anche vasculite e necrosi dell'endotelio, interferenza con il normale sviluppo del sistema immunitario. Nell'infezione transplacentare precoce sono ad altissima percentuale aborti spontanei e/o morte intrauterina. Se il feto sopravvive, alla nascita si manifesta la cosiddetta "sindrome da rosolia congenita" caratterizzata da cecità, sordità, microcefalia, ritardo dello sviluppo ed ancora anemia emolitica, epatosplenomegalia, polmonite interstiziale.

Esiste la prevenzione per le donne sieronegative ossia la vaccinazione.

- *Citomegalovirus (CMV)*:

Il *CMV* è la causa più comune di infezione virale congenita e prenatale.

Nella maggioranza dei casi, la prima infezione da *CMV* contratta durante la gravidanza, decorre in modo silente o con sintomatologia simil-influenzale; risultano più esposte le donne che vivono a stretto contatto con bambini piccoli; l'infezione, infatti, si acquisisce nei primi anni di vita ed il bambino, una volta infettato, elimina il virus per un lungo periodo di tempo (22) così da diventare

la fonte di contagio in ambito familiare.

Altra modalità di trasmissione comune nell'adulto è la via sessuale: il virus infatti è eliminato con le secrezioni vaginali e con lo sperma.

Il maggior rischio per il feto di contrarre infezione intrauterina da *CMV* si ha nel caso di infezione primaria materna acquisita nei primi mesi di gravidanza. In questo caso il neonato manifesta la cosiddetta "malattia citomegalica con inclusioni" che si caratterizza per epatosplenomegalia, ittero, sordità, difetti visivi, microcefalia, calcificazioni cerebrali; sovente è fatale ma comunque nei sopravvissuti causa gravi complicazioni neurologiche, perdita dell'udito mono o bilaterale, difetti della locomozione (21).

La diagnosi di laboratorio nelle infezioni da agenti del complesso TORCH comprende:

- metodo diretto: ricerca dell'agente infettante o di suoi componenti nei materiali biologici;
- metodo indiretto: ricerca dell'avvenuta infezione attraverso valutazione sierologica della risposta immunitaria del paziente.

Tra le tecniche sierologiche per la ricerca degli anticorpi specifici, quella più comunemente usata è l'immunoenzimatica (EIA = Enzyme-Immunoassay).

È la più diffusa tra le tecniche sierologiche per la ricerca degli Ab specifici in risposta all'agente infettante. L'EIA comprende tutte le metodiche immunologiche in cui il rivelatore è costituito da un Ag o Ab marcato con un enzima. Il grado di legame tra il reagente marcato ed il suo immuno-reattivo, quindi la concentrazione della sostanza oggetto del dosaggio, viene calcolato mediante misura fotometrica dell'attività dell'enzima (20). Scopo di questo lavoro è la comparazione di due sistemi diagnostici quali ALISEI (Radim) e RAD 120 (Radim), per la determinazione degli anticorpi di classe G ed M diretti contro *toxoplasma*, *Rubella virus* e *citomegalovirus*.

MATERIALI E METODI

Sono stati testati, nel periodo ott. 2007 - feb. 2008, 991 campioni ematici provenienti da vari reparti del P.O. di Lamezia Terme nonché dal territorio afferente allo stesso, appartenenti per il 70% ad individui di sesso femminile e per il 30% da individui di sesso maschile. Il numero dei test effettuati è 1900 di cui, 910 per toxo G e toxo M, 319 per rubeo G e rubeo M, e 671 per cito G e cito M, lo schema riassuntivo e riportato nella tabella 1.

I campioni ematici sono stati raccolti in provette con gel di silicone, centrifugati a 4000 g per 20 minuti e utilizzati per il dosaggio anticorpale da provetta madre.

Entrambi gli strumenti sono prodotti e commer-

cializzati dalla RADIM diagnostics.

Tabella 1. Schema riassuntivo del numero di esami e dei test eseguiti su campioni sierici nel periodo ottobre 2007-febbraio 2008

Periodo	Ottobre 2007 - Febbraio 2008
Numero sieri totali	991
Numero totale test	1900
Toxo G-Toxo M	910
Rubeo G-Rubeo M	319
Cito G-Cito M	671

ALISEI

È uno strumento automatizzato per l'esecuzione di saggi immunoenzimatici, metodo ELISA, su micropiastre, per la determinazione quantitativa e qualitativa degli anticorpi appartenenti alle classi, IgG e IgM, in risposta agli antigeni del complesso TORC. L'esame può essere effettuato su siero o plasma umano.

Il sistema di dispensazione utilizza due aghi indipendenti. Ciascun ago è associato ad un diluitor con due siringhe, rispettivamente per la dispensazione dei reagenti e dei sieri; in sensore di livello dei liquidi ed un sensore di coaguli, presenti in ciascun ago, assicurano il corretto funzionamento del sistema. La stazione di lettura, costituita da un fotometro con otto canali indipendenti a fibre ottiche e da filtri interferenziali montati su un supporto capace di contenere fino ad otto filtri legge a lunghezze d'onda che vanno da 400 a 700 nm; la sorgente luminosa è una lampada alogena. Il calcolo dei risultati viene espresso per le IgG in U.I./ml, mentre per le IgM, che utilizzano un metodo a cattura, si ha un risultato qualitativo ottenuto confrontando la D.O. Del campione rispetto a quella del cut off.

Dagli studi presenti in letteratura emerge per questo sistema/metodo una specificità diagnostica del 99% ed una sensibilità pari al 97%, pertanto in questo studio, è il sistema di riferimento.

RAD 120

È un analizzatore per l'esecuzione in completa automazione, dei dosaggi immunologici su siero, plasma, liquidi biologici: Si tratta di saggio immunoenzimatico con lettura a fluorescenza, introdotto da poco sul mercato, del quale si sta valutando la performance. A differenza di altri strumenti che utilizzano la stessa metodica, il Rad 120 impiega la tecnologia brevettata "Pegasus", in cui la fase solida è costituita da particelle magnetiche di ferrite, rivestite di zirconia. Queste particelle, grazie alle loro particolari caratteristiche chimico-fisiche, risultano avere un'elevata capacità legante verso molecole biologicamente attive, e consentono una rapida e sicura separazione della fase libe-

ra da quella legata. La lettura avviene in fluorescenza a 450 nm utilizzando come substrato il 4-Metilumbelliferil fosfato. I reagenti, liquidi, pronti all'uso, si trovano in apposite cartucce su speciale contenitore rotante per le particelle magnetiche, costantemente azionato dallo strumento, che permette un'efficace sospensione della fase solida ed è allocato in vano refrigerato per mantenere i reattivi on board. Il sistema rimane sempre acceso. Il campione da dosare, per le IgG, viene dispensato in una cuvetta di reazione insieme a microparticelle magnetiche rivestite con l'Ag del complesso TORC. Dopo un periodo di incubazione, il complesso che si è formato, viene lavato e vengono aggiunti Ab anti-IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina, cui segue una seconda incubazione, con aggiunta del substrato 4-Metilumbelliferil-fosfato, il quale verrà convertito in 4-Metilumbelliferone, con lettura finale in fluorescenza a 450 nm. Il segnale misurato sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di IgG specifiche presenti nel campione. Il valore del cut-off (valore soglia) è stato fissato analizzando campioni provenienti da adulti sani. I valori di IgG ed IgM sono espressi entrambi in UI/ml.

RISULTATI

I risultati qualitativi derivanti dall'analisi dei campioni su i due strumenti utilizzati, per ciascun test sono riportati nella tabella 2 e nella tabella 3:

Tabella 2. Dati qualitativi ottenuti con strumento Alisei

	Positivi	Negativi	Dubbi
Toxo G	238	649	23
Toxo M	12	894	4
Rubeo G	223	92	4
Rubeo M	6	313	0
Cito G	533	127	11
Cito M	2	664	5

Tabella 3. Dati qualitativi ottenuti con strumento Rad 120

	Positivi	Negativi	Dubbi
Toxo G	245	660	5
Toxo M	41	852	17
Rubeo G	199	110	10
Rubeo M	19	295	5
Cito G	511	128	32
Cito M	12	651	8

L'analisi comparativa dei dati riportata in tabella 4 mette chiaramente in evidenza una tendenza da parte di Rad 120 a sovrastimare in termini di false positività alcuni dosaggi. Tale dato, che appare contenuto per quanto concerne la ricerca di *toxoplasma* IgG, dove la discordanza in percentuale sulla positività alle IgG è dello 0.77%. quindi

Tabella 4. Dati qualitativi in percentuale ottenuti con i due strumenti Alisei e Rad 120 (ditta Radim)

	Alisei			Rad 120		
	positivi	negativi	debolmente reattivi	positivi	negativi	debolmente reattivi
Toxo G	26.15%	71.32%	2.53%	26.92%	72.53%	0.55%
Toxo M	1.32%	98.24%	0.44%	4.51%	93.63%	1.87%
Rubeo G	69.91%	28.84%	1.25%	62.38%	34.48%	3.13%
Rubeo M	1.88%	98.12%	0.00%	5.96%	92.48%	1.57%
Cito G	79.43%	18.93%	1.64%	76.15%	19.08%	4.77%
Cito M	0.30%	98.96%	0.75%	1.79%	97.02%	1.19%

riconducibile alla diversità metodologica su cui si basano le due strumentazioni utilizzate. diventa statisticamente rilevante negli altri test come Rubeo G con discordanza del 7.53% e Cito G del 3.28%. Quando poi andiamo ad osservare il dato relativo al dosaggio delle IgM, la situazione diventa ancora più stridente con discordanze del 3.19% per il toxo M, 4.08% per il rubeo M e del 1.49% per il cito M, con le considerazioni che devono farsi in termini di quanto un dato falso positivo, specie nel dosaggio delle IgM, può determinare sia in termini di allarme clinico in alcuni pazienti, vedasi gestanti, sia in termini di induzione di nuovi costi per l'accesso ad ulteriori test diagnostici di III livello. I risultati falsi positivi, ottenuti con il sistema Rad 120, si traducono in una minore specificità dello stesso nella ricerca degli Ab specifici prodotti nei confronti di alcuni agenti del complesso TORC. Tali dati ottenuti sperimentalmente, rappresentano la base reale per una efficace valutazione le prestazioni in termine di specificità e di sensibilità del Rad 120 ma anche la sua performance complessiva, tenendo conto della sua recente immissione sul mercato della diagnostica di laboratorio.

CONCLUSIONI

Alla luce di quanto emerso sperimentalmente è che il sistema Rad 120 presenta ancora alcuni problemi sia hardware che software, ma anche difficoltà legate ad una ancora non sufficiente selettività dei reattivi utilizzati. Ne è testimonianza il fatto che alla fine di questa prima parte del trial clinico, lo strumento è stato sottoposto ad opportuni correttivi con aggiornamento del software e del pannello reagenti. In seguito a ciò, i dati parziali in nostro possesso che saranno oggetto di un aggiornamento del lavoro e che riguardano comunque già 276 campioni per un totale di 509 test fanno registrare un notevole ridimensionamento del problema che sembra avviato a registrare valori di discordanza

molto vicini all'1%. Naturalmente attenderemo di completare questa seconda fase prima di poterci esprimere con sicurezza in termini assoluti. Possiamo comunque dire che gli interventi fatti, finalizzati a migliorare la performance dello strumento, hanno riguardato sia la parte idraulica, migliorando l'accuratezza delle fasi di lavaggio e di dispensazione, sia la velocità di esecuzione attraverso l'ottimizzazione dei tempi di reazione con riduzione sensibile dei tempi di esecuzione dei test. Naturalmente vi è ancora tanto lavoro da svolgere, specie in considerazione delle problematiche di fondo che accompagnano la lettura fluorimetrica applicata alla diagnosi immunologica del complesso TORC. Difatti sappiamo che possono realizzarsi interferenze dovute ad una fluorescenza di fondo endogena, dei campioni biologici: le proteine sieriche, ad esempio, con energia di eccitazione di 340 nm ed energia di emissione di 470 nm, sono le cause comuni di fluorescenza di fondo (la bilirubina per esempio, emette fluorescenza da 400 a 450 nm). Tutte queste sono problematiche sulle quali ancora lavorare per raggiungere una specificità tale da permettere alla metodica immunoenzimatica a fluorescenza su Rad 120, di avere la stessa performance della metodica ELISA classica, che rappresenta il sistema di riferimento. L'obiettivo di una migliore qualità del risultato raggiunto mediante le correzioni sullo strumento, sopra esposte, potrà avvalersi della prosecuzione del nostro trial fino a quando i risultati ottenuti rientrino in una sovrapposibilità statistica nella quale le discrepanze siano esclusivamente riconducibili alle diverse peculiarità dei metodi utilizzati. Tale obiettivo deve essere perseguito con tenacia e rigore scientifico per non penalizzare uno strumento che già ora fa della versatilità d'uso e della potenziale rispondenza ad esigenze variabili sia in termini di numero di prestazioni complessive che in termini di adeguatezza dei tempi massimi di risposta alcuni dei suoi punti di forza.

BIBLIOGRAFIA

1. Daiminger A, Schalasta G, Betzl D, Endersen G. Detection of human Cytomegalovirus in urine sample by cell culture early antigen assay polymerase chain reaction. *Infection* 1994; 22: 24-28.
2. Demmler GJ. Infection diseases society of America and centers for disease control. Summary of a workshop on surveillance for congenital Cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis.* 1991; 13: 315-29.
3. Enders G, Nickerl-Pacher U, Miller E, Cradock-Watson JE. Outcome of confirmed periconceptual maternal rubella. *The Lancet* 1988; 336: 1445-46.
4. Fortier B, Aissi E, Ayana F, et al. Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*. *Lancet.* 1981 b; 338: 444.
5. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, et al. Value of Cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary infection in pregnant women. *J Infect Dis.* 1997; 175: 944-46.
6. Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Austr* 1941; 3: 35-46.
7. Griffiths PD, Baboosian C, Rutter D, et al. Congenital and maternal Cytomegalovirus infections in a London population. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 135-40.
8. Griffiths PD, Baboosian C. A prospective study of primary Cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynaecol* 1984; 91: 307-15.
9. Hanshaw JB, Scheiner AP, Moxley AW, et al. School failure and deafness after "silent" congenital Cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 1976; 295: 468-78.
10. Hobbs KM, Sole E, Bettelheim KA. Investigation into the immunoglobulin class responsible for the polar staining of *Toxoplasma gondii* in the fluorescent antibody test. *Zentralbl Bakteriol (Orig A)* 1997; 239: 409-13.
11. Hutto C, Arvin A, Jacobs R, et al. Intrauterine Herpes simplex virus infections. *J Paediatr* 1987; 110-197.
12. Kishore J, Gupta I. Serological study of Parvovirus B19 infection in women with recurrent spontaneous abortions. *Indian J Pathol Microbiol.* Oct 2006; 49 (4): 548-50.
13. Langer H. Repeated congenital infection with *Toxoplasma gondii*. *Obstet Gynecol* 1963; 21: 318-29.
14. Lazzarotto T, Ripalti A, Bergamini G, et al. Development of a new Cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) immunoblot for detection of CMV-specific IgM. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3337-41.
15. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidità of immunoglobulin G directed against human Cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 469-73.
16. Mc Intosh EDG, Menser MA. A fifty-year follow-up of congenital rubella. *The Lancet.* 1992; 340-415.
17. Miller E, Cradock-Watson JE, Pollok TM. Consequences of confirmed maternal rubella of successive stages of pregnancy. *Lancet II.* 1982; 781-84.
18. Morris DJ. Prevention of congenital Cytomegalovirus disease. *J Infect* 1990; 161: 149-50.
19. Pass RF, Little EA, Stagno S, et al. Young children as a probable source of maternal and congenital Cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1987; 316: 1366-70.
20. Schuur AHW, Van Weemen BK. Enzyme immunoassay: a powerful analytical tool. *J Immunoassay* 1980; 1: 229.
21. Stagno S, Pass RF, Cloud G, et al. Primary Cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence transmission to fetus and clinical outcome. *Jama* 1986; 256: 1904-08.
22. Stagno S, Pass RF, Dworsky MF, et al. Congenital and perinatal Cytomegalovirus infections. *Semin Perinatal.* 1983; 7: 31-42.
23. Stagno S, Reynolds DW, Tsuan A, et al. Cervical Cytomegalovirus excretion in pregnant and non pregnant women: suppression in early gestation. *J Infect Dis.* 1975; 131: 522-27.
24. Stegmann BJ, Carey JC. Torch infection (Toxoplasmosis, Other (Syphilis, Varicella-Zoster, Parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus and Herpes infection. *Curr Womens Health Rep.* 2; 2002 Aug; (4): 253-58.
25. Stray-Pedersen B, Lorentzen-Styr AM. Uterine *Toxoplasma* infections and repeated abortions. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 128: 318-29.
26. Taylor-Weideman J, Sisson JGP, Borysiewicz LK, et al. Monocytes are a major site of persistence of human Cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991; 72: 2059-64.
27. Torch syndrome and Torch screening. *Lancet;* 1990 Jun 30; 335 (8705): 1559-61 *Lancet.* 1990 Sep 8; 336 (8715): 622-24.
28. Turbadkar D, Mathur M, Rele M, Apr-Jun: Seroprevalence of torch infection in bad obstetric history. *Indian J Med Microbiol* 2003; 21(2): 108-10.
29. Weiland HT, Vermey-Keers C, Salimans MMM, Fleuren GJ, Verwey RA, Anderson MJ. Parvovirus B19 associated with fetal abnormality. *Lancet* 1987; i: 682-83.
30. White NH, Yow MD, Demmler GJ, et al. Prevalence of Cytomegalovirus antibody in subjects between the ages of 6 and 22 years. *J Infect Dis.* 1989; 159: 1013-17.
31. Young EJ, Chafizadeh E, Oliveira VL, et al. Disseminated Herpes virus infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases.* 1996; 22: 51-58.