

RAD120 and TORCH diagnosis: final considerations

Giuseppe Ivan Potente, Salvatore Nisticò, Maria Teresa Cerminara, Lavinia Scuro, Angela Luciano

ASP Catanzaro, Presidio Ospedaliero di Lamezia Terme; S.C. Microbiologia e Virologia

Key words: Torch, Elisa, Fluorescent assay.

RAD120 e diagnostica TORCH: considerazioni finali

SUMMARY

This work is a second step of comparative clinical trial about the performance of automatic system RAD 120, with final fluorescent determination, and ALISEI, a referential system in ELISA. In this second comparison RAD120 shows that the problems of the first step have been resolved after adjournment, and this second step, demonstrates if RAD 120 has become a referential system in torch diagnosis.

INTRODUZIONE

Le infezioni da agenti del complesso TORCH possono essere diagnosticate con metodiche dirette o indirette. Queste ultime sono certamente quelle più usate e si basano sulla conferma dell'avvenuta infezione attraverso la valutazione della risposta immunitaria del paziente. Sulla base di questo presupposto, abbiamo pubblicato in precedenza alcuni dati riguardanti la performance del RAD120, strumento da noi utilizzato per questo tipo di diagnostica e sottoposto nella nostra struttura complessa a trial clinico di valutazione delle prestazioni. I dati in oggetto riguardavano la prima fase dello studio. In seguito alle valutazioni effettuate presso la nostra struttura lo strumento è stato sottoposto ad aggiornamento sia software che hardware. Quindi si è proceduto ad una ulteriore valutazione sul campo e valutazione dei dati attraverso sempre la comparazione degli stessi con quanto ottenuto, lavorando i medesimi test su sistema ALISEI. È utile ricordare che mentre RAD120 lavora con lettura finale in fluorescenza utilizzando antigeni strutturati con la tecnologia PEGASUS (particelle magnetiche rivestite di zirconia), ALISEI è un sistema che si fonda sull'immunoenzimatica classica in ELISA. Entrambi gli strumenti sono prodotti e commercializzati dalla RADIM diagnostics.

MATERIALI E METODI

Sono stati testati, nel periodo ottobre – dicembre 2008, 847 campioni ematici provenienti da vari reparti del P.O. di Lamezia Terme nonché dal territorio afferente allo stesso, appartenenti per il 80% ad individui di sesso femminile e per il 20% da individui di sesso maschile. 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.

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

PERIODO	OTTOBRE - DICEMBRE 2008
Numero sieri totali	847
Numero totale test	1455
Toxo G-Toxo M	767
Rubeo G-Rubeo M	272
Cito G-Cito M	416

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.

Dagli studi presenti in letteratura emerge per questo siste-

ma/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. Si tratta di saggio immunoenzimatico con lettura a fluorescenza, del quale stiamo 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 che, grazie alle loro particolari caratteristiche chimico-fisiche, risultano avere un'elevata capacità legante verso molecole biologicamente attive.

RISULTATI

I risultati qualitativi, ottenuti in questa seconda fase, derivanti dall'analisi dei campioni su i due strumenti utilizzati, per ciascun test sono riportati nelle tabella 2 e 3:

Tabella 2. Dati qualitativi ottenuti con strumento RAD120 nella seconda fase.

	Positivi	Negativi	Dubbi
Toxo G	204	561	2
Toxo M	20	746	1
Cito G	288	127	1
Cito M	7	406	3
Rubeo G	197	75	0
Rubeo M	6	260	6

Tabella 3. Dati qualitativi ottenuti con strumento ALISEI nella seconda fase.

	Positivi	Negativi	Dubbi
Toxo G	204	561	2
Toxo M	13	754	1
Cito G	288	127	1
Cito M	3	412	1
Rubeo G	197	75	0
Rubeo M	5	262	5

I risultati qualitativi (seconda fase) in percentuale derivanti dall'analisi dei campioni sui due strumenti utilizzati per ciascun test sono riportati nella tabella 4.

I dati ottenuti nella seconda fase sono stati comparati statisticamente con i dati ottenuti nel periodo ottobre 2007 – febbraio 2008, dati pubblicati nell'articolo **Rad120 nella diagnostica torch**, MICROBIOLOGIA MEDICA, Vol. 23 (4), 2008, riportati nella tabella 5.

Corresponding author: Giuseppe Ivan Potente

Viale dei Normanni, 117 - 88100 Catanzaro - Cell. 334 9457269

E-mail: ivanpotente@libero.it

Tabella 4. Dati qualitativi in percentuale ottenuti con i due strumenti Alisei e Rad120 (ditta Radim Diagnostics) nella seconda fase.

	ALISEI			RAD120		
	positivi	negativi	debolmente reattivi	positivi	negativi	debolmente reattivi
Toxo G	26.60%	73.14%	0.26%	26.60%	73.14%	0.26%
Toxo M	1.69%	98.31%	0.13%	2.61%	97.26%	0.13%
Rubeo G	72.43%	27.57%	0.00%	72.43%	27.57%	0.00%
Rubeo M	1.84%	96.32%	1.84%	2.21%	95.58%	2.21%
Cito G	69.23%	30.53%	0.24%	69.23%	30.53%	0.24%
Cito M	0.72%	99.04%	0.24%	1.68%	97.60%	0.72%

Tabella 5. Dati qualitativi ottenuti con i due strumenti Alisei e Rad120 (ditta Radim) nel periodo ottobre 2007-febbraio 2008

	ALISEI			RAD120		
	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%

L'analisi comparativa dei dati riportati mette in evidenza come vi sia stato un netto miglioramento della performance dello strumento nella ricerca delle IgG, fino a raggiungere nella seconda fase ad una completa sovrapposizione dei dati ottenuti dai due strumenti Alisei e Rad120. Sempre procedendo ad ulteriore comparazione si dimostra come tale miglioramento della performance dello strumento sia evidente anche nella ricerca delle IgM, dove si registrano valori di discordanza al di sotto dell'1% certamente ascrivibili alla variabilità legata all'uso di metodiche differenti. Tali dati ottenuti sperimentalmente, rappresentano la base reale per una efficace valutazione delle prestazioni in termine di specificità e di sensibilità, del Rad 120, ma anche della sua performance complessiva.

CONCLUSIONI

Alla luce di quanto ulteriormente emerso attraverso il nostro approccio sperimentale, si può ora evidenziare come il sistema Rad 120 abbia superato, grazie alla collaborazione tra la nostra equipe e l'assistenza scientifica RADIM, i problemi precedentemente evidenziati. Lo strumento, difatti, è stato sottoposto a dei correttivi mirati con aggiornamento del software ed ampliamento del pannello reagenti. In seguito a ciò, i dati che via via entravano in nostro possesso, ponevano risalto sull'appiattimento dei valori di discordanza, che in breve si attestavano su quell'uno % chiaramente riconducibile alle normali discrepanze che si registrano utilizzando metodiche differenti. Tutto ciò ci consente di dire che gli interventi fatti, finalizzati a migliorare la performance dello strumento come la velocità di esecuzione, attraverso l'ottimizzazione dei tempi di reazione con riduzione sensibile dei tempi di esecuzione dei test, hanno reso il RAD120 uno strumento guida nella diagnostica TORCH. Alla luce di questi ulteriori risultati, stiamo lavorando su nuove determinazioni attraverso questo sistema diagnostico che, vista la versatilità d'uso e la affidabilità e ripetibilità dei risultati potrà attestarsi certamente su livelli da gold standard diagnostico in infettivologia.

BIBLIOGRAFIA

- 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: 24-8.
- 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.
- Enders G, Nickerl-Pacher U, Miller E, Cradock-Watson JE. Outcome of confirmed periconceptional maternal rubella. *Lancet*. 1988; 336: 1445-6.
- Fortier B, Aissi E, Ayana F, et al. Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*. *Lancet*. 1981 b; 338: 444.
- 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: 944-6.
- Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Austr*. 1941; 3: 35-46.
- Griffiths PD, Baboosman C, Rutter D, et al. Congenital and maternal Cytomegalovirus infections in a London population. *Br J Obstet Gynaecol*. 1991; 98: 135-40.
- Griffiths PD, Baboonian C. A prospective study of primary Cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynaecol*, 1984; 91: 307-15.
- 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.
- 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.
- Hutto C, Arvin A, Jacobs R, et al. Intrauterine Herpes simplex virus infections. *J Paediatr*, 1987; 110-97.
- 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.
- Langer H. Repeated congenital infection with *Toxoplasma gondii*. *Obstet Gynecol*. 1963; 21: 318-29.
- Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidity 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.
- Mc Intosh EDG, Menser MA. A fifty-year follow-up of congenital rubella. *The Lancet*. 1992; 340-415.
- Miller E, Cradock-Watson JE, Pollok TM. Consequences of confirmed maternal rubella of successive stages of pregnancy. *Lancet*. II, 1982; 781-4.
- Morris DJ. Prevention of congenital Cytomegalovirus disease. *J Infect*. 1990; 161: 149-50.
- 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.
- Potente GI, Nisticò S, Cerminara MT, Zangari E, Luciano A. Comparative evaluation of RAD120 in the TORCH diagnostic. *Microbiologia Medica* 2008; 23(4): 228-32.
- Schuur AHW, Van Weemen BK. Enzyme immunoassay: a powerful analytical tool. *J Immunoassay*. 1980; 1: 229.
- Stagno S, Pass RF, Cloud G, et al. Primari Cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama*, 1986; 256: 1904-8.

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: 522-7.
24. Stegmann BJ, Carey JC. Torch infection Toxoplasmosis, Other (Syphilis, Varicella-Zoster, Parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus and Herpes infection. *Curr Womens Health Rep*. 2002 Aug.; 2 (4): 253-8.
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): 622-4.
28. Turbadkar D, Mathur M, Rele M. Seroprevalence of torch infection in bad obstetric history. *Indian J Med Microbiol*. 2003 Apr-Jun; 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* i: 1987; 682-3.
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: 1013-7.
31. Young EJ, Chafizadeh E, Oliveira VL, et al. Disseminated Herpes virus infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 1996; 22: 51-8.