

FULL PAPERS

Monotest in the complement fixation test: the Chorus system

Laura Meli, Alessia Bogi, Grazia Dal Maso, Francesco Rosini

Diesse Diagnostica Senese-Monteriggioni, Siena, Italy

Key Words: Complement Fixation test, serology, automation

Monotest nella fissazione del complemento: il sistema Chorus

SUMMARY

The complement fixation test (CFT) is a method used for the detection of antibodies against pathogens of infectious diseases, it has been proved to be a useful diagnostic method in the detection of acute disease in many medical laboratories. The test performed manually is time consuming and needs very skilled personnel. This study evaluates the automated Chorus CFT system with 87 serum samples in comparison with manual method using Virion-Serion reagents, against a panel of antigens, such as Adenovirus, Influenza A and B virus, Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza Mix, Mycoplasma Pneumoniae, and Echinococcus. The Chorus system includes standardized reagents and a monotest device to perform the single assay. In comparison to the manual CFT method, the correlation is 91.6% (7/83). The results obtained show that the automated Chorus system can be applied for detecting complement fixation antibodies against different infectious disease agents.

Received March 24, 2009

Accepted April 9, 2009

INTRODUZIONE

Il test di fissazione del complemento (CFT) è un metodica immunologica utilizzata in sierologia per la ricerca di anticorpi verso patogeni causa di malattie infettive virali, batteriche e parassitarie (3).

Nonostante l'esistenza di tecniche e metodologie avanzate, il test CFT rimane un metodo diagnostico ancora utilizzato nei laboratori, in particolar modo per alcuni virus responsabili di malattie respiratorie, quali adenovirus, influenza A e B virus, parainfluenza e, seppur con delle limitazioni, respiratory syncytial virus (4, 5, 6, 7).

Il test CFT è infatti particolarmente indicato per l'evidenziazione della fase acuta di una malattia infettiva e per valutare lo stadio di reinfezioni o riattivazioni, senza distinzione di classi anticorpali, anticorpi IgM e IgG. Nel caso dei virus respiratori, la risposta immunologica alla reinfezione, che risulta frequente, è piuttosto forte e spesso repentina, ed è più intensa della risposta originaria all'infezione primaria.

La ricerca dell'anticorpo specifico con il test CFT è un utile alternativa, soprattutto in caso di diagnosi di infezioni respiratorie acute, rispetto ai metodi che si basano sulla ricerca diretta dell'antigene. L'isolamento dell'agente infettivo da cam-

pioni clinici non sempre è di facile esecuzione e i test che ricercano direttamente l'antigene non offrono la specificità richiesta. Le analisi molecolari per la ricerca del genoma della maggior parte di agenti batterici e virali, anche se di grande utilità, non sono ancora ben standardizzate per l'uso nella pratica clinica. Tutti questi limiti possono essere superati dall'utilizzo del test di fissazione del complemento con il quale è possibile eseguire screening di campioni per molti differenti antigeni all'interno di una singola seduta. L'esecuzione del test CFT è laboriosa, difficile da standardizzare, come evidenziano anche le linee guida (1).

I tempi lunghi di esecuzione, la formazione di personale altamente qualificato, i risultati generalmente interpretati in modo soggettivo, hanno creato l'opportunità di sviluppare sistemi in automazione (2). All'esistente Seramat si aggiunge il Chorus, più versatile, dedicato alle routine dei piccoli medi laboratori.

Il sistema Chorus offre, rispetto al Seramat, anche il vantaggio del monotest: un unico device per l'esecuzione di una singola analisi.

Il presente lavoro descrive la valutazione dei risultati ottenuti con il sistema Chorus con quelli ottenuti con metodica manuale utilizzando i rea-

Corresponding author: Laura Meli

Diesse Diagnostica Senese

Via delle Rose 10 - Località Tognazza Monteriggioni, Siena, Italy - Tel: 0577-587121 - Fax: 0577-587151

E-mail: laurameli@diesse.it

genti Virion-Serion su un pannello di sieri umani.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato eseguito su 87 sieri umani provenienti da 3 diversi laboratori e mantenuti a -20°C, al momento dell'utilizzo dopo scongelamento sono stati inattivati a 56°C per 30 minuti in bagno maria. Sono stati determinati anticorpi verso gli antigeni: adenovirus (15 sieri), influenza A virus (14 sieri), influenza B virus (12 sieri), respiratory syncytial virus (15 sieri), parainfluenza mix (11 sieri), *Mycoplasma Pneumoniae* (10 sieri), *Echinococcus* (10 sieri).

In tutti i campioni sono stati determinati gli anticorpi fissanti il complemento in tecnica manuale con i relativi reagenti Virion-Serion (nel caso dell'*Echinococcus* è stato utilizzato l'antigene Diesse con sistema emolitico Virion-Serion) e nel sistema Chorus Diesse.

Titolazione metodo manuale

Il test di fissazione del complemento con metodo manuale è stato allestito secondo la procedura standard di Kolmer (fissazione a 2/8°C, overnight) utilizzando i reagenti Virion-Serion, Würzburg, Germany. In piastre da micro titolazione è stata eseguita la diluizione seriale del siero previa inattivazione a 56°C per 30 minuti, per prevenire l'interferenza della reazione dovuta al complemento contenuto nel siero. In seguito sono stati aggiunti quantitativi costanti di antigene e di complemento. Dopo incubazione overnight è stato aggiunto il sistema emolitico; se sono presenti anticorpi specifici si formano immunocomplessi che fissano il complemento impedendo l'emolisi del sistema emolitico. Invece, in assenza di anticorpi specifici verso l'antigene, il complemento è disponibile per causare l'emolisi dei globuli rossi. Il titolo dell'anticorpo corrisponde alla diluizione più alta in cui si è raggiunto il 50% di emolisi valutato solitamente ad occhio nudo, osservando la dimensione del "bottono" di globuli rossi sedimentati sul fondo della piastra.

Titolazione sistema Chorus

Il metodo automatizzato (sistema Chorus; Diesse, Monteriggioni, Italia) è stato utilizzato per quantificare anticorpi verso gli antigeni elencati sopra in tutti i campioni inclusi nello studio. Il sistema Chorus comprende un processore automatizzato e kits diagnostici costituiti dal device monotest contenente tutti i reattivi necessari per un solo test: antigene liquido o liofilo, complemento e emolisina liofilo, globuli rossi stabilizzati. Lo strumento prepara tutti i reattivi necessari per l'analisi; è possibile processare fino a 30 campioni simultaneamente anche con un test diverso per ciascuno.

Nel ciclo analitico vengono effettuate 3 letture in cinetica delle 2 reazioni che avvengono in parallelo:

- 1) reazione tra antigene e siero in presenza del sistema emolitico (complemento, emolisina, globuli rossi)
- 2) reazione del siero in assenza di antigene e in presenza del sistema emolitico (complemento, emolisina, globuli rossi) per la valutazione del potere anticomplementare del siero.

Il confronto delle due cinetiche è espresso in secondi, e tale tempo è proporzionale al titolo del siero, Tabella 1.

Tabella 1. Conversione tempo (sec.)/titolo

0 -41 sec	NEG
41-100 sec	1/8
101-300 sec	1/16
301 -500sec	1/32
501 -700sec	1/64
701 sec	1/128

Studio delle prestazioni

Per la valutazione comparativa tra le due metodiche sono stati considerati in accordo titoli divergenti per non più di una diluizione a raddoppio.

Lo studio di precisione tra prove è stato eseguito testando in duplicato il siero di controllo di adenovirus, influenza A virus, influenza B virus e respiratory syncytial virus per 2 volte al giorno per 3 giorni consecutivi. La media, la deviazione standard ed il relativo CV% sono stati calcolati sul tempo espresso in secondi.

RISULTATI

Valutazione di adenovirus

Tabella 2. Dei 15 sieri testati, 12 sono risultati concordanti per entrambi i metodi e 3 sono risultati discrepanti (D)

ID SAMPLE	CHORUS	VIRION
1 adv	neg	neg
2 adv	1/32	1/64
3 adv	1/32	1/64
4 adv	1/8	1/128 D
5 adv	A/C	1/64
6 adv	A/C	1/64
7 adv	>128	1/32 D
8 adv	1/8	1/16
9 adv	1/64	1/32
10 adv	1/16	1/32
11 adv	1/16	1/128 D
12 adv	neg	neg
13 adv	1/8	neg
14 adv	A/C	1/16
15 adv	1/16	1/32

I campioni: 5 adv, 6 adv, 14 adv hanno mostrato potere anticomplementare (A/C), e sono stati omessi dalla valutazione

Valutazione di Influenza A Virus

Tabella 3. I 14 sieri testati sono risultati tutti concordanti per entrambi i metodi

N° SAMPLE	CHORUS	VIRION
1 inf a	1/32	1/64
2 inf a	1/16	1/8
3 inf a	1/32	1/64
4 inf a	1/32	1/64
5 inf a	1/128	1/64
6 inf a	1/128	1/128
7 inf a	1/128	1/256
8 inf a	>1/128	1/128
9 inf a	>1/128	1/128
10 inf a	>1/128	>1/256
11 inf a	>1/128	1/128
12 inf a	>1/128	>1/256
13 inf a	>1/128	>1/256
14 inf a	1/64	1/64

Valutazione di Influenza B Virus

Tabella 4. Dei 12 sieri testati, 11 sono risultati concordanti per entrambi i metodi mentre 1 è risultato discrepante (D)

N° SAMPLE	CHORUS	VIRION
1 inf b	1/32	1/64
2 inf b	1/16	1/32
3 inf b	1/64	1/64
4 inf b	1/64	1/64
5 inf b	1/32	1/128 D
6 inf b	1/32	1/64
7 inf b	1/32	1/64
8 inf b	>1/128	1/128
9 inf b	1/32	1/32
10 inf b	1/64	1/128
11 inf b	1/128	1/64
12 inf b	>1/128	1/64

Valutazione di Mycoplasma Pneumoniae

Tabella 7. Dei 10 sieri testati, 9 sono risultati in accordo tra le due metodiche e 1 è risultato discrepante (D). 9 campioni su 10 sono stati ulteriormente caratterizzati con kit Elisa metodo chorus per la determinazione degli anticorpi IgM e IgG verso il Mycoplasma Pneumoniae

ID SAMPLE	CHORUS	VIRION	CHORUS IgM	CHORUS IgG
1 myco p.	1/128	1/128	0,2 P	>100 P
2 myco p.	>1/128	>256	7,8 P	<10 N
3 myco p.	1/64	1/32	0,5 N	>100 P
4 myco p.	>256	>256	8,6 P	58,4 P
5 myco p.	1/16	1/16	0,1 N	>100 P
6 myco p.	NEG	1/16	0,4 N	<10 N D
7 myco p.	1/16	1/16	0,6 N	53,2 P
8 myco p.	1/16	1/16	0,6 N	48,2 P
9 myco p.	1/16	1/32	1,3 P	97 P
10 myco p.	1/128	1/256	Non testato	Non testato

Valutazione di Respiratory Syncythial Virus

Tabella 5. Dei 15 sieri testati, 13 sono risultati concordanti per entrambi i metodi e 2 sono risultati discrepanti (D)

N° SAMPLE	CHORUS	VIRION
1 rsv	1/64	1/16 D
2 rsv	1/16	1/8
3 rsv	1/32	1/16
4 rsv	1/64	1/16 D
5 rsv	1/16	1/8
6 rsv	1/16	1/8
7 rsv	1/32	1/16
8 rsv	1/32	1/16
9 rsv	1/64	1/64
10 rsv	1/32	1/16
11 rsv	1/32	1/16
12 rsv	1/16	1/8
13 rsv	1/16	1/8
14 rsv	1/32	1/16
15 rsv	1/16	1/32

Valutazione di Parainfluenza Mix

Tabella 6. Gli 11 sieri testati, sono risultati tutti concordanti per entrambi i metodi

N° SAMPLE	CHORUS	VIRION
1 para mix	1/128	1/256
2 para mix	1/128	1/64
3 para mix	1/64	1/32
4 para mix	1/16	1/16
5 para mix	1/16	1/32
6 para mix	1/64	1/32
7 para mix	1/32	1/16
8 para mix	1/32	1/32
9 para mix	1/32	1/32
10 para mix	1/32	1/64
11 para mix	A/C	neg

Il campione 11 para mix ha mostrato potere anticomplesmentare (A/C) ed è stato omesso dalla valutazione

Valutazione di *Echinococcus*

Tabella 8. 10 sieri testati sono risultati tutti in accordo tra le due metodiche

ID SAMPLE	CHORUS	DIESSE
1 ech	1/64	1/64
2 ech	1/64	1/32
3 ech	1/64	1/64
4 ech	1/128	1/128
5 ech	1/32	1/32
6 ech	1/64	1/128
7 ech	1/128	1/256
8 ech	1/64	1/128
9 ech	1/64	1/64
10 ech	1/64	1/32

Valutazione del Metodo Chorus: precisione tra prove

Tabella 9. Sono stati testati in duplicato per 2 volte al giorno per 3 giorni consecutivi i sieri di controllo di Adenovirus, Influenza A Virus, Influenza B Virus e Respiratory Syncythial Virus.

La tabella riporta la media ed il CV% del tempo di ritardo espresso in secondi ottenuti per ogni siero di controllo

Siero di controllo	Tempo emolisi	
	media	cv%
ADV	344	16,3
RSV	462	15,7
INFA	247	12,3
INFB	525	19

cv % = coefficiente di variabilità percentuale

DISCUSSIONE

L'esecuzione manuale del CFT è ancora molto in uso, ma presenta dei limiti che sono stati superati dall'introduzione di sistemi in automazione, facilitandone l'esecuzione senza perdere le caratteristiche di sensibilità e specificità proprie della tecnica manuale. Con il sistema Chorus è stato possibile realizzare:

1. la riduzione dei tempi di analisi rispetto alle 18 ore di incubazione richieste dalla tecnica manuale
2. l'automazione del test
3. l'eliminazione della soggettività nell'interpretazione dei risultati con una procedura standardizzata e affidabile.

Lo studio effettuato sulla valutazione dei risultati ottenuti con il sistema Chorus con quelli ottenuti con metodica manuale utilizzando gli antigeni Virion-Serion su un pannello di sieri umani ha fornito una correlazione del 91.6%: 7 sieri sono risultati discordanti su 83 campioni valutati. I due metodi a confronto hanno fornito risultati sostanzialmente in accordo tra di loro. I risultati divergenti per 2 o più diluizioni a rad-

doppio sono stati ottenuti tra i campioni testati per la presenza di anticorpi fissanti il complemento verso l'Adenovirus: 3 campioni su un totale di 15 hanno mostrato un titolo diverso tra le due metodiche. La possibile spiegazione di tale risultato sta nella diversa composizione dell'antigene Adenovirus tra le due metodiche, Chorus vs Virion-Serion. L'antigene utilizzato nel Chorus contiene i sierotipi 2 e 7, mentre nell'antigene Virion-Serion sono presenti i sierotipi 2,3,4 e 7. La diversa risposta ottenuta, tra le due metodiche, potrebbe essere quindi attribuita alla presenza di anticorpi verso sierotipi diversi (7).

Il test CFT eseguito con il sistema Chorus offre buone prestazioni in termini di sensibilità, affidabilità e costanza di risultati nella prova, tra prove, tra lotti. Quest'ultimo dato sta ad indicare l'elevata standardizzazione raggiunta nella produzione e nell'allineamento del test CFT Chorus. La flessibilità e la riduzione di costi, in quanto il device monotest contiene tutti i reattivi necessari per l'esecuzione di un singolo campione, sono un ulteriore vantaggio. Gli studi di precisione effettuati mostrano una buona costanza di risultato; il dato è supportato dall'andamento della carta di controllo registrata monitorando il titolo ottenuto per il siero di controllo dell'Influenza A Virus per 33 settimane (dati non mostrati). I risultati ottenuti ricadono sempre entro il range di accettabilità di +/- 1 diluizione rispetto al titolo atteso.

CONCLUSIONI

L'esecuzione del CFT con il sistema automatizzato Chorus si è dimostrata promettente in quanto offre attendibilità e affidabilità di risultati paragonabili al test manuale.

Lo studio effettuato ha fornito risultati sostanzialmente in accordo tra di loro mostrando una correlazione del 91.6%. Tale dato risulta essere molto confortante valutando tutti i vantaggi derivanti dall'esecuzione del CFT con il sistema Chorus. La metodica automatizzata risulta di facile utilizzo: tutte le informazioni per l'esecuzione dell'analisi di un campione, oltre ai reattivi, sono contenute nel codice a barre del device. La manualità nell'esecuzione del test è ridotta al minimo: tutti i reattivi sono, infatti, pronti all'uso dato che non occorre eseguire diluizioni (una delle più comuni fonti di errore). Inoltre, l'utilizzo dei reagenti standardizzati riduce l'elevata variabilità legata alla necessità di titolare i reagenti al momento dell'uso. Anche il tempo di refertazione è un punto di forza del sistema Chorus; i risultati infatti, vengono forniti nello stesso giorno in cui è esegui-

ta l'analisi, rendendo tale metodo utilizzabile anche per la diagnosi rapida, diversamente dalla metodica manuale in cui i risultati sono ottenuti in 18/24 ore. Con il metodo automatizzato Chorus possono essere eseguiti contemporaneamente 30 diversi test, basati su differenti metodologie in un tempo medio di 2 ore. Il risparmio in termini di tempo da parte dell'operatore è perciò molto elevato. Il sistema Chorus risulta essere molto adatto e versatile anche per i piccoli laboratori, in cui la quantità di test eseguiti giornalmente varia numericamente rispetto ai grandi centri. La lettura fotometrica della cinetica di emolisi e l'elaborazione del risultato tramite software dedicato eliminano l'alta soggettività nell'interpretazione eseguita per ispezione visiva.

Risulta anche facilitata la gestione dello smaltimento del reattivo dopo l'utilizzo.

In conclusione, il sistema automatizzato Chorus è perfettamente adeguato per l'esecuzione del CFT, sia per quanto riguarda l'affidabilità del dato analitico che per il livello di semplificazione e standardizzazione della metodica, difficilmente raggiungibile con la metodica manuale.

BIBLIOGRAFIA

1. COMPLEMENT FIXATIONS TESTS VSOP 18 Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Centre for Infections;1-24
2. De Ory F, Guisasola ME, Cocola F, *et al.* Evaluation of an automated complement-fixation test (Seramat) for diagnosis of acute respiratory infections caused by viruses and atypical bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; 10: 220-3
3. Escobar MR. Hemolytic Assay: Complement Fixation and Antistreptolysin O. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ Eds, Fifth Edition. American Society for Microbiology, Washington DC 1991; 73-6
4. Hall CB. Respiratory Syncytial Virus. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*, Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR Eds, Third Edition. John Wiley & Sons Ltd 1995; 271-85
5. McLean DM. Parainfluenza Viruses. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*, Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR Eds, Third Edition. John Wiley & Sons Ltd 1995; 257-70
6. Potter CW. Influenza. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*, Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR Eds, Third Edition. John Wiley & Sons Ltd 1995; 229-55
7. Sharp IR, Wadell G. Adenovirus. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*, Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR Eds, Third Edition. John Wiley & Sons Ltd 1995; 287-308