

FULL PAPERS

Use of Enzygnost Anti-human IgA conjugate in combination with the kit Enzygnost toxoplasmosis IgG (Siemens Healthcare Diagnostics) for the detection of IgA anti-*Toxoplasma gondii*

Antonella Marangoni¹, Alessandra Moroni², Silvia Accardo¹, Marina Biagi², Enzo Della Bella², Sanzio Ruscello², Franca Savioli², Roberto Cevenini¹

¹Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche, Università degli Studi di Bologna, Bologna, Italy

²Unità Operativa di Microbiologia, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, Italy

Key Words: IgA; toxoplasmosis; serology

Valutazione dell'utilizzo del coniugato IgA in combinazione con il kit Enzygnost toxoplasmosis IgG (Siemens Healthcare Diagnostics)

SUMMARY

Laboratory diagnosis of toxoplasmosis is mainly based on serological methods, particularly important in the most challenging situations, as the diagnosis of primary infection during pregnancy and diagnosis of congenital infection. Tests for the detection of IgA antibodies are especially important in the newborns, because they are more sensitive than IgM conventional methods. The purpose of this study was to evaluate diagnostic performances of Enzygnost system for IgA detection, achieved by using Enzygnost Anti-human IgA/POD conjugate in combination with Enzygnost toxoplasmosis IgG (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany).

A retrospective study was performed with 591 serum samples submitted to the Microbiology Laboratory of S. Orsola Hospital in Bologna for toxoplasmosis screening. All the sera were tested by Enzygnost toxoplasmosis IgG, Enzygnost toxoplasmosis IgM and Enzygnost system for IgA (Siemens Healthcare Diagnostics). Border-Line or positive IgM results were confirmed by Vidas Toxo IgM (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Finally, IgG Avidity was performed by Vidas Toxo IgG Avidity (bioMerieux) and LDBio Toxoplasma WB IgG/IgM (LDBio Diagnostics, Lyon, France).

During the study period, 453 sera were IgA negative, 53 were Border-Line and 85 were positive when tested by Enzygnost system for IgA. No significant correlation was found between IgA positive results and low Avidity results. Three babies were correctly diagnosed as congenital toxoplasmosis infected infants because of the presence of IgA antibodies at birth.

Enzygnost system for IgA anti-*Toxoplasma* showed good diagnostic performances. We conclude that the high sensitivity and specificity of and its suitability for automation make it an ideal screening test.

Received February 17, 2009.

Accepted March 9, 2009

INTRODUZIONE

La toxoplasmosi è un'infezione ubiquitaria trasmessa dal protozoo *Toxoplasma gondii*.

L'infezione può essere acquisita mangiando carne cruda o poco cotta che contenga all'interno dei tessuti le cisti del parassita, o cibo ed acqua contaminati dalle oocisti; le manifestazioni cliniche dell'infezione acquisita nei soggetti immunocompetenti sono di scarsa rilevanza, mentre nei pazienti immunocompromessi possono essere alquanto gravi. *T. gondii* è in grado di attraversare la barriera pla-

centare e dare infezione in utero: la toxoplasmosi congenita è un'importante causa di sequele neurologiche e oculari che nella maggior parte dei casi non si manifestano alla nascita bensì nei primi anni di vita o nell'adolescenza (8).

Gli esami microbiologici possibili sono l'individuazione diretta del patogeno (13, 14) e le indagini sierologiche; alle analisi di screening per la ricerca degli anticorpi IgG e IgM in questi ultimi anni si sono affiancati test per la ricerca delle IgA e per la determinazione dell'avidità anticorpale.

Corresponding author: Antonella Marangoni

Policlinico Sant'Orsola - Malpighi - Dip. Ematologia e Scienze Oncologiche

Università di Bologna via Massarenti, 9 - 40138 Bologna, Italy - Tel : 051/6364516 - Fax : 051/307397

E-mail: antonella.marangoni@aosp.bo.it

La diagnosi sierologica di toxoplasmosi congenita è particolarmente delicata: nel neonato si pone diagnosi certa con la dimostrazione nel siero di specifici anticorpi IgM o IgA (21). Al contrario la sola presenza di anticorpi IgG nel neonato non è sufficiente per porre diagnosi di infezione congenita, poiché tali anticorpi sono in grado di attraversare la placenta e vengono trasferiti passivamente in utero dalla madre al feto nel caso di sieropositività materna. Per via della breve emivita degli anticorpi IgA e IgM i test positivi devono però essere confermati a 2-4 giorni di vita del neonato nel caso delle IgM e a 10 giorni per le IgA, in modo da escludere la contaminazione con sangue materno al momento della nascita. In una percentuale rilevante di casi di infezione congenita la risposta anticorpale IgM può essere assente (21). Le IgA sono ritenute generalmente un marker più sensibile rispetto alle IgM per l'infezione congenita (1, 6): nel caso di infezione materna nel corso del secondo trimestre gli anticorpi di classe A possono essere presenti nel siero dei neonati anche in assenza delle IgM, dal momento che nel neonato le IgA permangono più a lungo delle IgM (al contrario di quello che si osserva generalmente negli adulti).

Negli ultimi anni la tecnica di Western Blot (WB) è stata usata con successo per ampliare le possibilità diagnostiche in caso di sospetto di toxoplasmosi congenita (17, 22). In particolare il WB viene utilizzato nei seguenti casi:

- saggio comparativo IgG/IgM dei sieri madre/neonato alla nascita
- saggio comparativo IgG/IgM di prelievi seriali del bambino (1-3 mesi)

Il criterio di positività è basato, rispettivamente sul:

- riconoscimento da parte del siero del neonato di bande diverse rispetto al siero materno
- riconoscimento di nuove bande da parte dei sieri del bambino ottenuti durante il follow-up nei primi tre mesi rispetto al siero alla nascita.

Dal momento che nella stragrande maggioranza dei casi è impossibile risalire al momento del contagio, per arrivare all'inquadramento corretto del paziente si devono considerare i risultati ottenuti con le varie metodiche come tessere di un puzzle; da ciò che si è indicato in precedenza si vince la complessità del problema per quanto riguarda l'interpretazione corretta del quadro sierologico di un paziente, specialmente nel caso di neonati potenzialmente infetti e di donne gravide.

Scopo di questo lavoro è stato di valutare le performance diagnostiche del sistema automatizzato Enzygnost per la ricerca delle IgA mediante uno studio retrospettivo sull'utilizzo di tale metodica nel corso di 11 mesi (1 luglio 2007-31 maggio 2008). Tale sistema vede l'utilizzo del kit Enzygnost toxoplasmosis IgG in combinazione

con la coniugata IgA (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) su analizzatori BEPIII.

MATERIALI E METODI

Gruppo di studio

Nel periodo 1 luglio 2007-31 maggio 2008, sono pervenuti all'U.O. di Microbiologia del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna, 591 sieri per la ricerca delle IgA anti-*T. gondii*. La provenienza di tali sieri è indicata in Figura 1.

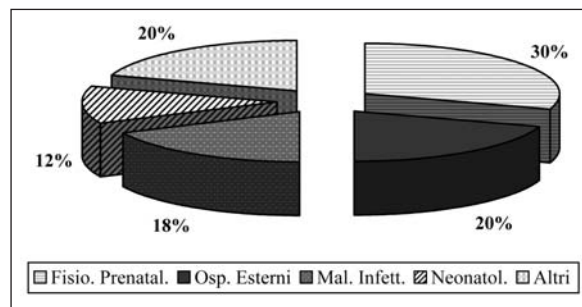


Figura 1. Provenienza delle 591 richieste pervenute all'U.O. di Microbiologia per la ricerca delle IgA sieriche anti-*T. gondii* tra il 1 luglio 2007 e il 31 maggio 2008

In breve, al nostro Laboratorio le richieste arrivavano principalmente da Ospedali esterni e dai seguenti reparti interni del Policlinico: ambulatorio di Fisiopatologia Prenatale del Policlinico S. Orsola, dove vengono seguite gravidanze a rischio; ambulatorio di Malattie Infettive, per diagnosi di sospetta toxoplasmosi in pazienti HIV positivi; Neonatologia, per un follow-up sierologico dei neonati con sospetto di toxoplasmosi congenita.

Metodiche routinariamente utilizzate nel nostro laboratorio

Come screening nel nostro Laboratorio vengono routinariamente impiegati i kit Enzygnost toxoplasmosis IgG e Enzygnost toxoplasmosis IgM su sistema automatizzato Genesis RSP 200/BEP III (Siemens Healthcare Diagnostics). I risultati IgM dubbi o positivi vengono confermati con il kit Vidas Toxo IgM (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Per la determinazione dell'avidità viene utilizzato il kit Vidas Toxo IgG Avidity (bioMerieux); infine, viene utilizzato il kit LDBio Toxoplasma WB IgG/IgM (LDBio Diagnostics, Lyon, France) per la diagnosi di toxoplasmosi congenita. Tutte le metodiche vengono effettuate seguendo le istruzioni date dal costruttore.

Impiego del coniugato IgA in combinazione con il kit Enzygnost toxoplasmosis IgG

Per la ricerca delle IgA sono stati utilizzati kit Enzygnost toxoplasmosis IgG e coniugato anti-IgA

umane/POD (Siemens Healthcare Diagnostics) come segue: i sieri e i controlli, prediluiti 1:21 in tampone diluente POD e successivamente 1:2 in mezzo di assorbimento RF ricostituito (Siemens Healthcare Diagnostics), sono stati incubati a 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo la diluizione e l'incubazione con RF i sieri e i controlli sono stati dispensati nei pozzetti della piastra Enzygnost toxoplasmosis IgG in ragione di 100 µl/pozzetto. La piastra è stata quindi incubata 60 minuti a 37°C e lavata. In ogni pozzetto della piastra sono stati poi aggiunti 100 µl di soluzione d'uso del coniugato Anti-IgA umana/POD; la piastra è stata nuovamente incubata per 60 minuti a 37°C e lavata. In ogni pozzetto sono stati dispensati 100 µl di soluzione d'uso del cromogeno e la piastra è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente. La reazione enzimatica è stata arrestata aggiungendo ad ogni pozzetto 100 µl di soluzione bloccante POD. I risultati sono stati letti a 450/650 nm; tutti i passaggi sono stati eseguiti su sistema automatizzato Genesis RSP 200/BEP III.

RISULTATI

Dei 591 sieri analizzati, 453 sono risultati IgA negativi, 53 Border-Line e 85 IgA positivi quando saggiati con il kit Enzygnost toxoplasmosis IgG in combinazione al coniugato IgA. Nelle figure suc-

cessive si evidenzia la distribuzione dei risultati Border-Line e positivi in base alla provenienza (Figure II e III), o in base alla correlazione con l'avidità anticorpale (Figure IV e V). Come si evince da questi dati, non c'è una correlazione significativa tra il dato di positività per le IgA e un basso valore di avidità anticorpale. Nel presente studio, risultati IgA positivi sono stati ritrovati per il 49% dei casi in pazienti con avidità bassa o media (12%), e nel rimanente 39% dei casi in pazienti con alta avidità anticorpale.

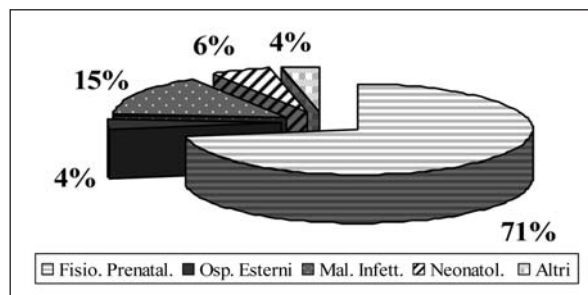


Figura II. Distribuzione in base alla provenienza dei risultati Border-Line ottenuti con il kit Enzygnost toxoplasmosis IgG in combinazione con il coniugato IgA nel periodo dello studio retrospettivo

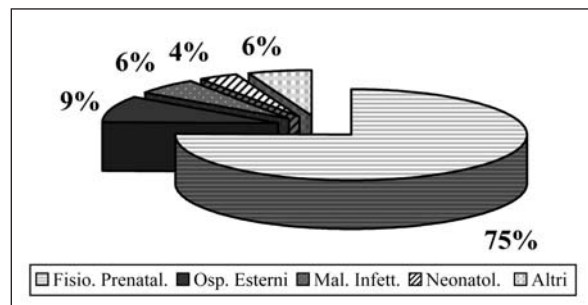


Figura III. Distribuzione in base alla provenienza dei risultati positivi ottenuti con il kit Enzygnost toxoplasmosis IgG in combinazione con il coniugato IgA nel periodo dello studio retrospettivo

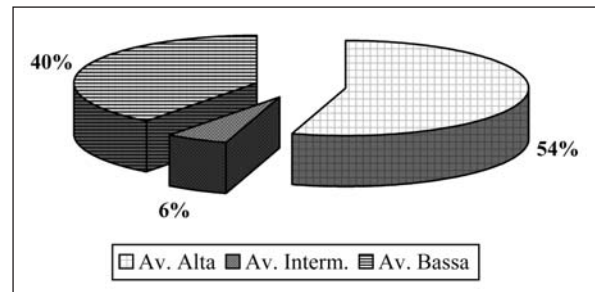


Figura IV. Correlazione con l'avidità anticorpale dei risultati Border-Line ottenuti con il kit Enzygnost toxoplasmosis IgG in combinazione con il coniugato IgA nel periodo dello studio retrospettivo

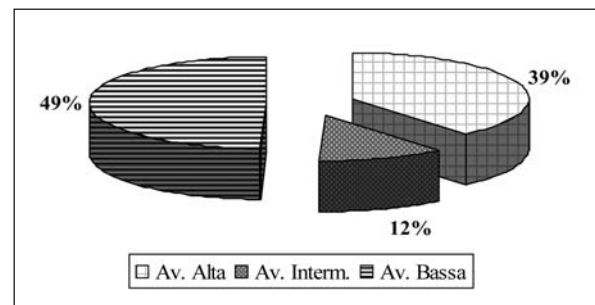


Figura V. Correlazione con l'avidità anticorpale dei risultati positivi ottenuti con il kit Enzygnost toxoplasmosis IgG in combinazione con il coniugato IgA nel periodo dello studio retrospettivo

Infine, a riprova dell'importanza delle IgA per la diagnosi di toxoplasmosi congenita, è importante sottolineare come sia stato possibile porre diagnosi di infezione in tre bambini grazie al ritrovamento di IgA specifiche a uno, due e tre mesi di vita, rispettivamente. I prelievi seriali di questi tre neonati sono stati sempre IgM negativi, mentre il WB comparativo ha mostrato reattività IgG diverse nei prelievi dei mesi successivi rispetto al campione ottenuto alla nascita, confermando così il dato delle IgA.

DISCUSSIONE

La diagnosi di infezione da toxoplasmosi, per la difficoltà di isolare il parassita e per l'utilizzo limitato delle metodiche molecolari, si basa sostanzialmente sulla sierologia. La diagnosi di

infezione acuta in gravidanza è essenziale perché permette di instaurare precocemente una terapia. E' infatti noto dalla letteratura come solo un trattamento effettuato entro le prime 4 settimane dalla sierconversione dimostri un'efficacia statisticamente significativa per prevenire lesioni intracraniche nel feto (11, 12). Le IgM sono generalmente considerate un marker specifico di infezione recente. Purtroppo però in corso di infezione da *T. gondii* le IgM possono permanere per lunghi periodi, addirittura per mesi o, in casi più rari, anni (2, 7). La ricerca delle IgA o test per la determinazione dell'avidità anticorpale possono aiutare nella datazione dell'infezione da *T. gondii* (3, 19). La maturazione dell'avidità anticorpale è stata oggetto di vari studi su soggetti sintomatici o con accertata sierconversione (5, 20). Il tempo necessario per evidenziare la maturazione dell'avidità anticorpale è diverso a seconda del metodo utilizzato, anche se generalmente è accettato che un valore di avidità alta escluda l'acquisizione dell'infezione da *Toxoplasma* durante i 3-5 mesi precedenti. Nelle donne in gravidanza, un dato di alta avidità anticorpale nel primo trimestre è altamente predittivo di infezione in epoca pre-concezionale. Valori di avidità bassa o intermedia possono però persistere per più di un anno (5, 20) e quindi questo dato da solo non può bastare per porre diagnosi di infezione recente. Infine, il trattamento antibiotico può modificare la maturazione della risposta anticorpale IgG: in letteratura sono presenti dati discordanti sull'effetto della terapia rispetto all'avidità anticorpale (9, 20).

Dal momento che le IgA sono i principali effettori dell'immunità locale e che il protozoo entra nel corpo umano per ingestione, questo isotipo teoricamente potrebbe essere un marker affidabile di infezione recente. Le IgA anti-*Toxoplasma* sono prodotte nei confronti della proteina di peso 30 kDa denominata SAG1, una proteina di superficie delle forme replicative del parassita. Le IgA anti-SAG1 raggiungono il loro picco durante la fase acuta dell'infezione e tendono a scomparire durante la fase cronica (7). Purtroppo però, similmente alle IgM, si è visto come le IgA possano persistere per più di un anno dopo la fase acuta (19). A conferma di ciò, nel presente studio retrospettivo non è stato possibile stabilire una correlazione statisticamente significativa tra la presenza di IgA e valori di bassa avidità anticorpale: infatti abbiamo ritrovato risultati positivi o Border-Line anche in sieri con valori di avidità anticorpale alta (rispettivamente nel 39% e 54% dei casi).

Le IgA sono un marker importante e più affidabile rispetto alle IgM di infezione congenita nei neonati (1, 6). Nel nostro studio sono stati tre i casi di corretta diagnosi di toxoplasmosi congenita grazie

al ritrovamento delle IgA e in tutti questi casi si è avuta la conferma grazie all'utilizzo del WB comparativo.

Nel nostro Laboratorio vengono effettuate tutte le indagini sierologiche per TORCH e antigeni minori su sistema automatizzato BEPIII. Il passaggio su tale sistema della metodica per le IgA anti-*T. gondii* ha permesso nel corso del 2007-2008 di far fronte alla diminuzione del personale e all'aumento del carico di lavoro, mantenendo viceversa un elevato standard qualitativo, confermato retrospettivamente dal presente studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, et al. Do IgA, IgE, and IgG avidity have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J Clin Pathol* 1998; 51:312-5
2. Bertozzi LC, Suzuki LA, Rossi CL. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999 ; 41:175-7
3. Candolfi E, Pastor R, Huber R, et al. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58:83-8
4. Cassaing S, Bessières MH, Berry A, et al. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *Clin Microbiol* 2006; 44:720-4
5. Cozon GJN, Ferrandiz J, Nebbi H, et al. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998. 17:32-6
6. Decoster A, Darcy F, Caron A, et al. Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *Toxoplasma* infection. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:310-5
7. Decoster A, Darcy F, Caron A, et al. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* 1988; 2:1104-7
8. Desmots G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med* 1974; 290:1110-6.
9. Flori P, Tardy L, Patural H, et al. Reliability of immunoglobulin G anti *Toxoplasma* avidity test and effects of treatment on avidity indexes of infants and pregnant women. *Clin Diagn Laboratory Immunol* 2004; 11:669-74
10. Foudrinier F, Marx-Chemla C, Aubert D, et al. Value of specific immunoglobulin A detection by two immunocapture assays in the diagnosis of toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:585-90
11. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:410-5
12. Gras L, Wallon M, Pollak A, et al. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr* 2005 ; 94:1721-31
13. Homan WL, Vercammen M, De Braekeler J, et al.

- Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000; 30:69-75
14. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, et al. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4121-5
 15. Nielsen HV, Schmidt DR, Petersen E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by two-dimensional immunoblot differentiation of mother and child immunoglobulin G profiles. *J Clin Microbiol* 2005; 43:711-5
 16. Petithory JC, Reiter-Owona I, Berthelot F, et al. Performance of European laboratories testing serum samples for *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:45-9
 17. Remington JS, Araujo FG, Desmonts G. Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. *J Infect Dis* 1985; 152:1020-4
 18. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:941-5
 19. Roberts A, Hedman K, Luyasu V, et al. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:467-74
 20. Sensini A, Pascoli S, Marchetti D, et al. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection: a multicenter study. *Clin Microbiol Infect* 1996; 2:25-9
 21. Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:504-12
 22. Tridapalli E, Capretti M, Farneti G, et al. Congenital toxoplasmosis: the importance of the Western Blot method to avoid unnecessary therapy in potentially infected newborns. *Acta Paediatr* 2008; 97:1298-300