

## Analisi della concordanza analitica e clinica tra due sistemi analitici nella determinazione di anticorpi anti toxoplasma, rosoliavirus e cytomegalovirus

Nino Di Pietro\*, Corrado Romano\*\*, Cristiana Giovanetti\*, Roberta Carosella\*, Paolo Testa\*, Elisabetta Procida\*

\*Laboratorio Analisi, Presidio Ospedaliero G. Bernabeo Ortona, ASL Chieti

\*\*Laboratorio Analisi, Ospedale Clinicizzato SS. Annunziata, ASL Chieti

### ABSTRACT

**Analysis of the analytical and clinical concordance between two different laboratory instruments in the determination of antibodies against toxoplasma gondii, rubella virus and cytomegalovirus.** The aim of our work was to compare two different analytical systems (EIA3000 and CHORUS) to measure serum levels of specific IgG antibodies: anti Toxoplasma Gondii, (TOXO), anti Rosoliavirus (RUB), and anti Citomegalovirus (CMV). We analysed sera from 185 women in the first 3 months of pregnancy. The analytical correlation between the two different methods was determined using the Spearman test. The Wilcoxon test permitted us to verify the analytical concordance. The clinical concordance was determined using the ROC curves, that produced an area under curve (AUC) of the 0,988 for the anti TOXO IgG, 0,999 for the anti RUB IgG, and 0,904 for the anti CMV IgG.

### INTRODUZIONE

La causa di diverse patologie neonatali è data dalla presenza di infezioni materne durante la gravidanza. La diagnostica sierologica mediante ricerca di anticorpi specifici è la sola che possa essere applicata a bassi costi e su larga scala. Per un'efficace prevenzione bisogna diagnosticare tempestivamente le infezioni da Toxoplasma, Rosolia e Cytomegalovirus, in modo da prendere le opportune decisioni terapeutiche in tempo utile.

Il *toxoplasma gondii* è un protozoo intracellulare. Nelle cellule, dove penetra attivamente, il toxoplasma si moltiplica fino a rompere la membrana cellulare, oppure si incista in particolari tessuti in formazioni tondeggianti(1). La toxoplasmosi è un'infezione parassitaria trasmessa dai gatti che, se contratta in gravidanza, può infettare il feto. La malattia può manifestarsi in forma acuta o decorrere in forma cronica. La forma acuta più grave è certamente l'infezione fetale, per le complicanze neurologiche ed oculari; può anche rendersi responsabile di aborto spontaneo, parto prematuro o morte intrauterina del feto (2, 3).

La *Rosolia* è una malattia esantematica causata da un virus ad RNA classificato come Rubeovirus. Il decorso è generalmente breve e privo di complicazioni. L'aspetto importante della rosolia consiste nel fatto che, se contratta da una donna per la prima volta nel corso del primo trimestre di gravidanza, può essere responsabile di gravi malformazioni fetali, tra cui danni a carico degli occhi (cataratta, glaucoma), sordità, malformazioni cardiache, possibile ritardo psicomotorio(4). È essenziale conoscere lo stato immunitario della paziente prima dell'inizio della gravidanza per procedere alla vaccinazione o, se questa è impossibile, al frequente monitoraggio

dell'eventuale sierconversione(5, 6).

Il *Cytomegalovirus* (CMV) umano appartiene alla famiglia degli Herpesvirus e si trasmette in stretto contatto interumano. La maggior parte dei soggetti è infettata in modo asintomatico. Le donne sieronegative che contraggono la malattia durante la gravidanza la possono trasmettere al feto. Nel 95% dei casi questo avviene senza conseguenze, ma nei neonati sintomatici si può avere ittero, epato-splenomegalia e ritardo psicomotorio. Il CMV, come gli altri herpesvirus, rimane latente nell'organismo dopo l'infezione acuta. In una situazione in cui le difese immunitarie siano insufficienti, il virus può riprendere la sua azione. La diagnosi dell'infezione si basa sull'isolamento virale o sulla dimostrazione dell'aumento del titolo anticorpale(7, 8).

Questo lavoro aveva lo scopo di valutare la concordanza dei risultati ottenuti nella determinazione di diversi anticorpi (Ig anti Toxoplasma, Rubella, Cytomegalovirus) con lo strumento CHORUS, con quelli forniti dallo strumento EIA3000.

### MATERIALI E METODI

I campioni utilizzati per tale ricerca sono stati ottenuti da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio, per ottenere siero. In totale 185 campioni di sieri freschi prelevati da donne al primo trimestre di gravidanza sono stati analizzati per la presenza di IgG anti Toxoplasma, anti Rubella e anti Cytomegalovirus. Un numero inferiore di altri campioni sono stati analizzati per la ricerca di IgM anti Toxo, IgM anti Rub e IgM anti CMV.

Le determinazioni quantitative degli anticorpi IgG ed IgM anti Toxoplasma, anti Rubella, anti Cytomegalovirus

sono stata effettuata con il sistema EIA3000, già in uso nel nostro laboratorio e considerato come metodo di "riferimento", e con il sistema CHORUS (DIESSE Diagnostica Senese S.p.A), in valutazione. Entrambi gli strumenti utilizzati si basano sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). In questo metodo, l'antigene purificato ed inattivato viene legato alla fase solida. Per incubazione con siero umano diluito, le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene. Dopo i lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG o anti IgM umane, coniugate con la perossidasi di rafano. Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame. Tutti i kit diagnostici utilizzati sono prodotti dalla DIESSE Diagnostica Senese S.p.A. e contengono i reagenti necessari all'esecuzione degli esami specifici.

I risultati sono stati espressi come IU/ml per le IgG, e come rapporto di assorbanza (campione/cut-off) per le IgM. Per convenzione, i valori che nei due sistemi risultavano fuori dell'intervallo analitico utile sono stati posti uguali ai limiti minimi e massimi dei rispettivi analizzatori. In particolare, per le IgG i valori minimi erano: Toxo 5 IU/ml, Rub 5 IU/ml, CMV 0.5 IU/ml, mentre i valori massimi erano 200 IU/ml, 200 IU/ml, 30 IU/ml rispettivamente. Nella tabella 1 sono riportati i valori di riferimento per i due sistemi analitici, corrispondenti al grado d'immunità per il quale il campione viene giudicato positivo (immune), negativo (non immune) o dubbio. Qui di seguito ven-

gono riportati e discussi i risultati di 12 esami differenti (3 antigeni x 2 sistemi analitici x 2 classi immunoglobuliniche). Per identificarli sinteticamente abbiamo elaborato sigle di tre caratteri alfabetici indicanti: il primo l'antigene (T=Toxoplasma; R=Rosoliavirus; C=Citomegalovirus); il secondo l'analizzatore (E=EIA3000; C= Chorus); il terzo la classe immunoglobulinica (G=IgG; M=IgM).

Per le analisi statistiche è stato utilizzato il software SPSS. La normalità della distribuzione dei valori è stata verificata mediante il test di skewness (test di asimmetria). La correlazione analitica è stata studiata mediante il test di Spearman. La concordanza analitica è stata analizzata attraverso il test di Wilcoxon mentre la concordanza clinica è stata rilevata mediante l'utilizzo delle curve ROC, anch'esse costruite con l'utilizzo del software SPSS

## RISULTATI

Nella tabella 2 sono riassunti i risultati delle determinazioni dei tre anticorpi IgG con i due strumenti per i 185 campioni analizzati; la tabella 3 ne riporta l'indice di skewness con il suo errore standard, evidenziando una distribuzione dei valori rilevati di tipo non-gaussiana, fatta eccezione per le IgG anti Rub determinate con l'EIA3000, per le quali l'indice di skewness è di 0,272, con un ES= 0,179. Nella medesima tabella 3 sono riportati i coefficienti di correlazione (test di Spearman) nella confronto tra coppie di strumenti, che sono risultati: 0,723 per Toxo-IgG; 0,872 per Rub-IgG; 0,914 per le CMV-IgG.

Il test di Wilcoxon ha fornito un valore di Z pari a: -

**Tabella 1**

Valori di cut-off per gli strumenti EIA3000 e CHORUS proposti dalla Ditta, espressi in IU/ml per le IgG, ed in rapporto di assorbanza campione/cut-off per le IgM

Risultato	TOXOPLASMOSI		ROSOLIA		CITOMEGALOVIRUS	
	IgG IU/mL	IgM Rapporto	IgG IU/mL	IgM Rapporto	IgG IU/mL	IgM Rapporto
EIA3000						
positivo	>10	>1,2	>13	>1,2	>1,1	>1,2
negativo	<6	<0,8	<7	<0,8	<0,9	<0,8
dubbio	6-10	0,8-1,2	7-13	0,8-1,2	0,9-1,1	0,8-1,2
CHORUS						
positivo	>13	>1,2	>13	>1,2	>1,2	>1,2
negativo	<0,7	<0,8	<7	<0,8	<0,8	<0,8
dubbio	7-13	0,8-1,2	7-13	0,8-1,2	0,8-1,2	0,8-1,2

**Tabella 2**

Numero di campioni risultati positivi, negativi e dubbi con i due sistemi analitici EIA3000 e CHORUS

Risultato	Toxo IgG		Rub IgG		CMV IgG	
	EIA3000	CHORUS	EIA3000	CHORUS	EIA3000	CHORUS
Positivo	41	39	131	132	126	123
Negativo	143	144	52	52	59	60
Dubbio	1	2	2	1	-	2

**Tabella 3**

Determinazione dei tre differenti anticorpi (T, R e C) di classe IgG con due sistemi analitici: verifica della asimmetria di distribuzione (skewness) e della correlazione tra le coppie

Esame	Indice di asimmetria (skewness) ± ES	Coefficiente di correlazione di Spearman e relativo P (*)
TEG	3,127 ± 0,179	0,723 (P=0,000)
TCG	2,847 ± 0,179	
REG	0,272 ± 0,179	0,872 (P=0,000)
RCG	1,015 ± 0,179	
CEG	2,058 ± 0,179	0,914 (P=0,000)
CCG	1,002 ± 0,179	

(\*) la correlazione è significativa per  $P < 0,01$

8,441 (  $P = 0,000$  ) per Toxo-IgG; -3,986 (  $P = 0,000$  ) per Rub-IgG; -0,76 (  $P = 0,447$  ) per CMV-IgG.

Le curve ROC sono state generate ponendo il sistema EIA3000 come riferimento e utilizzando rispettivi valori di cut-off proposti (tabella 1) come valori di soglia di discriminazione fra "positivi" e "negativi" all'esame test, per entrambi gli strumenti. Di conseguenza, l'area sotto la curva (AUC) per i dati rilevati con l'EIA3000 è stata considerata uguale ad 1, riferendo quindi a tale valore (uno) le AUC per i dati rilevati con il CHORUS. L'analisi delle curve ROC (figura 1abc) con i dati CHORUS ha evidenziato: AUC = 0,988 (ES = 0,014) per IgG-Toxo (TCG); AUC = 0,999 (ES = 0,001) per IgG-Rub (RCG); AUC = 0,904 (ES = 0,030) per IgG-CMV (CCG) (tabella 4).

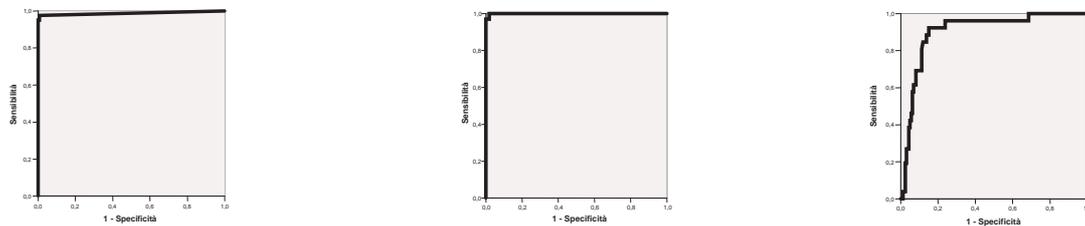
Ulteriori campioni sono stati esaminati, dopo suddivisione in tre gruppi, per i risultati della determinazione di IgM anti Toxo, anti Rub ed anti CMV, rispettivamente, ma il numero dei dati disponibili era inferiore a quello relativa alla determinazione di anticorpi IgG. I risultati ottenuti sono stati tuttavia incoraggianti, con valori rilevati di AUC >0,8.

## DISCUSSIONE

Il lavoro vuole mettere ha confronto due sistemi analitici per la determinazione nel siero di anticorpi IgG e IgM anti Toxoplasma, Rosoliavirus e Cytomegalovirus. Sui due sistemi è stato esaminato un gruppo campione randomizzato di 185 sieri per gli anticorpi di classe IgG, e successivamente ulteriori campioni per le IgM.

Per analizzare la concordanza tra i due sistemi abbiamo considerato il CHORUS come strumento in studio rispetto all'EIA3000 come strumento di riferimento (Gold Standard).

La prima verifica è stata di tipo statistico descrittiva, per poi proseguire con quella inferenziale. In particolare si è voluto verificare la correlazione analitica come indice predittivo negativo, la concordanza analitica e la concordanza clinica. Siamo partiti dal presupposto della perfetta correlazione analitica e della buona concordanza analitica in base, soprattutto, ai valori di cut-off proposti per i due sistemi che non sono dissimili fra loro. Abbiamo eseguito i test di sensibilità e specificità utilizzando le curve Roc, il test di correlazione di Spearman e l'analisi della concordanza non parametrica mediante il test di Wilcoxon.

**Figure a,b,c**

Curve ROC per i valori misurati con il sistema CHORUS per gli anticorpi di classe IgG anti-Toxoplasma (a), anti-Rosoliavirus (b), e anti-Cytomegalovirus (c)

**Tabella 4**

Valori dell'area sotto la curva (AUC), e relativi Errori Standard (ES), derivati dalle curve ROC

Esame	AUC ± ES	Intervallo di confidenza 95%
TEG	1,000 ± 0,000	1,000 ÷ 1,000
TCG	0,988 ± 0,014	0,960 ÷ 1,015
REG	1,000 ± 0,000	1,000 ÷ 1,000
RCG	0,999 ± 0,001	0,996 ÷ 1,001
CEG	1,000 ± 0,000	1,000 ÷ 1,000
CCG	0,904 ± 0,030	0,845 ÷ 0,962

Come si vede dalla tabella 3 la distribuzione dei dati ottenuti, in generale, non è di tipo gaussiano. La buona correlazione analitica tra gli strumenti è documentata dai coefficienti di Spearman nella determinazione delle IgG, che sono risultati 0.723 (Toxo), 0.872 (Rub), e 0.914 (CMV). L'applicazione del test di Wilcoxon ha dimostrato che nella rilevazione delle IgG anti Toxo e anti Rub c'è concordanza analitica, mentre nella determinazione delle IgG anti CMV non c'è concordanza "non parametrica" poiché  $Z = -0,761$  ( $P = 0,447$ ).

L'applicazione delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic) ad un esame diagnostico permette di valutarne la validità (9), di scegliere il cut-off ottimale, di confrontare esami diversi per la diagnosi della stessa patologia ecc. In particolare la capacità discriminante di un esame, ossia la sua attitudine a separare la popolazione in studio in "malati" e "sani", è proporzionale all'estensione dell'area sottesa alla curva ROC (Area Under Curve, AUC). L'AUC rappresenta un parametro fondamentale per la valutazione della attendibilità di un esame, in quanto costituisce una misura di accuratezza non dipendente dalla prevalenza ("pure accuracy"). Due esami possono essere confrontati tra loro comparando le aree sottese alle corrispondenti curve ROC (10). Per quanto riguarda l'interpretazione del valore di AUC, si può tener presente la classificazione della capacità discriminante di un esame proposta da Swets(11) nel modo seguente: non informativo ( $AUC=0,5$ ); poco accu-

rato ( $0,5 < AUC < 0,7$ ); moderatamente accurato ( $0,7 < AUC < 0,9$ ); altamente accurato ( $0,9 < AUC < 1,0$ ); perfetto ( $AUC=1,0$ ). Nel nostro studio abbiamo assegnato a EIA3000 (strumento di riferimento in uso nel nostro laboratorio)  $AUC=1,0$  e riferito ad esso i valori di AUC ottenute con il CHORUS (figura 1abc). Per le IgG calcolate con lo strumento in studio abbiamo in tal modo ottenuto:  $AUC = 0,988$  (Toxoplasma);  $AUC = 0,999$  (Rosoliavirus);  $AUC = 0,904$  (Cytomegalovirus) (tabella 4).

In questo studio, i soggetti sono stati classificati in "sani" e "malati" sulla base dei risultati ottenuti con il sistema di riferimento (EIA3000) e dei relativi valori di cut-off. Con questo sistema, ovviamente, AUC è uguale ad 1, così come sensibilità e specificità sono entrambe uguali al 100%. Ci siamo quindi chiesti se i risultati forniti dal sistema CHORUS avessero AUC, sensibilità e specificità simili a quelle dei risultati del sistema EIA3000, soprattutto per quei campioni dove non c'era concordanza analitica (IgG anti CMV). La sovrapposibilità delle AUC dei due sistemi ci indica la stessa sensibilità e specificità clinica. I dati tabellari (non riportati ma calcolati dal sw SPSS) ci hanno dimostrato valori di sensibilità e specificità sovrapposibili nei due sistemi, ai valori di cut-off sopra definiti per il sistema EIA3000.

Valutando i risultati preliminari per gli anticorpi IgM, si può confermare l'esistenza di una buona concordanza analitica tra gli strumenti, anche se il numero dei campio-

ni è minore rispetto a quello relativo agli anticorpi IgG. Pertanto possiamo affermare che tra i due strumenti analitici c'è un'ottima concordanza nella determinazione delle IgG e che probabilmente si ha anche nella rilevazione delle IgM.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ* 2000; 321: 142-147.
2. Desmonts G., Daffos F., Forestier F. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1985; 1: 500-503.
3. Daffos F., Forestier F., Capella-Pavlosky M. et al. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med* 1988; 318: 271-275.
4. Miller E., Craddock-watson J.E., Pollok T.M. Consequences of confirmed maternal rubella of successive stages of pregnancy. *Lancet II* 1982:781-784.
5. Enders G., Nickerl- Pacher U., MillerE., Craddock-watson J.E., Outcome of confirmed periconceptual maternal rubella. *The Lancet* 1988; 336; 1445-46.
6. Mc Intosh E.D.G., Menser M.A. A fifty-years follow-up of congenital rubella. *The Lancet* 1992; 340: 415.
7. Grose C., Meehan T., Weiner CP. Prenatal diagnosis of congenital Cytomegalovirus infection by virus isolation following amniocentesis. *Pediatric Infect Dis J* 1992;11: 605-607.
8. Fowler B.K., Stagno S., Pass R.F. et al. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326:663-667.
9. Rocchi M. La valutazione di un esame diagnostico mediante curve ROC: alcune osservazioni. *Biochimica clinica* 2001;25:382-389.
10. Bottarelli E., Parodi S. Un approccio per la valutazione della validità dei test diagnostici: le curve ROC (Receiver Operating Characteristic). *Ann Fac Medic Vet di Parma* 2003;XXIII:46-68.
11. Swets J.A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1998; 240:1285-1293.