

MeB – Pagine Elettroniche

Volume IV

Maggio 2001

numero 5

PEDIATRIA PER L'OSPEDALE

Le prove di laboratorio per la diagnosi di toxoplasmosi congenita

La maggior parte dei neonati con toxoplasmosi congenita (TC) è normale all'esame obiettivo; purtroppo una gran parte dei neonati non riconosciuti e non trattati sviluppano nelle età successive alterazioni a carico dell'occhio e del sistema nervoso centrale (**Guerina NG et al, 1994**).

Vi sono alcuni punti chiave per la diagnosi di toxoplasmosi congenita:

- 1) identificazione precisa del momento d'inizio dell'infezione nella donna in stato di gravidanza
- 2) determinazione del momento d'inizio dell'infezione nel prodotto del concepimento
- 3) riconoscimento che l'infezione sia avvenuta dopo la nascita
- 4) adattamento delle procedure per praticare un screening di massa, con buon rapporto costo-efficacia, sia nelle donne in stato di gravidanza che nei neonati.

A questo proposito va riconosciuto che una gran parte delle prove di laboratorio, disponibili nei laboratori privati e negli ospedali, è inaccurata e spesso mal interpretata. Questa affermazione è particolarmente vera per le prove d'immuno-fluorescenza indiretta per anticorpi IgG e IgM e per i sistemi immuno-enzimatici (ELISA) che misurano gli anticorpi IgM specifici: per questo la Food and Drug Administration ha avvertito gli operatori sanitari USA sulla possibilità di una cattiva interpretazione della sierologia IgM, per la quale suggerisce una Tavola d'interpretazione (Vedi Tavola n.1).

In linea di massima tutte le infezioni sospette vanno confermate da laboratori specializzati. Sono in preparazione prove di ultima generazione, che si basano su antigeni specifici, piuttosto che su toxoplasma interi o lisati: queste nuove prove potranno migliorare le risposte nel futuro.

LE PROVE SIEROLOGICHE PER LA DIAGNOSI DI TOXOPLASMOSI

Le prove sierologiche per la diagnosi di toxoplasmosi sono molto numerose: alcune di esse hanno un significato simile.

1) Prova del colore di Sabin-Feldman: è una prova sensibile e specifica. Serve principalmente per valutare gli anticorpi della classe IgG. I risultati sono espressi in Unità Internazionali (UI/mL). La prova si basa su standard di riferimento dell'OMS.

2) Prova degli anticorpi IgG con fluorescenza indiretta (IgG-IFA): misura gli stessi anticorpi che sono determinati

con la prova precedente, per cui i titoli di regola vanno paralleli. Questi anticorpi di norma compaiono 1-2 settimane dopo l'infezione, raggiungono livelli elevati dopo 6-8 settimane (titoli di 1:1.000 o superiori) e si riducono dopo mesi-un anno. Titoli bassi (1:4-1:64) persistono in generale per tutta la vita. Il titolo anticorpale non si correla con la gravità della malattia. Circa la metà dei kit IFA per il toxoplasma è stata trovata non standardizzata in modo appropriato, per cui possono essere trovati numerosi risultati falsamente positivi o falsamente negativi.

3) Prova di agglutinazione (Bio-Merieux): è una prova disponibile in Europa, preparata con parassiti interi, conservati in formalina, atti a dimostrare gli anticorpi. Questa prova è accurata, semplice da eseguire e di poca spesa.

4) Prova degli anticorpi IgM con la fluorescenza indiretta (IgM-IFA): è una prova utile per la diagnosi d'infezione acuta da toxoplasma nei bambini più vecchi, perché gli anticorpi della classe IgM appaiono più precocemente (anche solo dopo 5 giorni dall'infezione) e scompaiono più presto degli anticorpi della classe IgG. Nella maggior parte dei casi, gli anticorpi ritrovati con questa prova aumentano rapidamente (a livelli da 1:50 a meno di 1:1.000) e cadono a bassi livelli (1:10-1:20) o scompaiono dopo settimane o mesi. Da tener presente che alcuni soggetti continuano ad avere risultati positivi a basso titolo, anche per molti anni. Ma va anche ricordato che la prova IgM-IFA ritrova gli anticorpi specifici IgM soltanto nel 25% dei lattanti, infettati congenitamente, alla nascita. Gli anticorpi IgM spesso non sono presenti anche nei pazienti immuno-deficienti con toxoplasmosi acuta o nella maggior parte dei pazienti con toxoplasmosi attiva, presente soltanto nell'occhio. La prova IgM-IFA può dare inoltre risultati falsamente positivi, in soggetti fattore-reumatoide positivi.

5) Prova immuno-enzimatica (ELISA) doppio-sandwich (IgM-ELISA): è più sensibile e specifica della prova IgM-IFA per la dimostrazione di anticorpi specifici della classe IgM. Nei bambini di età più avanzata, un livello di 2 o superiore in anticorpi IgM contro il toxoplasma nel siero, indica che l'infezione è stata acquisita di recente. L'IgM-ELISA dimostra circa il 75% dei lattanti con infezione congenita. La prova IgM-ELISA evita sia i risultati falsamente positivi, dovuti alla presenza del fattore reumatoide, che i risultati falsamente negativi, dovuti agli alti livelli di anticorpi IgG, di origine materna, trasferiti passivamente, come avviene nella prova IgM-IFA. I risultati ottenuti con i kit del commercio vanno interpretati con cautela, perché le risposte falsamente positive non sono rare. Va fatta molta attenzione per guardare se il kit è stato standardizzato per la diagnosi d'infezione, per esempio nel neonato.

6) Prova IgA-ELISA: è più sensibile della prova IgM-ELISA per la dimostrazione d'infezione congenita del feto e del neo-

nato, come anche per la dimostrazione d'infezione acuta in alcune donne in stato di gravidanza.

7) Prova d'immuno-agglutinazione (ISAGA): combina la fissazione delle IgM del paziente su una superficie solida con l'uso del toxoplasma fissato con la formalina a particelle di latex, coperte di anticorpi. Non ci sono risultati falsamente positivi, dovuti al fattore reumatoide o agli anticorpi antinucleo. Come abbiamo visto gli anticorpi IgM verso il toxoplasma si dimostrano con la prova IgM-IFA in un periodo minore di tempo di quanto non sia possibile con la prova IgM-ELISA. La prova IgM-ISAGA è più sensibile della prova IgM ELISA e può dimostrare la presenza di anticorpi specifici IgM, prima e per periodi di tempo più lunghi della prova IgM ELISA. Al momento la prova IgM ISAGA è la prova migliore per la diagnosi d'infezione congenita nel neonato. Sia la prova IgE ELISA, che la prova IgE ISAGA possono essere utili per la diagnosi di TC infezione acuta da toxoplasma.

8) Prova di agglutinazione differenziale (HS/SC): questa prova confronta il titolo anticorpale ottenuto con i tachioziti fissati con la formalina (antigene HS) con i titoli ottenuti usando i tachioziti fissati con acetone o con alcool metilico, per differenziare le infezioni recenti o lontane nei bambini più grandi e nell'adulto. Questo metodo può essere particolarmente utile nel differenziare le infezioni lontane nelle donne in gravidanza, poiché i livelli di IgM e IgA dimostrabili con ELISA o ISAGA possono rimanere a livelli elevati per periodi di tempo molto lunghi (da mesi ad anni negli adulti e nei bambini più grandi).

9) Prova di emagglutinazione indiretta (IHA): questa prova misura anticorpi diversi contro il toxoplasma da quelli misurati con l'IFA o con la prova del colore. Essi possono persistere per anni. Va ricordato tuttavia che la prova IHA non deve essere usata per i lattanti con sospetta infezione congenita o nello screening nelle donne in stato di gravidanza, perché essa può essere negativa per un periodo di tempo troppo lungo, inizialmente durante l'infezione.

10) Valutazione del livello anticorpale nell'umor acqueo dell'occhio e nel liquor: livelli relativamente più alti di anticorpi contro il toxoplasma, in questi liquidi, dimostrano una produzione locale di questi anticorpi durante la toxoplasmosi attiva dell'occhio o del sistema nervoso centrale. Il rapporto è calcolato come segue:

titolo di anticorpi nel liquido esaminato concentrazione di IgG nel siero

titolo di anticorpi nel liquido esaminato concentrazione di IgG nel siero C = ----- x -----

----- titolo di anticorpi nel siero
concentrazione di IgG nel liquido esaminato

Coefficienti significativi di correlazione sono 8 o più per l'occhio, 4 o più per il SNC e oltre 1 per i pazienti con malattia del SNC e AIDS. Se il titolo sierico della prova del colore è di 300 UI/mL o più, molto spesso non è possibile dimostrare la produzione di anticorpi specifici locali, usando questa formula, sia con la prova del colore che con la prova IgM-IFA. Anticorpi della classe IgM possono essere presenti nel liquor.

11) Ricerca degli antigeni del toxoplasma: l'antigene può essere ritrovato durante l'infezione acuta, ma non nei sogget-

ti non infetti o in quelli infetti cronicamente. L'antigene si ritrova nel siero, nel liquido amniotico e nel liquor di pochi bambini con malattia congenita.

12) Western blot comparativo: del siero di una madre e di un bambino. L'infezione congenita è sospettata quando il siero della madre e il siero del bambino contengono anticorpi che reagiscono con differenti antigeni del toxoplasma.

13) Prova immuno-enzimatica di filtrazione: la prova si esegue usando membrane micropori, che permettono simultaneamente lo studio della specificità anticorpale con l'immunoprecipitazione e la caratterizzazione dell'isotipo anticorpale con l'immunofiltrazione per mezzo di anticorpi, marcati con enzimi. Questo metodo è capace d'identificare l'85% dei casi d'infezione congenita nei primi giorni di vita. E' ancora da sottoporre a valutazione

14) Polymerase chain reaction (PCR): viene usata amplificando il DNA del toxoplasma, che può essere identificato usando una sonda DNA. La dimostrazione di un gene (B1) ripetuto del toxoplasma, nel liquido amniotico, rappresenta il metodo di scelta per la diagnosi di TC nel feto. La sensibilità e la specificità di questa prova nel liquido amniotico, ottenuto alla 18° settimana o più di gestazione, è di circa il 95%. La PCR dell'umor vitreo è utile per la diagnosi di toxoplasmosi oculare

15) Blastogenesi linfocitaria verso gli antigeni del toxoplasma: questa prova viene usata per la diagnosi di TC, se la diagnosi non è ancora sicura e le altre prove sono risultate negative. Tuttavia una prova negativa non esclude la diagnosi, perché molti lattanti infettati non rispondono agli antigeni del toxoplasma nel periodo neonatale.

LA DIAGNOSI NELLA DONNA IN STATO DI GRAVIDANZA

Eccetto che in rari casi, soltanto le infezioni primitive che avvengono durante la gestazione, possono portare a infezione fetale. Ma la diagnosi clinica di T in una donna gravida è complessa, perché la maggior parte delle donne che hanno una T acquisita sono asintomatiche, salvo alcune che presentano una linfadenopatia cervicale o un quadro clinico mononucleosi-simile: per questa ragione la ricerca di anticorpi specifici si rende necessaria.

Le prove sierologiche sono il principale mezzo di diagnosi, ma i loro risultati vanno, come abbiamo visto, interpretati con cautela.

La ricerca degli anticorpi IgG non ci permette di differenziare l'infezione primaria acuta dalle infezioni latenti di lunga durata. Le prove più usate per la ricerca degli anticorpi IgG sono, come abbiamo visto, quelle dell'immunofluorescenza indiretta e dell'ELISA. Una prova positiva per gli anticorpi IgG alla fluorescenza indiretta o alle prove ELISA è confermata da alti titoli (1.000 o più) alla prova del colore di Sabin-Feldman. Essi raggiungono un picco 1-2 mesi dopo l'infezione e restano positivi indefinitivamente; i pazienti con sieroconversione o con aumento del titolo di almeno 4 volte debbono essere sottoposti alla ricerca delle IgM specifiche, pres-

so un laboratorio specializzato, per confermare l'infezione acuta.

Come abbiamo visto, molte altre prove sono disponibili per determinare l'acuzie dell'infezione materna, attraverso la ricerca di anticorpi anti-toxoplasma delle classi IgM, IgA e IgE. Le prove immunoenzimatiche sono più sensibili rispetto all'immunofluorescenza indiretta per la ricerca delle IgM. L'acuzie dell'infezione può essere determinata anche con le recenti prove per determinare l'avidità dell'anticorpo. Gli anticorpi specifici IgM possono essere misurabili entro 2 settimane dall'infezione, raggiungono il picco entro un mese, si abbassano in seguito e di solito non sono più dosabili entro 6-9 mesi. In rari casi le IgM specifiche possono persistere per 2 anni, per cui questo reperto confonde la differenziazione di base: quella di distinguere l'infezione acuta da quella passata.

Gli anticorpi delle classi IgA e IgE si riducono a concentrazioni non misurabili, molto prima di quanto non avven-

ga per le IgM: tuttavia le prove per dimostrarli sono utili per la diagnosi di infezione congenita e in altri pazienti per i quali siano necessarie informazioni più precise sulla durata dell'infezione, come avviene nelle donne in stato di gravidanza.

Se viene stabilito attraverso gli esami che si tratta di un'infezione acuta recente, è bene documentare l'infezione usando l'amplificazione PCR del gene B1 del *Toxoplasma gondii* in un campione di liquido amniotico. La PCR sul liquido amniotico ha sostituito le prove sierologiche o la coltura del sangue fetale, attenuato alla cordonocentesi.

Se il feto ha subito dei danni di organo, come conseguenza dell'infezione embrionale o fetale, sarà possibile determinarlo con esami seriati all'ecografia, ricercando in particolare modo l'idrocefalo, le calcificazioni intracraniche o l'organomegalia.

	IgM-positivo	IgM-equivoco	IgM-negativo
IgG positivo	Possibile infezione recente. Inviare campione al laboratorio di riferimento	Infezione da più di un anno o IgM falsamente positive. Ripetere l'esame e se il risultato è uguale inviare il campione a un laboratorio di riferimento	Infezione da più di un anno
IgG equivoco	Possibile infezione acuta. Ripetere e se il risultato è lo stesso o è IgG positivo, inviare un campione al laboratorio di riferimento	Risultato indeterminato. Ripetere la prova	Risultato indeterminato. Ripetere la prova o ricercare le IgG con altro tipo di prova
IgG negativo	Infezione acuta o prova falsamente positiva. Ripetere l'esame e se il risultato è uguale, concludere che la prova IgM è falsamente positiva	Infezione acuta o prova falsamente positiva. Ripetere e se il risultato è lo stesso concludere che non c'è infezione.	Nessuna prova d'infezione
IgG			

negativo

Infezione acuta o prova falsamente positiva. Ripetere l'esame e se il risultato è uguale, concludere che la prova IgM è falsamente positiva

Infezione acuta o prova falsamente positiva. Ripetere e se il risultato è lo stesso concludere che non c'è infezione.

Nessuna prova d'infezione

LA DIAGNOSI NEL NEONATO

Dopo il parto esistono numerose modalità per cercare una conferma del sospetto d'infezione fetale.

Fra queste in primo luogo l'inoculazione intraperitoneale del tessuto placentare fresco nel topo di laboratorio per coltivare il T (Kasper HL, 2001).

Molto importante è inoltre la valutazione clinica del neonato con sospetta toxoplasmosi congenita, eventualmente associata a una TC cranica, a una visita oftalmologica, un emocromo completo, la ricerca degli enzimi epatici e l'esame del liquido cerebro-spinale. Accanto a questi esami la ricerca degli anticorpi IgM, IgA e IgE fornisce ulteriori argomenti alla diagnosi. A questo proposito bisogna tuttavia ricordare che molti dei lattanti, effettivamente infettati, mancano degli anticorpi specifici della classe IgM, mentre la maggior parte di essi ha anticorpi verso l'una o l'altra delle classi di Ig. Un complesso di prove d'altra parte è in grado di fornire sufficienti documentazioni per raggiungere la diagnosi. Nei casi

equivoci può essere usata la trasformazione blastica dei linfociti in risposta agli antigeni di lisati di toxoplasma. Tuttavia questa prova è negativa in circa la metà dei neonati infetti, ma diviene positiva in tutti all'età di un anno.

Gli anticorpi IgG si abbassano durante il trattamento nel primo anno di vita, ma si assiste a un rimbalzo sierologico in quasi tutti i casi dopo la sospensione della terapia. Anche questo fenomeno può risultare utile nella diagnosi dei casi dubbi.

SCREENING DI MASSA

In molti Paesi europei con alta incidenza di TC vengono praticati screening di massa sia nelle madri che nei lattanti, con dosaggi mensili delle prove nelle donne in stato di gravidanza: queste prove in serie sono capaci di stabilire il momento preciso dell'infezione materna, ma ovviamente richiedono un sistema complesso di raccolta di siero, stoccaggio, e metodiche di trattamento (Remington JS et al., 2000).

Gli screening neonatali (Guerina NG et al, 1994, CDC 2000) per la TC identificano le infezioni subcliniche: un trattamento precoce può ridurre le più gravi sequele a lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

Boyer KM - *Pediatr Infect Dis J* 20, 59-60, 2001

CDC - Preventing congenital toxoplasmosis - *MMWR* 49, RR 2, pag.57-72, 2000

FDA Public Health Advisory 1997; <http://www.fda.gov/cdrh/toxopla.html>

Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC et al - Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N Engl J Med* 330, 1858-63, 1994

Kasper HL - Toxoplasmosis, in E. Braunwald et al, *Principles of Internal Medicine*, Harrison's 15° ed., McGraw Hill, New York, 2001, pag 1222-7

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G - Toxoplasmosis, in JS Remington, JO Klein, *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 5° ed. WB Saunders Ed., Philadelphia, 2000, pag. 205-346