

# Diagnostica immunoenzimatica della mononucleosi infettiva con test rapido

Giorgio Tamaro, Michela Donato, Sergio Parco  
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste

## Abstract

### *Infectious mononucleosis: immunoenzymatic diagnosis with rapid test*

**Objective** To establish if the determination of specific antigens against Epstein-Barr virus (EBV), by the commercial immunoenzymatic tests (VCA), may be a useful diagnostic and prognostic tool with a higher sensibility and specificity in respect to rapid diagnostic methods with heterophylous antibodies (MNI) is the aim of this paper.

**Methods** 163 serum samples of paediatric patients, subdivided in eight groups have been studied.

**Results** This method has a good specificity (92.6% in the first group and 84.8% in the second group) in patients without or with a past history of EBV infection (positive attended value). While the sensibility is only of 61.8% in patients with active disease (the third group).

**Discussion** VCA tests should be used in case of a doubtful diagnosis or for a latent or in evolution disease.

Quaderni acp 2008; 15(2): 56-58

**Key words** Infective mononucleosis. Immunoenzymatic tests. Rapid tests. MNI test

**Obiettivi** Evidenziare quanto la determinazione delle immunoglobuline contro specifici antigeni del virus di Epstein-Barr (EBV), mediante i comuni test immunoenzimatici del commercio (VCA) possa essere utilizzata per focalizzare diagnosi e decorso della malattia con maggiore sensibilità e specificità rispetto ai metodi di ricerca rapida di anticorpi eterofili (MNI).

**Metodi** Sono stati studiati 163 sieri di pazienti pediatriche, divisi in 8 gruppi.

**Risultati** Il test MNI nei pazienti senza storia di infezione o con infezione EBV pregressa (valore atteso positivo) conferma come tale metodo abbia una buona specificità (92,6% nel primo gruppo e 84,8% nel secondo); nel gruppo tre (pazienti con infezione in atto) la sensibilità è solamente del 61,8%.

**Conclusione** Gli Autori concludono che si deve suggerire che ai test rapidi vengano associati in casi dubbi o di malattia latente o in evoluzione test immunoenzimatici per approfondire diagnosi e stato immunitario.

**Parole chiave** Mononucleosi infettiva. Diagnostica immunoenzimatica. Test rapidi. MNI test

## Introduzione

La mononucleosi infettiva (MI) è una patologia acuta e auto-limitante; ha come agente eziologico il virus di Epstein-Barr appartenente alla famiglia degli *Herpesviridae*.

L'infezione primaria da parte di questo microrganismo risulta generalmente asintomatica nella prima infanzia mentre, se contratta nell'adolescenza o in età adulta, è solitamente associata ai segni clinici della MI e precisamente febbre, linfadenopatia e, in alcuni pazienti, presenza in circolo di linfociti atipici [1-2]. Una diagnosi di questa malattia basata sui soli sintomi non appare sufficiente-

mente accurata, in quanto alcuni dei suoi segni clinici si riscontrano anche in altre patologie virali, mentre non in tutti i pazienti si osservano i linfociti circolanti atipici, caratteristici della malattia. Spesso, pertanto, quando si sospetta questa patologia, vengono effettuate delle analisi sierologiche che rilevino la presenza, nel sangue del paziente, di anticorpi associati alla mononucleosi infettiva [3-4]. Le analisi utilizzate più di frequente a questo scopo consistono nel dosaggio di immunoglobuline dirette contro specifici antigeni del virus di Epstein-Barr o nella ricerca, nel siero del paziente, dei cosiddetti anticorpi eterofili, in grado di

agglutinare emazie di montone o di cavallo [5-6].

Per quanto riguarda il dosaggio di anticorpi contro specifici antigeni virali, generalmente vengono valutate le concentrazioni delle IgM e delle IgG anti-antigene del capsido virale (*Viral Capsid Antigen*, VCA), delle IgG anti-antigene precoce (*Early Antigen*, EA) e delle IgG anti-antigene nucleare (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*, EBNA) [7].

In base alla combinazione dei dati ricavati da questi dosaggi, i pazienti possono essere suddivisi in quattro principali categorie e precisamente:

- 1. pazienti senza storia di infezione:** negativi per i dosaggi di tutte le immunoglobuline citate;
- 2. pazienti con infezione in atto:** nel loro siero si osserva la presenza di IgM anti-VCA e spesso anche di IgG anti-EA. I livelli delle IgG anti-VCA, invece, subiscono un lento incremento durante la fase di infezione acuta, e successivamente persistono per tutta la vita. Poiché, invece, la concentrazione delle IgM anti-VCA scende rapidamente durante la convalescenza, la positività nei confronti delle IgG anti-VCA indica infezione in atto solo in caso di contemporanea positività alle IgM anti-VCA;
- 3. pazienti con infezione pregressa:** presentano elevato titolo anticorpale di IgG anti-VCA e di IgG anti-EBNA;
- 4. pazienti con riattivazione del virus latente:** risultano positivi per IgM anti-VCA, IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA, quindi presentano contemporaneamente segni dell'infezione in atto e dell'infezione pregressa. Questo profilo potrebbe essere osservato anche in pazienti che sono andati incontro all'infezione di recente quindi risultati di questo tipo non sono facilmente interpretabili [8].

Per diagnosticare la malattia, oltre che ricorrere a questi dosaggi generalmente effettuati con metodi immunoenzimatici,

Per corrispondenza:  
Sergio Parco  
e-mail: parco@burlo.trieste.it

research letters

si può valutare la presenza, nel sangue del paziente, delle agglutinine dette anticorpi eterofili, osservando il comportamento del siero quando viene messo a contatto con eritrociti di cavallo. Test di questo tipo sono particolarmente rapidi ed economici, tuttavia non sono caratterizzati da elevate sensibilità e specificità. Anticorpi eterofili vengono, infatti, prodotti anche in altre condizioni patologiche, quali la malattia da siero, alcune patologie virali diverse dalla mononucleosi infettiva, alcuni stati linfoproliferativi. Queste agglutinine risultano, inoltre, assenti nel siero del 10-20% degli adulti affetti da MI; se si considerano bambini di età inferiore ai dodici anni, questa percentuale sale al 50%. Infine, gli anticorpi eterofili permangono nel siero fino a sei-dodici mesi dopo l'infezione.

La positività di un campione legata a cause diverse dalla MI può essere eliminata facendo adsorbire il siero del paziente con omogenato di rene di cavia (antigene Forssman) prima di farlo reagire con le emazie: questo pretrattamento consente di inattivare agglutinine prodotte nel corso di patologie non provocate dal virus di Epstein-Barr [9].

### Obiettivi della ricerca

Scopo del presente lavoro è la valutazione dei test immunoenzimatici per la rilevazione di IgM anti-VCA, IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA (Bouty, Sesto San Giovanni, Italy), comunemente impiegati per seguire il percorso diagnostico della MI nei pazienti pediatrici, rispetto alla sensibilità e specificità dimostrate dai metodi "rapidi" usati per la rilevazione di anticorpi eterofili (MNI-Bouty, Sesto San Giovanni, Italy).

### Materiali e metodi

Sono stati considerati 163 sieri, pervenuti al Laboratorio Analisi dell'IRCCS Burlo Garofolo (Trieste, Italia), di pazienti la cui età variava dai 3 ai 16 anni (e un adolescente di 18 anni già seguito dal nostro Istituto per patologie coesistenti), con sospetta MI o sospetta produzione di anticorpi eterofili.

Su ciascuno di questi sieri sono state effettuate le seguenti analisi:

1. dosaggio delle IgM anti-VCA tramite kit Beia EBV VCA IgM Quant (Bouty, Sesto San Giovanni, Italy);
  2. dosaggio delle IgG anti-VCA tramite kit Beia EBV VCA IgG Quant (Bouty, Sesto San Giovanni, Italy);
  3. dosaggio delle IgG anti-EBNA tramite kit Beia EBV EBNA-1 IgG Quant (Bouty, Sesto San Giovanni, Italy);
  4. ricerca di anticorpi eterofili tramite test MNI (Bouty, Sesto San Giovanni, Italy): si tratta di un test rapido di agglutinazione in cui non viene utilizzato l'antigene Forssman ma gli eritrociti di cavallo, sottoposti a un particolare trattamento che assicuri la specificità del test.
- Sulla base dei risultati ottenuti nei tre test immunoenzimatici i pazienti sono stati suddivisi in otto gruppi e precisamente:
1. gruppo con valori negativi per IgG anti-VCA, IgM anti-VCA e IgG anti-EBNA (pazienti senza storia di infezione);
  2. gruppo con valori positivi per IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA, ma negativi per IgM anti-VCA (pazienti con infezione progressa);
  3. gruppo con valori positivi per IgG anti-VCA e IgM anti-VCA, ma negativi per IgG anti-EBNA (pazienti con infezione in atto);
  4. gruppo con valori positivi per IgG anti-VCA, ma negativi per IgM anti-VCA e IgG anti-EBNA;
  5. gruppo con valori negativi per IgG anti-VCA, ma positivi per IgM anti-VCA e IgG anti-EBNA;
  6. gruppo con valori negativi per IgG anti-VCA e IgM anti-VCA, ma positivi per IgG anti-EBNA;
  7. gruppo con valori positivi per IgM anti-VCA ma negativi per IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA;
  8. gruppo con valori positivi per IgM anti-VCA, IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA.
- Dai risultati del test MNI all'interno dei gruppi 1 e 2 (valore atteso negativo) si è calcolata la specificità di questa analisi, mentre da quelli relativi al gruppo 3 (valore atteso positivo) è stato possibile valutarne la sensibilità.

### Risultati

- ▶ Al gruppo 1 appartenevano 54 campioni, di cui 50 sono risultati negativi, 3 positivi e 1 dubbio al test MNI.
- ▶ All'interno di questo gruppo la specificità del test è risultata pari al 92,6%.
- ▶ Al gruppo 2 appartenevano 92 campioni, di cui 78 sono risultati negativi, 8 positivi e 6 dubbi al test MNI.
- ▶ All'interno di questo gruppo la specificità del test MNI è risultata pari all'84,8%.
- ▶ Al gruppo 3 appartenevano 21 campioni, di cui 8 sono risultati negativi e 13 positivi al test MNI.
- ▶ La sensibilità del test è risultata pari al 61,8%.
- ▶ Al gruppo 4 appartenevano 13 campioni, tutti risultati negativi al test MNI.
- ▶ Al gruppo 5 apparteneva 1 solo campione, risultato dubbio al test MNI.
- ▶ Al gruppo 6 apparteneva 1 solo campione, risultato negativo al test MNI.

**TABELLA RIASSUNTIVA DEI RISULTATI OTTENUTI**

Numero campioni	Gruppo	IgG	IgM	EBNA IgG	MNI Ab eter. positivi	MNI Ab eter. negativi	MNI Ab eter. dubbi	
54	1	—	—	—	3	50	1	No infezione
92	2	+	—	+	8	78	6	Infezione progressa
21	3	+	+	—	13	8	—	Infezione in atto
13	4	+	—	—	—	13	—	
1	5	—	+	+	—	—	1	
1	6	—	—	+	—	1	—	
2	7	—	+	—	—	2	—	
3	8	+	+	+	1	2	—	

- ▶ Al gruppo 7 appartenevano 2 campioni, entrambi risultati negativi al test MNI.
- ▶ Al gruppo 8 appartenevano 3 campioni, di cui 2 negativi e 1 positivo al test MNI.

### Discussione

La diagnosi della MI si basa molto spesso sulla valutazione della presenza e sul dosaggio di molecole anticorpali associate a questa patologia. I metodi immunoenzimatici consentono di dosare le concentrazioni di diversi tipi di immunoglobuline dirette contro antigeni virali: valutando i risultati di questi dosaggi, è possibile stabilire quale sia lo stato immunologico del paziente nei confronti del virus di Epstein-Barr. Si tratta di analisi abbastanza costose e che richiedono tempi piuttosto lunghi, ma forniscono risultati attendibili. I test di agglutinazione delle emazie, invece, valutano la presenza di anticorpi eterofili nel siero del paziente: analisi di questo tipo sono più rapide e meno costose dei test immunoenzimatici, ma danno risultati meno precisi e dettagliati [10]. Altri tipi di analisi, quali esami istopatologici in biologia molecolare, vengono riservati a diagnosi differenziali con sospette emopatie linfoidi [11-12].

Nel presente studio sono state valutate la specificità e la sensibilità del test MNI, un test rapido di agglutinazione per la diagnosi in vitro della MI. In questa analisi vengono utilizzate emazie di cavallo sottoposte a un particolare trattamento che migliora la specificità del test e, pertanto, non c'è bisogno di adsorbire il siero con estratto di rene di cavia prima di eseguire il test di agglutinazione vero e proprio.

La specificità del test MNI, calcolata dai campioni del gruppo 1 (appartenenti a pazienti senza storia di infezione) e del gruppo 2 (appartenenti a pazienti con infezione progressa), è risultata, all'interno di entrambi i gruppi, elevata (92,6% nel primo e 84,8% nel secondo).

La sensibilità del test, calcolata mediante l'analisi dei sieri del gruppo 3 (pazienti con infezione in atto), è stata del 61,8%: alcuni di questi campioni potrebbero, però, risultare negativi per il fatto che sono stati analizzati soprattutto campioni di pazienti pediatriche, i quali molto spesso non producono anticorpi eterofili nemmeno nella fase acuta della malattia.

Il profilo riscontrato nei campioni del gruppo 4 potrebbe essere relativo a una fase attiva dell'infezione ma anche a una condizione di immunodepressione, che avrebbe provocato la "smemorizzazione", da parte del paziente, della sintesi delle IgG anti-EBNA. Non essendo, quindi, chiaro il significato dei dati riscontrati attraverso i test immunoenzimatici, non è possibile utilizzare quanto osservato in questo gruppo per calcolare la sensibilità o la specificità del test MNI.

Quanto riscontrato nei campioni dei gruppi 5 e 6 è, invece, anomalo; infatti non si trovano interpretazioni di questo profilo in letteratura. Sarebbe interessante sottoporre i sieri di questi soggetti a ulteriori analisi, come, per esempio, il dosaggio delle IgG anti-EA.

I campioni del gruppo 7 appartenevano, verosimilmente, a soggetti in una fase precocissima dell'infezione; infatti presentavano positività alle sole IgM, prime immunoglobuline a essere prodotte in seguito alla penetrazione di un antigene nell'organismo. Questi campioni sono risultati entrambi negativi al test MNI, probabilmente perché la sintesi delle agglutinine nel siero caratterizza fasi più tardive dell'infezione, ma la negatività del test MNI potrebbe anche essere legata all'età dei soggetti. Di fronte a profili di questo tipo sarebbe opportuno che i pazienti si sottoponessero ai test immunoenzimatici e di agglutinazione dopo qualche tempo.

Per i pazienti del gruppo 8, così come per quelli dei gruppi 4, 5 e 6, non è possibile dare un'interpretazione sicura dei risultati ottenuti con i test immunoenzimatici in quanto un profilo immunologico di questo tipo potrebbe essere relativo a un periodo della convalescenza, ma anche a una riattivazione del virus dopo latenza.

Non si può, quindi, stabilire quale sia il valore atteso del test MNI in questo gruppo e quindi questi campioni non possono essere usati per determinarne la sensibilità o la specificità. Sarebbe opportuno sottoporre questi pazienti ai dosaggi delle immunoglobuline considerate in questo studio dopo qualche tempo in modo da valutare l'andamento delle concentrazioni di queste molecole anticorpali.

### Conclusioni

Sebbene il test MNI abbia dimostrato buoni valori di specificità e valori accettabili di sensibilità, sembra opportuno

associarlo, quando negativo o dubbio, nella diagnosi della MI ai dosaggi delle immunoglobuline contro specifici antigeni del virus di Epstein-Barr. Solo attraverso queste analisi più approfondite è possibile stabilire se il paziente possa essere affetto da mononucleosi infettiva in fase acuta o in via di risoluzione. Questo si rende particolarmente necessario nei bambini che in molti casi non producono agglutinine nel corso della patologia considerata. ♦

*Per l'elaborazione e la scrittura dell'articolo non sono stati utilizzati fondi, strumenti, attrezzature, materiali, provenienti dall'esterno della struttura in cui gli Autori hanno operato.*

### Bibliografia

- [1] Fleisher G, Lenette ET, Henle G, Henle W. Incidence of heterophil antibody response in children with infectious mononucleosis. *J Pediatr* 1979;94:723-8.
- [2] Kano K, Milgrom E. Heterophil antigens and antibodies in medicine. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977;77:43-69.
- [3] Klutts JS, Liao RS, Dunne WM Jr, Gronowski AM. Evaluation of a multiplied bead assay for assessment of Epstein-Barr virus immunological status. *J Clin Microbiol* 2004;42:4996-5000.
- [4] Lennette E, Henle W. Epstein-Barr virus infections: clinical and serologic features. *Lab Manag* 1987;25:23-6.
- [5] Lenette ET. Epstein-Barr virus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. Washington: ASM Press, 1999:912-27.
- [6] Okano M, Thiele GM, Davis JR, Grierson HL, Purtilo DT. Epstein-Barr virus and human diseases: recent advances in diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:300-12.
- [7] Ooka T, de Turenne-Tessier M, Stolzenberg MC. Relationship between antibody production to Epstein-Barr virus (EBV) early antigens and various EBV-related diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1991;13:233-47.
- [8] Pochedley C. Laboratory testing of infectious mononucleosis. *J Postgrad Med* 1987;81:335-42.
- [9] Sumaya CV. Epstein-Barr virus. In: Feigin RD, Cherry JD. *Textbook of pediatric infectious diseases*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company 1992:1447-5557.
- [10] Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral specific responses. *Pediatrics* 1985;75:1011-9.
- [11] Luzzatto F, Pruneri G, Benini E, Manzotti M, Laszlo D, Martinelli G. Angioimmunolymphoma with hyperplastic germinal centres and a high content of EBV-infection. *Histopathology* 2005;46(4):464-6.
- [12] Johrens K, Anagnostopoulos I, Durkop H, Stein H. Different T-bet expression patterns characterize particular reactive lymphoid tissue. *Histopathology* 2006;48(4):343-52.