

Comparación de dos métodos serológicos para el diagnóstico de anticuerpos en neonatos

Comparison of two serological methods for the diagnosis IgG antibody against in newborn

Lic Yordana Goya Batista, MSc Dailín Cobos Valdes, Dr. Rolando Sánchez Artigas, Lic. Antonio Miranda Cruz, Lic. Zuleidis Torres Ponce, Niurka Labañino Mulet.

Centro de Inmunología y Biopreparados. Holguín, Cuba.

RESUMEN

Disímiles son los métodos serológicos empleados para la determinación de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en diferentes muestras de estudio. El objetivo es realizar una comparación entre el método de Inmunofluorescencia Indirecta y el *Toxoplasma látex por Brunella* para demostrar cual es el método más sensible y específico para determinar seroprevalencia de anticuerpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* en neonatos asistidos en la Sala de Neonatología del Hospital Valdimir Ilich Lenin. Se analizaron 30 muestras de sueros de niños recién nacidos asistidos en este Servicio por las dos pruebas, de ellas se conformaron dos grupos de trabajo. Los resultados demostraron que la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta es la más útil para este diagnóstico, coincidiendo con investigaciones similares realizadas.

Palabras clave: Inmunofluorescencia Indirecta, *Toxoplasma látex*, Anticuerpos IgG, Toxoplasmosis, Sensibilidad, Especificidad, Recién nacidos.

ABSTRACT

Dissimilar are the methods used to determine the seroprevalence of IgG antibodies against to *Toxoplasma gondii* in different samples. In this research were compared to Indirect Immunofluorescence and *Toxoplasma Latex by Brunelli* to prove which of them is the most sensitive and specific to determine seroprevalence of IgG anti-*Toxoplasma gondii* in newborn in Neonatology Service at Lenin Hospital of Holguin Province, Cuba is the main objective. Thirty samples were analyzed of newborns treated in Neonatology Service using these methods, besides two working groups

were formed. The sensitivity and specificity of Indirect Immunofluorescence were 100 % and 95 % respectively and *Toxoplasma latex* reported a sensitivity of 96.1 % and a specificity of 89.6 %. These results showed that the Indirect Immunofluorescence Technique is the most useful for these diagnostic and this result are similar with others investigations.

Key words: Indirect Immunofluorescence, *Toxoplasma latex*, IgG Antibody, Toxoplasmosis, Sensitivity, Specificity, Newborn.

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es el agente etiológico de la toxoplasmosis, una zoonosis de amplia distribución mundial. La clasificación de *Toxoplasma gondii* ha sido modificada en numerosas ocasiones. En la actualidad prevalece el criterio seguido por Levine en 1973,¹ y aceptado por Frenkel² que consideran que el parásito forma parte del reino Protista, sub-reino Protozoo, *Phylum Apicomplexa*, clase Sporozoasida, sub-clase *Coccidia*, orden *Eucoccidiorida*, sub-orden *Eimeria*, familia *Sarcocystidae*, género *Toxoplasma*, especie *gondii*.³ Es un parásito intracelular obligatorio, móvil, gram negativo, sin hospedero específico (eurixeno) de forma arqueada, semilunar y carece de flagelos, pese a lo cual tiene autonomía de movimientos de rotación helicoidales, en los que participa toda la célula gracias a las fibrillas dispuestas sobre su superficie. Su tamaño varía según el órgano de donde procedan, entre 2-12 x 1,5-4 μm .⁴ Presenta tres estadios:⁵ trofozoito (forma activa del parásito y resultante de la reproducción asexual del parásito), quiste (forma de resistencia dentro de los hospederos intermediarios, resultante también de la reproducción asexual y constituye además una de las formas infectantes de este tipo de hospederos) y el ooquiste (resultante de la reproducción sexual que ocurre en los hospederos definitivos y constituye la otra forma infectante). Todos estos estadios con sus características propias tal y como definió Dubey y col en 1998. Los mecanismos patogénicos incluyen desde la morfología del parásito, los tres estadios presentes, así como la producción de enzimas que afectan las células que serán parasitadas por lo que la respuesta inmune desarrollada por el hombre es un mecanismo coordinado que implica tanto la inmunidad natural, la inmunidad humoral (anticuerpos) como la celular (linfocitos T y sus productos).^{5,6,7,8}

Los mecanismos de patogenicidad y la respuesta inmunológica del hospedero frente a este parásito constituyen los pilares sobre los cuales descansan los mecanismos para el diagnóstico directo (detección del parásito o su ADN) e indirecto (detección de anticuerpos de diferentes isotipos) de este parásito, porque no resulta fácil demostrar este agente etiológico y establecer la relación entre la infección y la enfermedad, por esta razón, el trabajo de laboratorio es básico para realizar el diagnóstico etiológico. Los métodos directos proporcionan diagnóstico de infección aguda con gran seguridad. Son poco empleados debido a que la mayor parte de las veces se utilizan técnicas y procedimientos laboriosos y lentos, como la cordocentesis. Aunque la observación del parásito es lo ideal, sólo es posible hacerlo en un reducido número de casos como por ejemplo los individuos inmunocomprometidos.⁹

El diagnóstico indirecto es el más empleado, no obstante, las pruebas serológicas presentan algunos inconvenientes como su insuficiente estandarización, dificultades de interpretación y el escaso resultado que proporciona en infecciones latentes. Se basan en comprobar la seroconversión (aumento significativo del nivel de anticuerpos específicos en por lo menos cuatro veces) en dos muestras de sangre extraídas con un intervalo de dos semanas. Ambas muestras deben ser estudiadas en el mismo laboratorio y con el uso de las mismas técnicas. Lo ideal es emplear simultáneamente dos pruebas. Las diferentes pruebas serológicas utilizan distintos antígenos y muchas de las técnicas dan un pequeño porcentaje de falsos positivos y de falsos negativos.¹⁰ El test de Sabin-Feldman ha sido la prueba de oro durante muchos años debido a su sensibilidad y especificidad, pero en la actualidad se emplea muy poco en los laboratorios. Otros métodos serológicos como la Inmunofluorescencia Indirecta, la Hemaglutinación, ELISA, ELISA de captura para los diferentes isotipos, ensayos de aglutinación han sido desarrollados y empleados en el diagnóstico.^{11,12,13,14} Por lo anterior expuesto, es el objetivo de este estudio realizar una comparación entre el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Toxoplasma látex por *Brunella*¹⁵ al demostrar cual es el método más sensible y específico para determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en esta muestra de neonatos asistidos en la Sala de Neonatología del Hospital Valdimir Ilich Lenin, Holguín, Cuba.

MÉTODOS

Universo de estudio

Universo de 72 niños recién nacidos asistidos en el servicio de prematuro del Hospital General Universitario. "V. I. Lenin" de Holguín.

Recolección de los datos

Se organizó una visita al servicio de Prematuro del Hospital General Docente Universitario. "V. I. Lenin", en el mes de septiembre del 2011 y a partir de la misma se inició la investigación. Fue aprobada por el Comité de Ética y Consejo Científico del CIBHO y diseñada según los parámetros para estudios en humanos, estipulados por la Declaración de Helsinki.

De un universo de 72 muestras de sueros proveniente de niños recién nacidos de la sala de neonatología del Hospital General Universitario. "V. I. Lenin" de Holguín, se seleccionaron 30 muestras de suero al emplear el método de una población finita con un error máximo permitido y una confiabilidad prefijada; en este caso, el error máximo permitido fue igual a 1 y la confiabilidad del 95 %, para el tamaño de muestra utilizado. El tipo de muestreo fue probabilístico, con criterios de selección aleatoria. Además antes de realizar la pesquisa para determinar anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*, se tomó el consentimiento informado de los padres o tutores para la realización del estudio.

Recolección de la muestra:

Las muestras de sangre fueron obtenidas por extracción de sangre capilar y centrifugadas a 2500 r.p.m por 5 min, posteriormente los sueros fueron congelados a -20 °C, hasta el momento de ser procesados. Se tuvo en consideración además todas las regulaciones en materia de Seguridad Biológica implementado en el CIBHO para la manipulación de este tipo de muestras.

Metodología de laboratorio

Se emplearon dos técnicas serológicas

a) Inmunofluorescencia Indirecta

Se utilizó anti-IgGh conjugada con Isotiocianato de Fluoresceína de la marca comercial SIGMA Lote 106k6035 y como sustrato antigénico una suspensión de taquizoitos de la cepa RH obtenidos a partir de un cultivo en células Vero a una concentración de 35×10^6 , donada por el Laboratorio de Referencia Nacional para la Toxoplasmosis del Instituto Pedro Kourí. La dilución de trabajo para el conjugado fue de 1:32 y para la muestra de 1:16. Como controles negativos (pool de sueros certificados) y como controles positivos (pool de sueros certificados con título:16). Se consideraron como reacciones positivas diluciones superiores a 1/16.

Montaje de la Técnica

En láminas AuBIO, de 10 pocillos fueron fijados 10 μ L de taquizoitos inactivados de la cepa RH con una concentración de 1×10^6 parásitos por campo. Se colocaron las muestras de suero de los pacientes en orden según protocolo y se les realizó una dilución de 1:16 en una solución de Cloruro de Sodio al 0,9 %. Se realizó una primera incubación en cámara húmeda por 30 minutos a 37°C, posteriormente 2 lavados de 10 minutos con PBS al 1X y el secado de las láminas se realizó a temperatura ambiente.

Se depositaron en cada pocillo 10 μ L de la dilución de trabajo del conjugado Anti-IgG. Las láminas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS al 1X, se secaron a temperatura ambiente, se les adicionó glicerol al 1 % en PBS 1X y se les colocó un cubreobjetos. Las láminas se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Olympus, con objetivo 40X.

b) Toxoplasma látex.

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.¹⁵

Toxoplasma látex es una suspensión de partículas de poliestireno recubiertas con antígenos purificados solubles de *Toxoplasma gondii*.

Control Positivo: control listo para su uso, que contiene anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* a una concentración > 4 IU/mL.

Control Negativo: control listo para su uso, que no reactiva con el reactivo de látex.

El título de anticuerpos IgG de los sueros se estimó entre 1:2-1:32.

Las muestras de suero y reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente entre 15 y 30 °C antes de la prueba y la mezcla de reactivos Látex antes de usar. Se mezcló muestra de suero de pacientes en estudio y se extendió sobre toda la superficie de la célula, moviendo suavemente la lámina hacia atrás y adelante lentamente durante 4 minutos. Se observó bajo luz artificial visible aglutinación, e indicó contenido de anticuerpos de *Toxoplasma* superior a 10 IU/mL. Se consideraron como reacciones positivas diluciones superiores a 1/2. Se obtuvo resultados positivos en método cualitativo.

Determinación de la sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y especificidad fueron calculadas para ambas pruebas, siguiendo lo descrito por Regalado y colaboradores.¹⁶ La prueba de referencia se basó en los criterios clínicos a partir de los cuales se agruparon los pacientes estudiados en 2 grupos según el criterio clínico de los neonatólogos y los especialistas del CIBHO. El primer grupo estuvo compuesto por neonatos que presentaban íctero, anemia, *distress* respiratorio y hepastopleromegalia, síntomas que coinciden con los posibles signos y síntomas definidos por Jones con respecto a una Toxoplasmosis congénita¹⁷ y el segundo grupo estuvo conformado por neonatos que presentaban otra sintomatología que no respondía a este tipo de Toxoplasmosis. El resultado de la prueba se considera correcto si: verdadero positivo (VP) y verdadero negativo (VN) o incorrecto si: falso positivo (FP) y falso negativo (FN).

Por tanto, la sensibilidad diagnóstica es la probabilidad de que en un sujeto enfermo obtenga en la prueba un resultado positivo y se determina como la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica, según la fórmula 1.¹⁶

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

Por otro parte, la especificidad diagnóstica es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo y se determina según la fórmula 2.¹⁶

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

RESULTADOS

La toxoplasmosis congénita se produce cuando la mujer se infecta por primera vez con *Toxoplasma gondii* durante el embarazo y el parásito atraviesa la barrera placentaria e infecta al feto.¹⁸ Aproximadamente la tercera parte de las madres que adquieren la toxoplasmosis durante el embarazo transmiten la infección a su hijo, y estos desarrollan en un amplio porcentaje la Toxoplasmosis congénita. En la tabla 1, se observa por una parte como de las 30 muestras de suero estudiadas y testadas por la técnica de IFI 7 resultaron positivas, lo que representó un 23,3 % de positividad y en las testadas por Toxoplasma látex 9 resultaron positivas, representando un 30 % de positividad.

Tabla 1. Porcentaje de positividad de las pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta y Toxoplasma látex

Prueba	Positivas	Negativas	%
Inmunofluorescencia Indirecta	7	23	23.3
Toxoplasma látex	9	21	30

En la [tabla 2](#) se muestran los valores de sensibilidad y especificidad de ambas pruebas.

Tabla 2. Sensibilidad y Especificidad de las pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Toxoplasma látex

Prueba	Sensibilidad	Especificidad
Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	100 %	95.8
Toxoplasma látex	81.8 %	95.5

DISCUSIÓN

La toxoplasmosis adquirida durante el embarazo es responsable de más defectos congénitos que el herpes, la rubéola y la sífilis juntos y es más común e insidiosa de lo que hasta ahora han creído médicos e investigadores. Es generalmente subvalorada en la atención a la embarazada y por ende se descuidan las manifestaciones negativas que genera una Toxoplasmosis congénita para el infante. En esta investigación, el análisis ha sido realizado sin tener en cuenta la presencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en las madres de esta muestra estudiada.

Los resultados mostrados en la tabla 1 sobre el porcentaje de seropositividad de las dos pruebas avalan los resultados obtenidos en la determinación de la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas, ya que del primer grupo conformado resultaron positivos para IFI el 100 % de los cuales presentaban sintomatologías, por el contrario en la prueba de Toxoplasma látex resultaron positivos 2 de los cuales integraban el grupo 2.

De lo anterior se deriva que la sensibilidad de IFI es mayor que la obtenida por la prueba de Toxoplasma látex y coinciden con las investigaciones realizadas por Dubey 1995⁴ y otros autores ^{19,20}, sin embargo ambas técnicas presentan valores similares de especificidad.

La prueba de IFI empleada para el diagnóstico de estas muestras, presenta según investigaciones anteriores una alta sensibilidad (99 %) y especificidad (100 %) ¹¹resultado que se demuestra en este estudio al obtener valores de sensibilidad del 100 % y especificidad de un 95,8 %.

Se demostró además que la técnica de IFI aun presenta resultados de sensibilidad y especificidad comparables con la prueba de oro para diagnosticar presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* como se mencionó en la introducción de la presente. Resulta más útil pues es relativamente fácil de realizar, con costos no tan elevados y además que se contaba con sueros controles y reactivos altamente estandarizados por el laboratorio de referencia de Toxoplasma del Instituto Pedro Kourí.^{11,16}

A pesar que los resultados obtenidos en este estudio demuestran el cumplimiento del objetivo de esta investigación, se desea mencionar que los anticuerpos maternos del tipo IgG son transferidos por la madre al feto, ya que atraviesan la barrera hemato-placentaria. En los recién nacidos no infectados, estos anticuerpos disminuyen progresivamente hasta desaparecer entre los 6 y los 12 meses de vida. En el recién nacido con toxoplasmosis congénita, el título de anticuerpos IgG frente a *Toxoplasma gondii* pueden aumentar progresivamente. En cualquier caso, estos anticuerpos

persisten detectables más allá de los 12 meses de vida, por lo que es conveniente recomendar el seguimiento de esta muestra durante 1 año para demostrar según los protocolos de diagnóstico internacionales si realmente los títulos de anticuerpo IgG encontrados corresponden al niño con la consecuencia de presentar una Toxoplasmosis congénita y desarrollar las manifestaciones clínicas específicas de la misma. No cabe dudas que los resultados obtenidos en esta investigación son un punto vulnerable que debe ser atendido al tener en cuenta que en Cuba la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en gestantes es de un 50 % a un 70 %, ^{21, 22} que en niños cubanos entre 1 y 15 años es de 15 a 35 % y que alrededor del 30 % de la población ha estado en contacto con el parásito. Los resultados obtenidos constituyen condiciones que potencian la importancia de una buena actuación preventiva en las mujeres gestantes, que integra desde las medidas higiénico-sanitarias hasta la explicación breve de las consecuencias negativas para el feto una vez que la madre contrae el parásito. El reconocimiento de estos hechos ha impulsado el desarrollo de programas de prevención y control de dichas infecciones a nivel mundial. Entre las acciones concretas relacionadas con estos programas (campañas de vacunación y educación sanitaria, programas de diagnóstico etiológico de infecciones en el embarazo e infecciones congénitas, confección de registros de casos a nivel nacional, etc.), el control serológico rutinario para presencia de anticuerpos o antígenos específicos de ciertos agentes infecciosos en la embarazada normal ha sido una de las más extendidas, ¹¹ aspectos que son perfectamente aplicables para las recomendaciones de este trabajo y que en Cuba se encuentran algunas de estas acciones definidas en el programa que existe sobre toxoplasmosis pero en ocasiones no se llevan a cabo.

En esta investigación se pudo concluir que los porcentajes de seropositividad de las dos pruebas empleadas avalan los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad. Los valores de sensibilidad de la prueba de IFI resultaron superiores a la prueba de Toxoplasma látex y demostró que la prueba de IFI es más sensible para la determinación de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en esta muestra de estudio. Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba IFI obtenidos en este estudio coinciden con resultados de investigaciones anteriores. Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba Látex Toxoplasma resultaron similares a los mostrados en las instrucciones de uso expuesto por el fabricante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Levine ND. Taxonomy of the Sporozoa. J Parasitol. 1973; 56:208-9.
2. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. Toxoplasma Gondii in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts. Science. 1970; 167:893-6.
3. Atias A. Parasitología clínica. 3ra ed. Santiago de Chile: Publicación Mediterráneo. 1994;81- 282.
4. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structure of Toxoplasma Gondii Taquyzoites, Bradizoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clin Microbiol Review. 1998; 11: 267- 99.
5. Sánchez R, Góngora W, Cobos D, Batista Y, Miranda A. Aspectos básicos sobre la patogenia, respuesta inmune y bioseguridad en el trabajo con el *Toxoplasma gondii*. Correo Científico Médico. 2012; 16(1).

6. Sepúlveda C, Puente J. Células natural killer y el sistema inmune innato en la patología infecciosa. *Rev Méd Chi.* 2000 Dic; 128(12).
7. Chinchilla M, Reyes L, Guerrero O, Castro A. Role of interferon - γ on the immunosuppression during *Toxoplasma gondii* infection by *Trypanosoma lewisi*. *Parasitol Latinoam.* 2005;60:54 – 6.
8. Siachoque H, Satisteban N, Iglesias-Gamarra A. Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Rev Colomb Reumatol.* 2011;18(3).
9. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30:1217-58.
10. Martín I, García S. Toxoplasmosis en el hombre *BIOQUIMIA.* 2003;28(3):19-27.
11. Ovalle F, García A, Thibauth J y Lorca M. Frecuencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Valdivia, Chile *Bol Chil Parasitol.* 2000 Jul;55(3-4).
12. Reis M. Diagnóstico de la Toxoplasmosis Congénita. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2001; 20(2):118-21.
13. Suárez M, González A, Gardón B, Martínez R. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. *Rev Biomed.* 2005;16:21-7.
14. Robert-Gangneux F and Dardéc ML. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25(2): 264–96.
15. Brunelli M. S.p.a. Toxoplasma látex. Instruction for use. [citado 20 abril del 2013]. Disponible en: www.masciabrunelli.it
16. Regalado B, Solangel M, Fraga J, Rojas L, Núñez F, Jerez L. Aplicación de herramientas serológicas y moleculares para el diagnóstico de coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*. *Rev Cubana Med Trop.* 2013; 65(1).
17. Jones J, Lopez A, Wilson M. Congenital toxoplasmosis. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia. *Am Fam Physician.* 2003; 67(10):2131-8.
18. Hoff R, Weiblen BJ. Screening for congenital toxoplasma infection. Transplacental disorders: perinatal detection. Treatment and management. Alan R Liss. 1990; 169-82.
19. Stagno S, Thiermann E. Valor de la inmunofluorescencia Indirecta en el serodiagnóstico de la toxoplasmosis aguda. *Bol Chil Parasitol.* 1970; 26: 9-15.
20. Dubey J, Lappin M, Thulliez P. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. *J. Am. Vet. Assoc.* 1995; 207: 179-85.
21. Blanco R, Malberty A, López R. Estudio de la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en sueros de madres y recién nacidos en el momento del parto. Congreso 50. Aniversario del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. 1988; Resumen T. 319: 137.

22. Echevarría JM, Delgado A, Fuertes A, Guerra L, Gutiérrez C, Prieto J. Serología en la embarazada Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. [citada 23 de marzo 2012]. Disponible en:
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap4.htm>,.

Recibido: 11 de julio de 2014

Aprobado: 13 de agosto de 2014

Dailín Cobos Valdes. Calle 3ra esq. 4ta S/N. Rpto. Peralta. dailin@cibho.hlg.sld.cu