

COMUNICACIÓN CORTA

Concordancia entre las pruebas de ELISA avidéz IgG desarrollados en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud y un ELISA avidéz comercial

Concordance between the IgG avidity ELISA tests developed at the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud and a commercial avidity ELISA

*Acosta ME^I, Guillen Y^I, Aria L^I, Meza T^I, Roig C^I, Carpinelli M^{II}, ^{III}Díaz C

^IDepartamento de Producción Bioquímica del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

^{II}Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

^{III}Centro Materno Infantil de San Lorenzo

RESUMEN

La infección aguda de toxoplasmosis en la mujer durante el embarazo en su mayor parte es asintomática y detectable solo por anticuerpos lo que podría afectar severamente al feto si no es diagnosticada y tratada precozmente. En este estudio observacional analítico de corte transversal se comparó la prueba de ELISA Avidéz IgG para toxoplasmosis desarrollado en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) con un test comercial de avidéz InmunoLISA Organics USA. Para la concordancia se utilizó 41 sueros mantenidos a -20 °C procedentes de la seroteca del Departamento de Producción-Bioquímica seleccionados al azar. La concordancia obtenida fue de 92.7% y un índice de Kappa de 0.820 con IC95% (0.6-1) y $p < 0.0001$. El índice bajo de avidéz sugiere una infección aguda pero para el diagnóstico debería estar acompañado de otras pruebas serológicas y la clínica del paciente. En cambio un índice alto es diagnóstico de una infección crónica.

Palabras claves: *Toxoplasma gondii*, avidéz, diagnóstico.

ABSTRACT

The acute infection caused by *Toxoplasma gondii* in pregnant women is mostly asymptomatic and detectable only by antibodies that could severely affect the fetus if the infection is not diagnosed and treated precociously. In this cross-sectional observational, the analytical the IgG avidity ELISA test for toxoplasmosis, developed at the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), was compared to a commercial avidity kit InmunoLISA (Organics, USA). For the concordance, 41 serum samples kept at -20°C at the Department of Production-Biochemistry of IICS were tested. The concordance obtained was 92.7% and a Kappa index of 0.820 with IC95% (0.6-1) and $p < 0.0001$. The low avidity index suggests an acute infection but for diagnosis this result should be accompanied by other serologic tests and clinical symptoms. Instead, a high avidity index suggests a chronic infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, avidity, diagnosis.

*Autor Correspondiente: **Dra María Eugenia Acosta**. Dpto. de Producción Bioquímica
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Río de la Plata y Lagerenza. Asunción-Paraguay
Email: produccion@iics.una.py. Fecha de recepción: Marzo de 2010, Fecha de aceptación: Octubre de 2010

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria causada por un parásito unicelular e intracelular obligado: *Toxoplasma gondii*. El huésped natural y definitivo es el gato (felinos) (1). La forma de transmisión se da por la ingestión de ooquistes, transmisión congénita, trasplante de órganos, accidentes laboratoriales y transfusión de sangre entera y leucocitos (2-4).

El diagnóstico de la toxoplasmosis se ha orientado hacia la búsqueda de nuevas técnicas para la detección de infecciones recientes que por lo general son clínicamente asintomáticas (5), en especial para el diagnóstico en las embarazadas debido al alto riesgo de transmisión al feto si la primera infección ocurre durante los meses de gestación.

Las pruebas que buscan anticuerpos IgM, IgG, IgA, IgE se realizan por ensayos como inmunofluorescencia indirecta (IFI), prueba inmunoenzimática (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ELISA de avididad IgG (6,7).

En un estudio realizado en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) en 1997 para la detección del índice de avididad de IgG en un grupo de mujeres embarazadas con infección aguda y crónica, se encontró un índice de avididad bajo con una media de 1.09±0.33 en las primeras y en las pacientes crónicas un índice de avididad alto de 1.91±0.18, detectándose una diferencia significativa entre ambas poblaciones ($p < 0.05$) (8).

La prueba de ELISA de avididad IgG consiste en un ensayo inmunoenzimático en el cual un agente desestabilizante de puentes de hidrógeno, como la urea y el tiocianato, es empleado para disociar la unión entre las IgG específicas y el antígeno, de tal forma que en infecciones recientes las IgG de baja avididad son casi totalmente disociadas del complejo antígeno-anticuerpo, mientras que infecciones crónicas de alta avididad permanecen mayormente unidas a los antígenos del *T. gondii*.

La técnica desarrollada por Pullén (9) es la que implementamos en el laboratorio para la detección del índice de avididad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: Se llevó a cabo un estudio observacional analítico de corte transversal.

Población: Para la concordancia con el test comercial: 41 sueros mantenidos a -20 °C procedentes de la seroteca del Departamento de Producción-Bioquímica del IICS, fueron codificados y seleccionados al azar, 19 de ellos fueron IgG e IgM positivos por distintos métodos serológicos, 15 sueros IgG positivos e IgM negativos por el método serológico de quimioluminiscencia y 7 sueros de pacientes con clínica y serología de toxoplasmosis aguda, todos fueron procesados por el test de Avididad IgG para toxoplasmosis desarrollados en el IICS y el comercial InmunoLISA avidity IgG Organics USA.

Determinación de las inmunoglobulinas IgG e IgM para *Toxoplasma gondii*

Fueron testados por los métodos serológicos comerciales: ELISA Indirecto (InmunoLISA, Organics-USA) quimioluminiscencia (Inmulite toxoplasma cuantitativa IgG), IFI (Toxo-Spot IF Biomeriux).

Avididad IgG para toxoplasmosis desarrollado en el IICS

Las microplacas fueron sensibilizadas con un antígeno comercial de *T. gondii*, el procedimiento consistió primeramente en utilizar el ELISA indirecto realizando varias diluciones del suero desde 1/50 hasta 1/6400 a fin de obtener la dilución óptica ideal cercana a 1 (0.8 a 1.1) los tiempos de incubación fueron los mismos que el ELISA de avididad. Posteriormente se realizó un segundo ELISA con la dilución óptica determinada, se incubó durante 2 horas a 37 °C, sin lavado previo se le agregó tiocianato de potasio (KSCN) en diferentes concentraciones (0,5, 1, 2, 2,5 y 3 molar) dejando los dos primeros pocillos con solución de lavado los cuales sirvieron de control, esto se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se realizaron los tres lavados.

Se adicionó 100 ul el anti IgG humano conjugado con peroxidasa, se incubó durante 2h a 37°C, se volvió a lavar tres veces, se agregó el cromógeno (ABTS) y se leyó a la densidad óptica de 405 nm con un lector de microplacas Bio-Rad.

Índice de avidéz: Es calculado como porcentaje de elusión (% del elusión) para cada concentración de tiocianato que es definido como el cociente Absorbancia (A)450 de la concentración sin tiocianato/A450 de la concentración con KSCN. El índice de avidéz (AI) fue definido como la concentración molar de KSCN que eliminó el 50% del anticuerpo sin tratamiento. Este valor fue colocado para cada muestra del suero de la regresión lineal Ln (% de elusión) contra la concentración molar de KSCN.

Los valores utilizados como referencia fueron:

Menor o igual a 0.5 agudos o infección reciente

entre 0.6 y 1.4 probables agudos

Mayor o igual 1.5 crónicos o infección pasada

Avidéz IgG para toxoplasmosis InmunoLISA ORGENICS

Se determinó el índice de avidéz de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las microplacas fueron sensibilizadas con antígeno de *T. gondii*, en la primera incubación hay una reacción con el anticuerpo del suero del paciente IgG anti toxoplasmosis. Después del lavado de todos los componentes, en la segunda incubación a unión antígeno anticuerpo fueron tratados con solución fisiológica (referencias) y agente desnaturizante capaz de disociar a las uniones de anticuerpos de baja avidéz con el antígeno. Después del lavado en la tercera incubación se agregó el conjugado IgG anticuerpo antihumano conjugado anti peroxidasa. La enzima de captura sobre la fase sólida actúa sobre la mezcla sustrato/cromógeno, generando una señal que es proporcional al aumento de los anticuerpos anti *T.gondii* IgG presentes en la muestra. Las microplacas se leyeron a 450 nm y 620 el blanco.

Se calculó el índice de Avidéz (AI) entre DO450 nm con solución fisiológica(A) y DO 450 con desnaturizante (B) usando la siguiente formula AI: B/A

Valores

Menor 0.3 agudos o infección reciente

Mayor 0.3 crónicos o infección pasada

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los resultados fue hecho empleando el software Epiinfo versión 2002 para la evaluación de la significancia entre los test serológicos se utilizó el test no paramétrico de Chi cuadrado, y Epidata 2.2 para la concordancia con una P <0.05.

Asuntos éticos

Los sueros utilizados en este estudio pertenecen a la seroteca del Dpto. de Producción Bioquímica del IICS los cuales fueron codificados, respetando la confidencialidad de los mismos. Estos pacientes no tendrán beneficio directo, pero darán un aporte importante para la estandarización del test, el cual será utilizado como método diagnóstico a favor de la comunidad.

RESULTADOS

En base a los resultados obtenidos de los 41 sueros representados en la tabla 1 se calculó la concordancia entre el test de avidéz IgG comercial InmunoLISA Organics y avidéz IgG desarrollado en el IICS para toxoplasmosis, donde se obtuvo un 92.7% de concordancia con un índice de Kappa de 0.820 a un IC95% (0.626-1) y p<0.0001.

Tabla 1. Concordancia entre el test de avidéz IgG comercial InmunoLISA Organics y avidéz IgG desarrollado en el IICS para toxoplasmosis

| Avidéz IICS | Avidéz comercial N= 41pacientes | | |
|-------------|------------------------------------|----------|----|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 10 | 3 | 13 |
| Negativo | 0 | 28 | 28 |
| | 10 | 31 | 41 |

Las muestras de pacientes con serología positiva de los distintos métodos serológicos (ELISA indirecta, quimioluminiscencia e IFI) fueron utilizadas para comparar con los índices de avidéz del test desarrollado en el IICS. Los 24 sueros con serología negativa para IgM por los diversos métodos mostraron un índice de avidéz mayor a 1.5 M que nos indica una infección crónica. De las 19 muestras con serología IgM positiva 10 de ellas dieron valores de índice de avidéz entre 0.5 a 1 M lo que nos sugieren una probable infección aguda y 9 de estas dieron valores de índice de avidéz mayores a 1.5 M que corresponde a una infección crónica.

Se ha encontrado en este estudio preliminar una muy buena concordancia entre el test de avidéz de IgG anti *T. gondii* comercial y el desarrollado en el IICS, dado que el valor estimado del índice Kappa para estos datos fue de 0.820, utilizando la escala de Landis y Koch (10).

DISCUSION

Las diferencias encontradas entre los tests serológicos y el test de avidéz fueron estadísticamente no significativas como las encontradas en otras bibliografías (11). Se pudo corroborar que los sueros de los pacientes con serología y clínica positiva presentaron un bajo índice de avidéz de IgG menor a 0.5M lo cual confirma el diagnóstico de infección aguda. En los sueros con serología positiva IgM sin diagnóstico clínico se observó una variación en los índices de avidéz desde 0.5 a 1.5M, en cambio la mayoría de los sueros con serología negativa para IgM mostraron un índice mayor a 1.5M. Estos resultados se han observado también en otras publicaciones en la que una serología positiva para IgM sin el acompañamiento clínico no significa necesariamente una infección aguda ya que el índice de avidéz con un valor bajo al igual que la IgM pueden persistir dentro de los 12 meses de la post infección(8). Algunas de las posibles causas de la discrepancia entre los métodos serológicos que determinan las inmunoglobulinas del tipo IgM y el test de avidéz IgG desarrollado en el IICS podrían deberse a la preparación del antígeno, al método utilizado y al valor del cut off (11,12).

El empleo de la prueba de avidéz IgG anti *T.gondii* desarrollado en el IICS mostró una muy buena concordancia de 0.82 con el test de avidéz IgG InmunoLISA Organics USA. Este test detecta índice de avidéz bajo en una infección aguda el cual podría ser utilizado como diagnóstico siempre que esté acompañado de otras pruebas serológicas para IgG e IgM y de la clínica del paciente; en cambio un índice de avidéz alto nos confirma una infección crónica. La disponibilidad de una prueba complementaria para el diagnóstico de una infección aguda de toxoplasmosis será un servicio útil para la mujer embarazada.

AGRADECIMIENTO

Este estudio ha sido posible gracias al apoyo económico de la Japan International Cooperation Agency (JICA).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Atias A, Thiermann E. Toxoplasmosis, Parasitología clínica. 3ra ed. Santiago-Chile: Ed Mediterráneo; 1991.
2. Kenneth JR, Ray GC, editores. Sherris Medical Microbiology. An introduction to infectious diseases 4th ed. España: McGraw Hill; 2004.
3. Heneyman D, Mc Karrow JH. Parasitic Disease. In: Styles DP, Stolvo JD, Wells JV. Basic and Clinical Immunology. 6th ed. Los Altos, California: Appleton, Leurge, Nowwalk, Connecticut; 1987.
4. Contreras M del C, Schenone H, Salinas P, Sandoval L, Rojas A, Villarroel F, et al. Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. *Rev Inst Med trop* 1996; 38: 431-5.
5. Maekelt A, Mauriello L, Diaz MP, Diaz Z. Evaluación de la Prueba de Elisa-Avidez-IgG como inmunodiagnóstico serológico de la infección Toxoplásmica reciente. *Caracas: Rev Obstet Ginecol Venez* 2000;23:2.
6. Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguiti CK, Naka-hara OS. Immunoglobulin G and Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun* 1978; 21: 55-8.
7. Contreras M del C, Sandoval L, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y Elisa avides de IgG toxoplasmosis reciente y crónica. *Bol chil parasitol* 2000;55:1-2.
8. Velázquez G, Guillén I, Picaguá E, Nieto A. Utilización de la Avides de IgG anti *Toxoplasma gondii* como marcador de una infección aguda. *Annual reports* 1997:77-81.
9. Velázquez G, Guillén I, Pozzoli L, Russomando G, Monzón M, Vera N, et al. Serological study of toxoplasmosis in pregnant women from the maternity of the hospital of clinics. *Annual Reports* 1992; 55: 39-51.
10. Ruiz A, Morillo L. Epidemiología clínica, investigación clínica aplicada. Bogotá: Ed Médica Panamericana SA. 2004.
11. Tanyukesel M, Guney C, Araz E, Saracli MA, Doganci L. Performance of the Immunoglobulin G Avidity and Enzyme Immunoassay IgG/IgM Screening Tests for Differentiation of the Clinical Spectrum of Toxoplasmosis. *Journal of Microbiology* 2004; 42:3.
12. Araujo FG, Barnett EV, Gentry LO, Remington JS. False-positive anti-toxoplasma Fluorescent antibody Test in patients with antinuclear antibodies. *Applied Microbiology* 1971; 22: 270-5.