

# Adaptación y evaluación de un ensayo inmunoenzimático para detección de toxoplasmosis neonatal

Díaz M<sup>1</sup> y Lange K<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

---

## Resumen

**La toxoplasmosis es una zoonosis frecuente, que pocas veces produce síntomas, puede transmitirse congénitamente por infección aguda materna en el curso del embarazo. Para evaluar la frecuencia de la toxoplasmosis congénita, la adaptación de ensayos serológicos puede constituir una herramienta importante. En este estudio se establecieron los parámetros técnicos para adaptar un método serico inmunoenzimático (ELISA) comercial a la detección de anticuerpos IgM anti- *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre completa recolectada en papel filtro con características similares a la sangre neonatal (hematocrito de 55%), técnica estándar utilizada en los programas de tamizaje neonatal. Se utilizó la metodología ensayo y error para obtener las condiciones óptimas para la adaptación del método, en la cual se realizaron 5 repeticiones de cada variable (tiempo de incubación, diámetro papel filtro y diluyentes de elución). Se estableció como mejor combinación; diluyente de elución del kit, diámetro de 6 mm de la muestra de papel filtro y 24 horas de elución. En el caso de las muestras positivas el valor p fue de 0.0107 y para las muestras negativas el valor p fue de 0.0010.**

---

## 1. Introducción

La toxoplasmosis es una zoonosis frecuente, que pocas veces produce síntomas. Cuando una gestante sufre una infección aguda por *Toxoplasma gondii* puede trasmitirla al feto. Si el feto se afecta, la enfermedad puede ser tan grave que ocasione la muerte o graves alteraciones como la ceguera en la vida postnatal (Botero, D y Restrepo, M, 2006).

La presencia de anticuerpos IgM antitoxoplásmicos en el recién nacido es el signo más específico de la infección congénita porque el mismo neonato produce estos anticuerpos (ya que los anticuerpos maternos no cruzan la barrera placentaria), por lo cual los programas de tamizaje neonatal juegan un papel fundamental en la detección temprana de la infección (Botero & Restrepo 2006, p. 506; Dubey,

2000 p.127; Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories, 2005).

Para poder adaptar un método sérico inmunoenzimático (ELISA) a uno que utilice como matriz sangre entera recolectada en papel filtro, es necesaria la evaluación previa de esta adaptación, para comprobar si ésta es capaz de obtener resultados confiables y reproducibles. Por lo cual en este estudio, se establecieron los parámetros técnicos para adaptar un método (ELISA) comercial a la detección de anticuerpos IgM anti *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro, técnica estándar utilizada en los programas de tamizaje neonatal (Food and Drug Administration, 2001; Thompson & Ellison 2002).

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Preparación de muestras y controles**

Se prepararon muestras de sangre en el laboratorio, que tuvieran las características de muestras neonatales (55% de hematocrito) agregándole suero positivo para anticuerpos IgM anti-*T. gondii*. Para la preparación de los controles, primero se lavaron 20 mL de sangre O Rh+ con 20 mL de solución salina centrifugándolos por 5 minutos a 5000 revoluciones, descartando el sobrenadante, se repitió el procedimiento hasta alcanzar un hematocrito de  $\geq 90\%$  y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para preparar los controles internos de sangre completa en papel filtro, se calculó y se mezcló el volumen necesario de suero (positivo para anticuerpos IgM anti-*T. gondii* en el caso de calibrador positivo y suero negativos para calibradores negativos) a los eritrocitos lavados para llegar a un hematocrito de 55%, posteriormente se colocaron 50 µl de cada control sobre papel filtro Schleicher & Schuell 903 ®(S&S 903®) y se secó a temperatura ambiente por 24 horas en oscuridad, posteriormente se perforaron discos de 3mm y de 6mm para el diámetro de los calibradores (Camargo Neto, Rubin, Schulte, & Giugliani, 2004).

### **2.2 Evaluación de variables**

Se evaluó un método ELISA sérico comercial (Calbiotech Inc<sup>®</sup> Toxo IgM) para el tamizaje neonatal de la infección por *T. gondii* utilizando los calibradores elaborados en laboratorio, de cada calibrador se analizaron las variables diámetros de muestra (3 y 6 mm, que equivale a 125 µl y 250 µl de muestra respectivamente), tiempos de elución (18 y 24 horas) y diluyentes de elución (amortiguador fosfato salino con Tween 20 10mM, amortiguador fosfato salino + seroalbúmina bovina 1% y el diluyente

incluido en el kit). Utilizando la metodología de ensayo y error, se realizaron 5 repeticiones de cada posible combinación de variables (tiempo de incubación, diámetro papel filtro, amortiguadores de elución). Se evaluó por medio de la prueba de hipótesis binomial la mejor combinación realizando 10 repeticiones para determinar si los resultados de la adaptación son estadísticamente significativos. Por último y como parte de una evaluación externa, el método adaptado se evaluó con muestras provenientes del programa de control de calidad externo para tamizaje neonatal de toxoplasmosis congénita de los Centros de Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), las cuales fueron evaluadas como muestras desconocidas.

### **3. Resultados**

En el presente estudio se establecieron parámetros técnicos para adaptar un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgM anti-*T. gondii* séricos a muestras de sangre completa recolectada en papel filtro para aplicar tamizaje neonatal.

En la tabla 1 se muestra la evaluación de los diámetros de muestra, tiempos de elución y diluyentes de elución (amortiguador fosfato salino con Tween 20 10mM, amortiguador fosfato salino + seroalbúmina bovina 1% y el diluyente incluido en el kit). Al combinar el diluyente del kit con 6 mm de diámetro y 24 horas de tiempo de elución mostraron resultados con el 100% de acierto con respecto a las muestras del control positivo y control.

Se observó que dos combinaciones; diluyente del kit, diámetro de 6 mm de muestra de papel filtro y los tiempos de incubación de 18 y 24 horas, presentaron los mejores resultados, para ambos casos el número de aciertos fue del 100% ( $p=0.001$ ), tanto para los casos de los controles positivos y negativos. Para poder establecer que tiempo de incubación presenta los valores más cercanos al valor sérico de referencia; se compararon los valores de las muestras séricas en papel filtro.

Para evaluar el tiempo de elución que presentara un valor más cercano al valor de referencia sérico, se determinó su relación entre los controles positivos y negativos, en el cual se obtuvo mejores índices al eluir por 24 horas.

**Tabla 1. Resultados comparativos de las distintas combinaciones según números de aciertos para la adaptación del método con muestras de papel filtro**

Diámetro	Eluyente	Resultados adaptación 18 horas		Resultados adaptación 24 horas	
		Positivo <sub>n=5</sub>	Negativo <sub>n=5</sub>	Positivo <sub>n=5</sub>	Negativo <sub>n=5</sub>
3 mm	AFS	0	10	0	10
	SAB	0	10	0	10
	Kit	2	8	3	7
6 mm	AFS	0	10	0	10
	SAB	2	8	0	10
	Kit	5	5	5	5

Fuente: Datos experimentales obtenidos en laboratorio  
 AFS: amortiguador fosfato salino 10 mM pH 7.2 + Tween 20, SAB: seroalbúmina bovina 1%, Kit: Diluyente del kit.

**Tabla 2. Relación de índice de anticuerpos con respecto al tiempo de elución y valor de referencia con muestras positivas para anticuerpos anti-*T. gondii***

Numero de repetición	Índice de anticuerpos		Valor de referencia
	18 horas	24 horas	
1	2.28	3.02	3.27
2	2.21	2.96	3.13
3	3.08	1.76	1.46
4	3.53	2.01	1.76
5	6.32	3.60	3.26

Fuente: Datos experimentales obtenidos en laboratorio

En base a estos resultados obtenidos se aplicó la prueba de hipótesis binomial, en la tabla 3 se puede observar los resultados en los cual se parte con 10 muestras de papel filtro positivas y 10 muestras de papel filtro negativas, para la evaluación en condiciones ideales establecidas; encontrándose que, la técnica en evaluación obtuvo 9 verdaderos positivos y 1 falso negativo, así como 10 verdaderos negativos y ningún falso positivo. En base a esto se determinó la concordancia del método a adaptar por medio del índice *kappa*, obteniéndose un valor de 0.9 que indica una relación óptima.

Para evidenciar si el método es estadísticamente significativo se evaluó el valor p de cada control. En el caso de las muestras positivas el valor p fue de 0.0107 y para las muestras negativas el valor p fue de 0.0010, para ambos caso el valor p fue menor de 0.05 lo cual establece que en ambos valores son estadísticamente significativos (Gordis, 2003).

**Tabla 3. Índice kappa y valor P de la adaptación comparándola con los valores de referencia de anticuerpos con respecto al tiempo de elución y valor de referencia**

Valores adaptación	Séricos			Valor p	kappa
	Positivos	Negativos	Total		
Positivos	9	1	10	0.0107	0.9
Negativos	0	10	10	0.0010	
Total	11	9	20		

Concordancia (Índice kappa): 0.9 = optimo  
 Fuerza de concordancia: <20: pobre; 0.21-40: Debil; 0.41-0.60: Moderada; 0.61-0.80: Buena; 0.81-1.00: Optima

Posteriormente para determinar el punto de corte de la adaptación del método se utilizó el promedio del valor de 10 repeticiones de muestras negativas +/- 2 desviaciones estándar. Siendo el promedio de 0.738, el límite superior de 0.963 y el límite inferior de 0.698

Por último y como parte de una evaluación externa, el método adaptado se evaluó con muestras provenientes del programa de control de calidad externo para tamizaje neonatal de toxoplasmosis congénita de los CDC, las cuales fueron evaluadas como muestras desconocidas. Las 10 muestras, 3 de ellas con un resultado positivo para anticuerpos IgM contra *T.gondi* y 7 con resultado negativo, dieron el mismo resultado cualitativo al momento de la evaluar la adaptación del método.

#### 4. Discusión

Los programas de tamiz neonatal detectan la existencia de una enfermedad o deficiencia congénita antes de que ésta se manifieste, para instalar o iniciar el tratamiento adecuado que evite o disminuya sus consecuencias. Es importante resaltar que el tamizaje no es un procedimiento diagnóstico, ya que los sujetos deben someterse a una prueba diagnóstica confirmatoria (Barba, E, 2004).

La utilización de las distintas soluciones como eluyentes, permitieron la extracción de los anticuerpos anti- *T. gondii* IgM. El amortiguador fosfato salino y la seroalbúmina no presentaron buena respuesta de extracción de anticuerpos, en ninguno de los dos casos de diámetro de papel filtro ni en los dos distintos tiempos de incubación. En ambos casos, todos los calibradores positivos dieron un índice de anticuerpos debajo del punto de corte, en comparación con los valores obtenidos en suero (Parker, P., & Cubbit, W. 1999).

El bajo índice de anticuerpos obtenidos en muestras eluidas con el amortiguador fosfato salino y la seroalbúmina bovina pudo deberse a que si bien estos agentes de elución actúan como bloqueadores de proteínas, no son específicos para permitir el paso de las inmunoglobulinas IgM sobre otras proteínas encontradas en la muestra de sangre seca en papel filtro (Parker, P., & Cubbit, W. 1999). Un agente amortiguador que en este caso también actuaba como bloqueador debía unirse a todos los sitios posibles de interacción no específica, sin embargo los resultados obtenidos demostraron que debido a su poca especificidad no fue posible la extracción adecuada de los anticuerpos para obtener un índice que diera respuesta adecuada en los calibradores positivos (Gibbs, J. 2007 p.3-6).

El tercer eluyente utilizado, el diluyente suministrado en el kit, obtuvo los mejores resultados, tanto cualitativamente (todos los calibradores tuvieron concordancia con los valores obtenidos en suero) como cuantitativamente (los valores de índice de anticuerpos fueron muy similares al compararse con los obtenidos en suero). La capacidad del diluyente del kit demuestra que no solo es capaz de ser selectivo para las inmunoglobulinas IgM en suero, sino que también en muestra de sangre en papel filtro, con la variación de un tiempo de incubación de 24 horas (Małgorzata, P., Petersen, E. & Szczapa, J. 2001; Rodríguez, L., Ribas Antúnez, M., Roque Quintero, A., Aragón Rodríguez, U., Martínez, R., & Díaz Mendiando, B. 1998).

La elección adecuada de un agente bloqueador para este tipo de muestras depende de su capacidad de poder bloquear otro tipo de proteínas que actúan como interferentes y dejar pasar a los anticuerpo

como por ejemplo, en aplicaciones en las que se utiliza la fosfatasa alcalina como conjugado (Gibbs, J. 2007 p.3-6).

Los tiempos de incubación evaluados (18 y 24 horas) demostraron que el diluyente del kit presentó una mayor similitud de resultados en papel filtro con los valores en suero, en ambos casos las muestras positivas séricas dieron también un resultado positivo en la adaptación del método, sin embargo con incubación de 24 horas los resultados fueron más cercanos a los valores séricos por lo cual se pueden obtener mejores índices de concordancia (Małgorzata, P., Petersen, E. & Szczapa, J. 2001).

Al momento de la evaluación del método con la mejor condición, es importante mencionar que si bien, de las 10 muestras positivas evaluadas, 9 dieron un resultado positivo, este único fracaso para poder detectar la cantidad de anticuerpos se atribuye a un error técnico, ya que ni en la evaluación de condiciones, ni en la posterior evaluación con controles externos de los CDC, mostró nuevamente un error de lectura.

Si bien todas las muestras y variables de este estudio fueron condicionadas en laboratorio, se evaluó posteriormente muestras externas provenientes del programa de control de calidad para tamizaje neonatal de toxoplasmosis de los CDC con dicha adaptación, esto para reafirmar los resultados obtenidos en la evaluación. Las muestras del CDC dieron los resultados esperados, esto se realizó con la mejor combinación de variables (24 horas de incubación, 6 mm de muestra y diluyente del kit), lo cual demuestra que la adaptación presenta resultados satisfactorios para la detección de anticuerpos IgM anti- *T. gondii*.

Al ser una adaptación para tamizaje neonatal, es importante determinar valores de punto de corte, si bien no son iguales a los suministrados por el kit, el rango obtenido en la adaptación evita que al momento de evaluar muestras, pudieran haber falsos positivos, ya que el rango determinado (0.698-0.738) es menor que el suministrado por el kit (0.9). Es de importancia resaltar que al momento de aplicar esta metodología en un estudio piloto, estos deben de adaptar el punto de corte, ya que esto permite una mejor distribución de datos negativos y así poder obtener un rango más preciso de corte (Rodríguez, *et al.* 1998).

Para la utilización de esta metodología en programa de tamizaje, es de importancia hacer un estudio piloto previo, en un área con alta prevalencia de toxoplasmosis neonatal, así como acondicionarla a

otro tipo de enfermedades subclínicas, para poder brindar un panel más extenso de diagnóstico para confirmar los casos serológicos en neonatos.

## 5. Referencias

- Barba, E. (2004) Tamiz neonatal: Una estrategia en la medicina preventiva. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51, 130-144.
- Botero, D., Restrepo, M. (2006). *Parasitosis humanas*. Colombia: Editorial Corporación para Investigación Biológicas. 506.
- Camargo Neto, E., Rubin, R., Schulte, J., & Giugliani, R. (2004). Newborn Screening for Congenital Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (6), 1070-1073.
- Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories (2005). *Newborn Screening Quality Assurance Program*, 22 (2), 5-10.
- Dubey, J. (2000). Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *British Medical Journal*, 321 (8) 127-128.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for industry bioanalytical, Methods, validation for human studies*. US Department of health and human services. Washington.
- Gibbs, J. (2007). *Effective Blocking Procedures*, Florida, Corning, 3, 3-6.
- Guzmán, M. & Bravo, J. (1982) Normalización de la toma de muestra de sangre en papel filtro para la serología del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 17, 114-118.
- Gordis, L. (2003) *Epidemiología*. 3ra ed. España: Editorial Elsevier, 543.
- Małgorzata, P., Petersen, E. & Szczapa, J. (2001) Prevalence of Congenital *Toxoplasma gondii* Infection among Newborns from the Poznan' Region of Poland: Validation of a New Combined

Enzyme Immunoassay for *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin A and Immunoglobulin M Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1912-1916.

Parker, P. & Cubbit, W. (1999). The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *Journal Clinical Pathology*, 52 (9), 633-639.

Rodríguez, L., Ribas Antúnez, M., Roque Quintero, A., Aragón Rodríguez, U., Martínez, R., & Díaz Mendiondo, B. (1998). Toma de muestra en papel filtro para la detección de anticuerpos IgM antiviral de la hepatitis A. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 50 (1), 42-47.

Thompson, M. & Ellison S. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 835-855.

---

Licda. Karla Lange  
Asesora

---

Manuel Díaz  
Tesisista