

UTILIDAD DE LAS MUESTRAS DE SANGRE TOTAL DESECADA EN PAPEL DE FILTRO EN LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTITOXOPLASMA

Joaquim GASCON (1), Josep M. TORRES-RODRIGUEZ (2) & Carmen GONZALEZ (2)

RESUMEN

Se compara la técnica de Aglutinación Directa (AD) utilizando muestras de sangre total desecada en papel de filtro, con la técnica de ELISA y la misma AD utilizando muestras de suero de los mismos pacientes, para la detección de anticuerpos antitoxoplasma.

Los resultados muestran la validez del método de la sangre desecada en papel de filtro para la detección de anticuerpos antitoxoplasma con la técnica de AD, y se considera su utilidad en los estudios epidemiológicos de campo.

UNITERMOS: Toxoplasmosis; Reacción de Aglutinación directa; Sangre total en papel de filtro.

INTRODUCCION

El estudio de la prevalencia de los anticuerpos antitoxoplasma en muestras representativas de una población constituye un requisito indispensable para reconocer la extensión de la toxoplasmosis en la comunidad.

Diversos autores han demostrado la utilidad del método de la sangre desecada en papel de filtro para la detección de anticuerpos en enfermedades como el paludismo², la hepatitis¹⁰, o la tripanosomiasis⁸ y han evidenciado las ventajas de este método que no requiere personal especializado ni utillaje sofisticado y facilita además los envíos de las muestras hasta los centros de procesamiento de las mismas.

En nuestro estudio hemos ensayado esta técnica, aplicada a la detección de anticuerpos

antitoxoplasma mediante la reacción de Aglutinación Directa (AD). Esta técnica ha sido utilizada por otros autores^{4, 5} demostrando que tiene una alta sensibilidad y especificidad. Se ha comparado con los resultados obtenidos con sueros de los mismos pacientes con la técnica de AD⁵ y la ELISA¹ técnica ésta última que se ha tomado como patrón de referencia.

MATERIAL Y METODOS

Se han estudiado muestras de suero y sangre total desecada en papel de filtro de 32 personas, escogidas al azar, provenientes del dispensario del Hospital del Mar (Barcelona), a los que se había pedido la detección de anticuerpos antitoxoplasma ante la sospecha de enfermedad o simplemente como "screening" en embarazadas.

(1) Hópital Nembá, Rwanda.

(2) Servei Microbiologia Clínica, Hospital del Mar, Barcelona, España.

Dirección para la correspondencia: Dr. Josep M. Torres-Rodríguez. Servei Microbiologia Clínica — Hospital del Mar. Passeig Marítim, 25-27. 08003 Barcelona, España.

Las muestras se obtuvieron por punción venosa. De cada paciente se separaron tres gotas de sangre que se depositaron en papel de filtro. Cada gota de sangre ocupaba un área de 15mm. de diámetro. Los papeles de filtro se dejaron secar a la temperatura ambiente y luego guardados a 4 C hasta el momento de su utilización. El resto de la sangre se centrifugó para la obtención de suero que se guardó a -20 C hasta el momento de ser procesadas.

Para la elución de los papeles de filtro se empleó 0,5 ml de tampón fosfato (PBS) durante 24 horas a 4 C.

Para la técnica de AD se utilizaron los kits de Toxo-screen DA (Biomérieux, Lyon⁴). De cada muestra se emplearon dos diluciones en PBS, a 1/20 y 1/80, que después del proceso seguido con la técnica se encontraron a diluciones de 1/40 y 1/160 respectivamente. El título de 1/40 es el valor discriminativo entre una reacción positiva y una de negativa.

La lectura se hace a las cinco horas después de la dilución de la sangre o suero problema tratados con el 2-mercaptoetanol (2-ME) y la suspensión de antígeno, dejando reposar los pocillos a la temperatura ambiente, al resguardo de la desecación y las vibraciones.

La lectura, que es macroscópica, puede repetirse a las 18 horas siendo ésta muy fácil: reacción positiva cuando la aglutinación de los toxoplasmas en forma de velo tapiza como mínimo la mitad del fondo del pocillo, pudiendo estar retraído en los bordes; reacción negativa cuando los toxoplasmas sedimentan en botón o anillo.

Como técnica de referencia se empleó un enzima inmuno-ensayo en fase sólida, determinando IgG contra *Toxoplasma gondii* (Labsystems, Helsinki¹). Conforme con los fabricantes, un valor de 10 UI (equivalentes a 1.0 de densidad óptica) o superior se consideran positivos.

RESULTADOS

Mediante el test de ELISA, 17 de los sueros dieron resultado positivo y 15 negativo.

Con la técnica de AD, los resultados fueron 16 positivos y 16 negativos tanto en las muestras

de sangre total desecada en papel de filtro como en las muestras de suero. Excepto en una paciente que dió positivo en el test de ELISA (valor de 21 UI) y negativo en los tests de AD, la concordancia de resultados fue total en el resto de las muestras.

Se observaron dos fenómenos de prozona en dos muestras en las que se utilizó suero con la técnica de AD (negativo a 1/40 y positivo a 1/160). En ambos casos los resultados fueron positivos con las muestras de sangre total desecada, sin que se observara el fenómeno de prozona.

Tomando como técnica de referencia el test de ELISA, la sensibilidad del método fue del 94% y la especificidad del 100%. Al observar los resultados con la técnica de ELISA entre los sueros positivos, se encontraron diferentes grados de reactividad (tabla 1). Al comparar las tres técnicas entre si, los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 = 0.08$).

TABLA 1
Reactividad de las muestras en el test de ELISA.

| | UI | | | | | |
|----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | < 10 | 10 15 | 16 20 | 21 25 | 26 30 | 31 35 |
| n sueros | 15 | 2 | 5 | 2 | 6 | 2 |

UI: Unidades Internacionales.

DISCUSION

La técnica de AD, fue descrita por **FULTON & TURK**⁶ y ampliada por los trabajos de **COUZINEAU & BAUFINE-DUCROQ**⁴ y **DESMONTS**⁵, que incluyeron en ella el 2-ME y un antígeno de mayor calidad que mejoraban tanto la sensibilidad como la especificidad.

En nuestro estudio no hubo diferencias entre los resultados de las muestras de sangre y plasma procesados por AD, y tomando como técnica de referencia el test de ELISA, la especificidad y la sensibilidad fueron similares a las de ésta última.

La técnica de AD ha sido ya evaluada como técnica de "screening" en estudios epidemiológicos^{4, 5} aunque siempre se habían utilizado sue-

ros. Otros autores han valorado la utilidad de la sangre total desecada en papel de filtro con técnicas distintas de la AD^{3, 9}. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la técnica de desecación de sangre total en papel de filtro es útil para la obtención de muestras válidas para su procesamiento con la técnica de AD.

La posibilidad de obtener la sangre a través de una simple punción digital² facilita aún más la obtención de muestras en estudios epidemiológicos de masas.

Otra ventaja para detectar anticuerpos IgG, es que en la sangre desecada, se ha descrito la desnaturalización de las IgM⁷ lo que favorecería la acción del 2-ME de la AD, en el aumento de especificidad de la prueba.

Los fenómenos de prozona han sido descritos con esta técnica⁵. En estudios epidemiológicos este fenómeno pierde su importancia, aunque si se quiere una buena precisión, pueden procesarse dos diluciones de una misma muestra.

En conclusión, la técnica de la gota de sangre desecada en papel de filtro y procesada mediante la técnica de AD, que es de una gran sencillez y fácil lectura, puede ser de gran utilidad para los estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de la toxoplasmosis, así como en estudios en pequeños animales.

SUMMARY

Usefulness of dry blood samples on filter paper in the detection of antitoxoplasma antibodies.

Direct Agglutination (DA) techniques, both, using dry blood samples in filter paper and serum samples, were compared with the ELISA test in order to detect antibodies against *Toxoplasma gondii*.

The results show the validity of the dry blood samples in filter paper for detecting antitoxoplasma antibodies with a DA test. Our results would confirm their usefulness in field epidemiological surveys.

REFERENCIAS

1. BALFOUR, A. H. & HARFORD, J. P. — Detection of specific IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* with a commercially available enzyme immunoassay kit system. *J. clin. Path.*, 38: 679-689, 1985.
2. BRUCE CHWATT, L. J. — Diagnostic methods in malaria. In: BRUCE CHWATT, L. J. — *Essential malariology*, 2nd ed. London, Heinemann, 1985, p. 101-126.
3. COUTINHO, S. G. — Aplicação da técnica de coleta de sangue total em disco de papel para o diagnóstico da toxoplasmosis pelas reações de imunofluorescência indireta e Sabin-Feldman. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 4(supl.): 21-22, 1970.
4. COUZINEAU, P. & BAUFINE DUCROQ, H. — Agglutination directe des toxoplasmes. Préparation de l'antigène et examen de 400 sérums. *Ann. Biol. clin.*, 28: 411-415, 1970.
5. DESMONTS, G. — Dépistage de la toxoplasmosis par agglutination des parasites. Intérêt d'un antigène très sensible pour la recherche des immunoglobulines G spécifiques. *Ann. Biol. clin.*, 41: 139-143, 1983.
6. FULTON, J. D. & TURK, J. L. — Direct agglutination for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, 2: 1068-1069, 1959.
7. SEROLOGICAL testing in malaria. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 50: 527-535, 1974.
8. SOUZA, S. L. & CAMARGO, M. E. — The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis sero diagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 8: 255-258, 1966.
9. WALLACE, G. D. — Sabin-Feldman dye test for toxoplasmosis. The use of sodium citrate in accessory factor and a method for collecting and storing blood on paper disc. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 18: 395-398, 1969.
10. ZHUANG, H.; COULEPIS, A. G.; LOCARNINI, S. A. & GUST, I. D. — Detection of markers of hepatitis B infection in serum dried on to filter paper: an application to field studies. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 60: 783-787, 1982.

Recebido para publicação em 30/8/1988