

Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*

Concordance between ELISA and IFA, for IgG antibodies detection against *Toxoplasma gondii*

Liliana Jazmín Cortés¹, Lorena Mancera¹

Resumen

Objetivo. Medir el grado de concordancia entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de ELISA, empleadas para la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en humanos.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio descriptivo comparativo de dos técnicas diagnósticas para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. gondii*, en 243 sueros humanos del banco de muestras del Laboratorio de Parasitología-Red Nacional de Laboratorios del Instituto Nacional de Salud, recolectados durante los años 2000 a 2006.

Resultados. El porcentaje de reactividad para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* fue de 54% (131 sueros) por la técnica IFI y de 56,3% (137 sueros) por la técnica ELISA; además, el 46% (112 sueros) de las muestras fueron negativas por la técnica IFI y el 44% (106 sueros) negativas fueron por la técnica ELISA. El valor del índice kappa fue de 0,916 (IC95%

0,866-0,976), el cual refleja una concordancia casi absoluta entre las dos técnicas.

Conclusiones. El índice kappa muestra una concordancia casi absoluta entre las técnicas, IFI y ELISA, lo cual hace que los laboratorios departamentales de salud pública del país puedan cumplir con la determinación de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* como prueba diagnóstica en el control prenatal, cuando no se cuente con la infraestructura necesaria para la técnica de IFI, teniendo en cuenta que la de ELISA está fundamentada en el grado de afinidad de anticuerpos por un antígeno determinado y no mide el nivel real de éstos en una muestra de suero, como sí lo hace la técnica de IFI.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, ELISA, inmunofluorescencia indirecta, humanos, toxoplasmosis, anticuerpos.

Correspondencia:

Liliana Jazmín Cortés, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Zona6, CAN, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (+571) 220 7700 jcortes@ins.gov.co

Recibido: 11/07/2008; Aceptado: 20/04/2009

¹ Grupo de Parasitología, Red Nacional de Laboratorios, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Abstract

Objective. To measure the degree of correlation between the indirect fluorescence antibody test (IFAT) and the ELISA techniques used for the detection of anti-Toxoplasma gondii IgG antibodies in humans.

Materials and methods. We conducted a comparative study of two diagnostic techniques for the detection of anti-T. gondii IgG, using 243 human serum samples, collected during the years 2000-2006, from the serum collection of the Laboratorio de Parasitología-Red Nacional de Laboratorios of the Instituto Nacional de Salud.

Results. The percentage of reactivity for anti-T.gondii IgG was 54% (131 sera) by the IFAT technique and 56.3% (137 sera) by the ELISA technique, while 46% (112 sera) of the samples were negative by IFAT and 44% (106 sera) by ELISA. The kappa value was 0.916 (95%CI: 0.866 – 0.976), which reflects an almost perfect agreement between the two techniques.

Conclusions. The kappa index shows an almost perfect agreement between ELISA and IFAT. This will help the departmental public health laboratories of the country to comply with the determination of IgG anti-T.gondii as a diagnostic tool during prenatal care, if they do not have the infrastructure needed for the IFAT, bearing in mind that ELISA is based on the degree of affinity of antibodies for a specific antigen and does not measure the actual antibody level in a serum sample, as does the IFAT technique.

Keywords: Toxoplasma gondii, ELISA, IFAT, human, toxoplasmosis, antibodies.

Introducción

La toxoplasmosis es una zoonosis de amplia distribución mundial ⁽¹⁾, producida por el protozooario Toxoplasma gondii, cuya frecuencia de presentación varía mucho según las zonas geográficas, el nivel socioeconómico y los hábitos alimenticios de la población; es una enfermedad benigna o asintomática cuando afecta a niños o adultos, pero cuando afecta a personas inmunosuprimidas, los riesgos pueden ser graves (toxoplasmosis cerebral) y cuando afecta al feto se pueden presentar desde partos prematuros, síndrome visceral o coriorretinitis hasta serias consecuencias en el desarrollo neurológico (calcificaciones, hidrocefalia o microcefalia) ⁽²⁾. La toxoplasmosis congénita es una de las causas principales de lesiones oculares y malformaciones congénitas; es la segunda causa de ceguera congénita en Colombia ⁽³⁾. Además, es una de las enfermedades que reporta altos índices de morbilidad, lo cual ha motivado a muchos investigadores a realizar estudios inmunológicos encaminados hacia el diagnóstico temprano de este evento, mediante el desarrollo de técnicas basadas en la determinación de anticuerpos específicos contra T. gondii ^(4,5).

Hasta la fecha, la prueba serológica más utilizada ha sido la de tinción, que Sabin y Feldman desarrollaron en 1948, y que a títulos de 1:128 se considera indicadora de toxoplasmosis activa. Esta prueba, que utiliza parásitos vivos y un factor sérico (que nunca fue bien conocido) al que se llamó factor accesorio, fue ventajosamente sustituida por la inmunofluorescencia indirecta (IFI), diseñada por Goldman en 1962 y modificada por Fletcher en 1965 ⁽⁶⁾. La técnica de inmunofluorescencia indirecta, además de poseer idéntica sensibilidad y especificidad, al no utilizar un factor accesorio ni parásitos

vivos, es menos peligrosa y más accesible. Asimismo, en virtud de la coloración resultante del efecto fluorescente, su lectura es menos subjetiva que la de Sabin y Feldman ⁽⁷⁾.

La introducción de nuevas técnicas ha ampliado las perspectivas de diagnóstico de esta enfermedad parasitaria. Actualmente, la determinación de anticuerpos específicos se lleva a cabo por diferentes técnicas con diferentes niveles de sensibilidad ^(8,9) y que han suplido el método de referencia utilizado para la determinación de anticuerpos IgG contra *T. gondii*; entre las más empleadas están la de inmunofluorescencia indirecta, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), hemaglutinación indirecta y fijación de complemento.

Una de las finalidades de la Red Nacional de Laboratorios, en cabeza del Instituto Nacional de Salud, es promover programas de control de calidad para los laboratorios departamentales de salud pública del país, que permitan la eficiencia y calidad de los procesos y el fortalecimiento de la vigilancia en los eventos de interés en salud pública, como la toxoplasmosis, cuyo diagnóstico debe basarse en la suma de hallazgos clínicos y de laboratorio, mediante métodos directos que demuestren la presencia del parásito o métodos indirectos que detecten anticuerpos específicos ^(2,10,11).

Los métodos indirectos son los más usados por los laboratorios, por lo que se adelantó el presente trabajo para determinar la concordancia entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA, empleadas para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* en humanos ⁽¹²⁾.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de tipo descriptivo comparativo mediante una evaluación de concordancia de consistencia entre las técni-

cas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA. La muestra estuvo constituida por 243 sueros humanos almacenados en la seroteca del Laboratorio de Parasitología-Red Nacional de Laboratorios del Instituto Nacional de Salud, provenientes de pacientes que asistieron al instituto durante los años 2000 a 2006, para el diagnóstico de toxoplasmosis, por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Estas muestras se encontraban almacenadas a -20°C , debidamente rotuladas y selladas para evitar la contaminación. Además, se cuenta con alarmas en los congeladores para detectar en forma oportuna cualquier alteración en la cadena de frío que pueda ocasionar la desnaturalización de las proteínas. De esta manera, se aseguró la calidad de las muestras para su posterior análisis por la técnica ELISA para la determinación de anticuerpos IgG contra *T. gondii*.

Los sueros se dividieron en dos grupos, constituidos de la siguiente forma:

Grupo 1: muestras positivas con diferentes títulos de anticuerpos: (1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1.024, 1/2.048, 1/4.096, 1/16.382).

Grupo 2: muestras negativas previamente clasificadas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos anti-*T. gondii* tipo IgG.

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de exclusión para las muestras:

sueros contaminados o que no se encontraran en buenas condiciones de almacenamiento, como viales abiertos, con presencia de turbidez o que hubiesen sido descongelados previamente. etc.;

viales con cantidades inferiores a 100 μl ;

viales con identificación inadecuada, y viales que habían sido utilizados como sueros controles (positivos y negativos) para la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Análisis de datos

El grado de concordancia entre las dos técnicas empleadas se midió con la prueba de kappa de concordancia ⁽¹³⁾. Los datos del estudio se analizaron con los programas estadísticos Epi-Info, versión 6.0, y SPSS, versión 13.0.

Para el análisis de resultados, se definieron las siguientes variables.

Muestras positivas. Se consideraron como sueros positivos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, títulos mayores o iguales a 1/16, y por la técnica de ELISA, títulos mayores o iguales a 10 UI/ml.

Muestras negativas. Se consideraron sueros negativos los títulos por debajo de dichos valores.

Muestras dudosas. Para la técnica ELISA se consideran sueros dudosos aquéllos cuyos resultados se encontraban en el rango entre 9 y menos de 10 UI/ml ⁽¹⁴⁾.

Inmunofluorescencia indirecta. Desarrollada en el Instituto Nacional de Salud, esta técnica determina anticuerpos anti-T. gondii tipo IgG presentes en el suero del paciente. El principio de este procedimiento se basa en el uso de láminas portaobjetos con áreas circulares con trofozoítos de T. gondii previamente fijados y listos para la identificación de inmunoglobulinas específicas contenidas en las muestras examinadas.

Los anticuerpos de la clase IgG presentes en el suero del paciente, se adhieren a la pared del parásito, donde se detectan por medio de una

anti-IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína. La reacción se lee al microscopio de fluorescencia y se determina el título en la última dilución del suero, en la cual se ve fluorescencia en toda la periferia de los taquizoítos, aunque sea poco intensa; ésta sería una reacción positiva a esta dilución. Se considera no reactiva cuando el parásito se observa completamente rojo o si la fluorescencia se ve localizada en uno de los extremos de los parásitos, lo que se llama fluorescencia polar ⁽¹⁴⁾.

Técnica ELISA. A cada muestra de suero se le determinó la presencia o la ausencia de anticuerpos por la técnica ELISA, por medio de reactivos comerciales marca BioElisa TOXO IgG.

Es una prueba para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos IgG contra T. gondii. Se añaden muestras diluidas a los pozos de una microplaca recubierta de antígenos de toxoplasma y se incuban. Si la muestra presenta anticuerpos anti-T. gondii, éstos se combinan con los antígenos fijados al pozo. A continuación, se lavan los pozos para eliminar la muestra residual y se añaden anticuerpos anti-IgG humana, marcados con una enzima (conjugado).

El conjugado se fija a las IgG anti-T. gondii que se han unido a los antígenos del pozo durante la primera incubación; después de un nuevo lavado para eliminar el material que no se ha unido, se añade una solución de sustrato enzimático que contiene cromógeno. Esta solución desarrolla un color azul si la muestra contiene IgG anti-T. gondii. El color azul cambia a amarillo después de detener la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de IgG anti-T. gondii presente en la muestra ⁽¹⁵⁾.

Resultados

De los 243 sueros previamente analizados por

la técnica de inmunofluorescencia indirecta, el 54% (131 sueros) correspondió a muestras positivas y el 46% (112 sueros) a muestras negativas. Estos mismos sueros, analizados por la técnica ELISA para la determinación de anticuerpos contra *T. gondii* de la clase IgG; el resultado fue de 56% (137 sueros) de muestras positivas y 44% (106 sueros) de muestras negativas. No se obtuvieron resultados dudosos.

Del total de sueros analizados, 129 sueros (53%) presentaron resultados positivos por ambas pruebas, 104 sueros (42,7%) presentaron resultados negativos por las dos técnicas y 10 sueros (7,19%) resultaron positivos en al menos una de las dos pruebas. Además, 131 sueros (53,9%) fueron positivos por la técnica de IFI, 137 sueros (56,3%) fueron positivos por la técnica de ELISA, 112 sueros (46%) fueron negativos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y 106 sueros (43,6%) arrojaron resultados negativos por la técnica ELISA.

La tabla 1 muestra los resultados concordantes y discordantes, tanto positivos como negativos, obtenidos por las dos técnicas (IFI y ELISA). Se obtuvieron 131 sueros positivos y 112 sueros negativos por la técnica de IFI y 137 sueros positivos y 106 sueros negativos por la técnica ELISA. Además, 8 muestras que fueron negativas por IFI, fueron positivas por la técnica de ELISA, y 2 muestras que fueron positivas por IFI, fueron negativas por la técnica de ELISA.

Tabla 1. Resultados concordantes y discordantes obtenidos por las técnicas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta

| | | IFI | | |
|-------|---|-----|-----|-----|
| | | P | N | |
| ELISA | P | 129 | 8 | 137 |
| | N | 2 | 104 | 106 |
| | | 131 | 112 | 243 |

La tabla 2 muestra la concordancia de los resultados obtenidos por las dos técnicas (IFI y ELISA). Del 100% de las muestras procesadas (243), el porcentaje obtenido de los resultados concordantes en positividad y negatividad al comparar las dos técnicas fue de 53% y 42,7%, respectivamente, y el 4% corresponde a los resultados discordantes obtenidos al comparar las técnicas de IFI y ELISA.

Tabla 2. Resultados obtenidos por las técnicas ELISA e inmunofluorescencia indirecta

| IFI | ELISA | Porcentaje |
|----------|----------|------------|
| Positivo | Positivo | 53 |
| Negativo | Negativo | 42,7 |
| Negativo | Positivo | 3,29 |
| Positivo | Negativo | 0,82 |

La tabla 3 muestra la concordancia total al comparar las dos técnicas de diagnóstico. El porcentaje de concordancia de los resultados positivos y negativos de las dos técnicas fue de 94,1% y 98,1%, respectivamente, y el porcentaje de concordancia total obtenido fue de 95,8%.

Tabla 3. Porcentaje de concordancia total al comparar las dos técnicas

| Concordancia entre IFI y ELISA | |
|--------------------------------------|------------|
| Descripción | Porcentaje |
| Concordancia de resultados positivos | 94,1 |
| Concordancia de resultados negativos | 98,1 |
| Concordancia total | 95,8 |

Como hallazgos relevantes para el presente estudio, se encontró que el coeficiente de kappa de concordancia entre la prueba de ELISA y la inmunofluorescencia indirecta fue de 0,916 (IC95% 0,866 - 0,967) ⁽¹³⁾.

Discusión

En este estudio se realizó un análisis de concordancia entre una prueba comercial ELISA, que utiliza antígeno inactivado de *T. gondii*, y la prueba de inmunofluorescencia indirecta, que emplea como antígeno trofozoítos de *T. gondii* previamente inactivados, desarrollada por el Laboratorio de Parasitología-Red Nacional de Laboratorios del INS.

Entre los parámetros calculados para establecer la concordancia entre las dos pruebas antes mencionadas, se encuentra el índice kappa ^(11,15), que indica el grado de acuerdo existente por encima del esperado al azar descrito por Landis y Koch; se encontró que el coeficiente de kappa de concordancia obtenido entre las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA fue de 0,916 (IC95% 0,866 - 0,967), valor que, según los márgenes para estimar el grado de acuerdo en función del índice kappa descrito por Landis y Koch, se interpreta como un grado de acuerdo casi absoluto ⁽¹⁶⁾.

El método de referencia para la determinación de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* es la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Sin embargo, en el presente estudio no se tomó esta prueba como método de referencia, solamente se quería establecer el grado de concordancia entre las dos técnicas (IFI y ELISA), por lo que es una evaluación de concordancia de consistencia.

El porcentaje de concordancia de los resultados positivos y negativos de las dos técnicas fue de 94,1% y 98,1%, respectivamente, y el porcentaje de concordancia total obtenido fue de 95,8%, lo que indica que entre las dos técnicas comparadas existe un excelente índice de concordancia ($kappa=0,916$), que es un valor de concordancia muy bueno, ya que corrige la concordancia debida solamente a la

intervención del azar e incluye el cálculo de la concordancia esperada, que incorpora los valores marginales de cada prueba ^(13,15).

El porcentaje de muestras discordantes en este estudio comparativo se pudo deber a reacciones cruzadas, tales como factor reumatoideo y anticuerpos antinucleares, entre otras. Sin embargo, no se tienen pruebas exactas de estas interferencias, por lo que se sugiere volver a procesar estas muestras por un tercer método diagnóstico ⁽¹⁷⁾.

Es importante tener presente que no es posible establecer una relación directa entre los títulos de anticuerpos tipo IgG contra *T. gondii* presentes en una muestra y determinados por el método de inmunofluorescencia indirecta, y los títulos que se encuentran en esa misma muestra y determinados por la técnica ELISA, ya que esta última determina los anticuerpos presentes en el suero, pero no sus niveles. Dichos anticuerpos están en función de la afinidad y la concentración, de tal forma que una muestra que contenga anticuerpos de alta afinidad en baja concentración, puede presentar la misma densidad óptica que una muestra con anticuerpos de baja afinidad pero con alta concentración ⁽¹⁸⁾, por lo que la técnica ELISA indirecta no proporciona información cuantitativa como sí ocurre con la técnica de IFI, en la que es posible determinar los títulos de anticuerpos presentes en una muestra ya que se hacen diluciones seriadas de la misma ⁽¹⁹⁾.

Los resultados obtenidos permitirán que los laboratorios departamentales de salud pública del país puedan cumplir con la determinación de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* como prueba diagnóstica en el control prenatal, cuando no se cuente con la infraestructura necesaria para la técnica de IFI, teniendo en cuenta que la de ELISA está fundamentada en el grado de afinidad de anticuerpos por un antígeno de-

terminado y no mide su concentración real en una muestra de suero, como lo hace la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Cabe mencionar que las publicaciones que fueron marco de referencia para esta investigación están encaminadas a la evaluación de una técnica diferente (hemaglutinación indirecta Vs. IFI) y, además, en sueros de animales. Por tal razón, existen pocas herramientas para la discusión de investigaciones similares en sueros humanos ^(5,20).

El presente trabajo contribuyó en el fortalecimiento de los estudios ya realizados, con base en análisis comparativos entre dos técnicas diagnósticas y, de igual forma, en el desempeño de los profesionales en el ámbito.

Referencias

1. Braselli A. Toxoplasmosis. Infectio. Consultado en 10/07/2008 Disponible en: <http://infecto.edu.uy/indicetana.html>.
2. Gómez JE, Ruiz B, Silva P, Beltrán S, Cortés J, Montoya J, et al. Guía de práctica clínica para toxoplasmosis durante el embarazo y toxoplasmosis congénita en Colombia. Infectio. 2007;11:1-13.
3. Gómez J. Vientos favorables para un mejor control de la toxoplasmosis en Colombia, Infectio. 2007;11:103
4. Germani C, Pacheco F. Comparação entre os testes de imuno-fluorescencia indirecta e hemaglutinação indirecta para detecção e anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. Acta Scientiae Veterinariae. 2002;30:185-9.
5. Ishizuka M, Angelino J, Souza J. Toxoplasmosis suína II. Estudo comparativo das provas de imunofluorescencia indireta e hemaglutinação para avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros suínos. Bol Oficina Sanit Panam. 1986;100:524-30.
6. Castaño J, Gómez J, Duque A. Toxoplasmosis ocular en el Quindío: características clínicas. Biomédica. 1991;1:121.
7. Antunes M, Duarte R, Laureantino V, Coutinho G, Gomes H, Reis A. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay ELISA to detect anti-*Toxoplasma gondii* IgM antibodies, and comparison with the immunofluorescence technique. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32:661-9.
8. Silva N, Chaplin E, Méndez L, Araujo F. Determinação de anticorpos toxoplásmicos em soros de suínos abatidos em matadouros, na região do Alto Taquari, RS, Brasil. Arq Fac Vet. 1981;9:33-8.
9. Suárez F, Andrade H, Galisteo A, Miguel O. Concordancia de la pruebas de ELISA y hemaglutinación indirecta en el diagnóstico de la toxoplasmosis porcina. Rev Inv Vet Perú. 2002;13:84-6.
10. Huerta S, Chávez A, Casas E, Falcón N, Raymundo F. Concordancia entre las pruebas de hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta para determinar la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en ovinos. Rev Investig Vet Perú. 2006;17:178-83.
11. Camargo A, Silva A, Marrocos H, Rosenail J, Olivera L, Falcao R. Estudio comparativo entre diferentes métodos para diagnóstico de toxoplasmosis humana. Newslab. 1998;28:121-8.
12. Camargo M, Ferreira A, Rocca A, Belem Z. Um test práctico para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de imunofluorescencia e imunoenzimático de captura de Ig M. Ver Brasileira Patol Clin. 1986;22:196-201.
13. Molinero L. Medidas de concordancia para variables cuantitativas. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión; 2001. Consultado 10/07/2008. Disponible en: www.seh-lelha.org/concor2.htm.
14. Santacruz M, Cortés L. Manual de toxoplasmosis. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2004.
15. Romero T, Bermúdez M, Dosil P, Montiel M. Estudio comparativo entre los métodos de hemaglutinación e inmunoenzímico en el diagnóstico de la toxoplasmosis. Kasmera. 1995;23:69-88.
16. Fernández S, Pértega S. Asociación de variables cualitativas: test de chi-cuadrado. La Coruña: Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística: Complejo Hospitalario Juan Canalejo; 2004.
17. Enciso C, Montilla M, Santacruz M, Nicholls R, Rodríguez A, Mercado M. Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo y la prueba comercial Chagatex para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi. Biomédica. 2004;24:104-7.
18. Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today. 1993;9:229-32.
19. Germani C, Pacheco A. Comparação entre os testes de imuno-fluorescencia indirecta e hemaglutinação indirecta para detecção e anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. Acta Scientiae Veterinariae. 2002;30:185-9.
20. Suárez F, Andrade H, Galisteo A. Evaluación serológica de *Toxoplasma gondii* en suínos mediante la prueba de ELISA. Rev Investig Vet Perú. 1999;10:11-7.