

Valor diagnóstico de la inmunofluorescencia indirecta con anti-IgM para Enfermedad de Chagas, en adultos y recién nacidos

Myriam Lorca y Erica Thiermann¹

Diagnostic value of the IgM Immunofluorescence test for chagas' disease in infants and adults.

The IFAT-IgM with *Trypanosoma cruzi* antigen was applied in a double blind study of 242 serum samples previously examined by the IFAT-IgG for Chagas' disease. The sensitivity of the test was enhanced by prolonged incubation at 4°C. The specificity of the IgM reaction in normal sera, was checked repeating the test in aliquots, absorbed with IgG. The results were tabulated according to the origin of the samples and the presence, or absence, of IgG antibodies for Chagas' disease. 84 of the samples belonged to infants and 158 to adults, 131 had IgG antibodies against *T. cruzi* and the remaining 111 served as negative controls in both groups.

It was demonstrated that a high proportion of positive IgM-results obtained in normal sera, of infants (15,5%) and adults (28,5%), were due to other factors: Elimination of nonspecific IgM antibodies, by absorption, reduced the reactions of IgM, at titers of 1/10 and 1/20, to three samples in the infant's group. However, in the sera of adults, positive IgM results remained after absorption, at titers up to 1/20, in the infected individuals as well as in controls. Only one serum gave a titer of 1/40, suggesting specificity.

The three samples of the infant's group, in which IgM antibodies to *T. cruzi* were demonstrated, belonged to a child with Chagas' disease demonstrated by xeno-diagnosis. The specimen of the adult in which a positive IFAT-IgM-Chagas was obtained at a titer of 1/40, corresponded to a woman with recently acquired infection, as judged by a seroconversion (from (-) to (+) 1/40) in the IFAT-IgG for Chagas' disease.

The results indicate that the test yields specific results, if it is applied in sera previously absorbed with IgG and confirm that low titers are of diagnostic value in sera of infants. However, in sera of adults, only titers from 1/40 onward are considered to be specific for Chagas's disease.

El empleo de la reacción de inmunofluorescencia Indirecta (RIFI), ha permitido ampliar el estudio serológico en diferentes enfermedades infecciosas. Dicha técnica, de ejecución relativamente simple y rápida, ofrece la doble ventaja de ser aplicable tanto en la pesquisa de diferentes agentes infecciosos, lo que depende del microorganismo que se emplee como antígeno, como en la demostración de diferentes tipos de anticuerpos, de acuerdo con la antigammaglobulina que se utilice como reactivo.^{1,2}

La RIFI practicada con antigammaglobulina de tipo IgG y antígeno de *Trypanosoma cruzi* (RIFI-IgG-Chagas), ha tenido gran aceptación en el estudio de la enfermedad de Chagas, recomendándose su empleo para el diagnóstico del caso individual y para los estudios epidemiológicos.³

La demostración de anticuerpos IgG, de aparición relativamente tardía y de persistencia pro-

longada, incluso indefinida, diagnostica la infección y permite establecer su prevalencia. Sin embargo, esta información puede ampliarse, si en los sueros positivos se practica además, una RIFI-IgM. Los anticuerpos de este tipo, debido a su aparición precoz y duración limitada, caracterizan la fase aguda de la infección; de modo que la demostración de IgM específica indica que la infección detectada se encuentra en una etapa reciente o activa y, con respecto a la epidemiología, se agrega al estudio de prevalencia, el de incidencia.

Si bien la RIFI-IgM es útil para el diagnóstico de las infecciones agudas adquiridas, se le atribuye aún mayor importancia en la pesquisa precoz de las infecciones congénitas del nacido.⁴ El hecho que los anticuerpos IgM constituyen macroglobulinas que, a diferencia de las de tipo IgG, no atraviesan la placenta intacta y que además, el feto es capaz de formar anticuerpos IgM frente a un agente infeccioso, permite concluir que la IgM demostrada en sangre del recién nacido corresponde a una infección transplacentaria. De allí que la RIFI-IgM, aplicada en sangre de cordón, sirve para hacer distinción entre infección con-

Trabajo financiado en parte por el Proyecto M-919-8122. U. de Chile Serv. de Desarrollo Científico y de Cooperación Internacional.

¹Unidad de Parasitología. Div. de Ciencias Médicas Occidente, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

génita y presencia de anticuerpos maternos (IgG), siempre que se descarte la posibilidad de un pasaje accidental de IgM materna, debido a lesiones de la placenta.

La utilidad diagnóstica de la RIFI-IgM ha quedado demostrada en infecciones chagásticas agudas del adulto,⁵ como asimismo en algunas infecciones congénitas clínicamente manifiestas; sin embargo, este método no cuenta aún con una aceptación universal, ya que existen ciertas dificultades técnicas, que suelen impedir la obtención de resultados correctos y reproducibles, como se observara en otras parasitosis.⁷ La mayoría de los errores detectados durante la aplicación de la RIFI-IgM, en diferentes enfermedades infecciosas, son atribuidas a la calidad de los conjugados de IgM, que se utilizan en la reacción. Sin embargo, además de los resultados positivos falsos por impurezas y sobreconcentración del conjugado, se describe la aparición de IgM inespecífica debido a factores reumatoideos,⁸ recomendándose su eliminación mediante la absorción de los sueros con IgG polimerizada.⁹ Con respecto a los resultados negativos falsos, que pueden deberse a concentraciones insuficientes del conjugado, habría que considerar además, que los anticuerpos IgM, debido a su escasa capacidad para fijarse a los antígenos, requerirían de una incubación prolongada para que se produzca la reacción antígeno/anticuerpo, que se pretende pesquisar en la RIFI.¹⁰

Dada la indiscutible importancia de la pesquisa oportuna de la IgM anti-*T. cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, iniciamos un estudio, destinado a analizar la importancia del factor reumatoide que afectaría la especificidad de la reacción, aplicando, a su vez, incubación prolongada para aumentar su sensibilidad. Los resultados obtenidos en esta pequeña serie experimental son motivo de la presente comunicación.

MATERIAL Y METODO

El material consta de 242 muestras de sangre previamente examinadas mediante RIFI-IgG-Chagas. En 131 de los sueros se habían demostrado anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* y las 111 muestras restantes corresponden a sueros negativos para enfermedad de Chagas. Todas las muestras positivas y la mayoría de las negativas fueron recogidas en diferentes maternidades del país, con el fin de estudiar la importancia de la transmisión

congénita de *T. cruzi* en nuestro medio. Se disponía de 158 sueros de embarazadas y de 84 muestras de sangre de recién nacidos, en su mayoría hijos de madres chagásticas.

Para la demostración de los anticuerpos IgM, específicos para enfermedad de Chagas, se aplicó, en principio, la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI-IgM) en placas,¹¹ modificándose, sin embargo, el tiempo de la primera incubación (antígeno + suero), según indicaciones de Robertson y Kertesz.¹⁰ Es decir: en vez de la incubación usual (45 minutos a 37°C) se aplicó la incubación prolongada (16 a 18 horas) a temperatura baja (4°C), que aumentaría la capacidad fijadora de los anticuerpos IgM.¹⁰ Como antígeno se empleó epimastigotes de *T. cruzi*, obtenidos de cultivo en medio difásico. El conjugado de anti-IgM + isothiocianato de fluoresceína, de procedencia comercial,* se utilizó en dilución 1/20, de acuerdo con la titulación previa, practicada con sueros etalones positivos y negativos, obtenidos del Instituto de Enfermedades Tropicales de Sao Paulo.

Las reacciones de IFI-IgM-Chagas fueron practicadas en series sucesivas, compuestas de muestras IgG positivas y negativas para enfermedad de Chagas, agrupadas al azar. Los sueros, previamente inactivados a 56°C, fueron diluidos en buffer fosfato pH 7.2, en diluciones dobles de 1/5 al 1/40. La validez de los resultados se controló a través de los etalones positivos y negativos, antes mencionados.

Los sueros que resultaron positivos para RIFI-IgM-Chagas, en el primer examen, fueron sometidos a un proceso de absorción con IgG polimerizada, según Técnica de Camargo¹¹ y reexaminados mediante RIFI-IgM, con el fin de eliminar los resultados positivos inespecíficos, debidos al efecto de los factores reumatoideos.

Una vez obtenidos los resultados de la RIFI-IgM-Chagas, se tabuló el material, separando los sueros correspondientes a las embarazadas de los provenientes de los recién nacidos y dividiendo además, cada serie en sueros positivos y negativos para enfermedad de Chagas, según estudio previo con RIFI-IgG. Se dispone por ende de dos series de muestras, que se componen de la siguiente manera:

La Serie 1 reúne 84 muestras de sangre de recién nacidos, correspondiendo 48 de ellas a mues-

*Fluorescein conjugated lyophilized. Antibody globulin to Human IgM (u-chain specific) Calbiochem-Behring corp.

tras con resultado positivo para RIFI-IgG-Chagas y las 36 restantes a controles negativos. Las 48 muestras con anticuerpos IgG para enfermedad de Chagas, provienen de 28 recién nacidos cuyas madres presentaban infección chagásica. Se trata de 23 muestras de sangre de cordón y de 25 sueros, obtenidos de 16 lactantes, que fueron controlados durante los primeros meses de la vida.

La Serie 2 se compone de 158 sueros de embarazadas, correspondiendo 83 de ellos a muestras positivas para RIFI-IgG-Chagas y 75 a controles negativos.

Finalmente se procedió a analizar el valor diagnóstico de la pesquisa de los anticuerpos IgM anti-*T. cruzi*, en sangre de embarazadas y recién nacidos, sobre la base de los antecedentes de los respectivos casos IgM positivos.

RESULTADOS

En las muestras de los recién nacidos (Tabla 1)

Tabla 1

Efecto de la absorción con IgG polimerizada sobre los resultados de la RIFI-IgM para enfermedad de Chagas en sueros positivos y negativos para RIFI-IgG, provenientes de niños.

RIFI-IgG Chagas	Resultados RIFI-IgM-Chagas a) Sueros sin absorber						Resultados RIFI-IgM-Chagas b) Sueros absorbidos					
	Total	(-)	1/5	1/10	1/20	1/40	Total	(-)	1/5	1/10	1/20	1/40
Positivos	48	39	3	3	2	1	9	6	/	1	2	/
Negativos	36	29	5	1	/	1	7	7	/	/	/	/
Totales	84	68	8	4	2	2	16	13	/	1	2	/

Tabla 2

Resultados de los exámenes en un niño con xenodiagnóstico positivo

Tipo de exámenes	Fechas de obtención de las muestras					
	11/10/79	6/XI/79	6/12/79	30/V/80	17/6/80	18/6/80
<i>T. cruzi</i> en sangre	(-)	---	---	---	---	---
Xenodiagnóstico	(-)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	---
RIFI-IgG	+ 1/160	+ 1/80	---	+ 1/80	+ 1/40	+ 1/40 Plasma
RIFI-IgM	(-)	(-)	---	+ 1/20	+ 1/20	+ 1/40 Plasma

la RIFI-IgM-Chagas, practicada en sueros sin absorber (1-a), resultó positiva en 9 de los 48 sueros provistos de anticuerpos IgG para enfermedad de Chagas (18,8%) y en 7 de las 36 muestras del grupo control (19,4%). Los títulos observados en ambos grupos oscilaron entre 1/5 y 1/40.

Al someter las 16 muestras IgM positivas a una absorción con IgG polimerizada (Tabla 1-b), desaparecieron los anticuerpos IgM en 13 de las 16 muestras en estudio (81%). El resultado definitivo indica presencia de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi*, a títulos de 1/10 y 1/20, en tres de los 9 sueros absorbidos correspondientes a los hijos de madres chagásicas. El grupo control, compuesto de 7 muestras absorbidas, no presentó resultado positivo para RIFI-IgM-Chagas.

La tabulación posterior de los resultados serológicos reveló que las tres muestras con demostración de IgM anti-*T. cruzi*, correspondían a un niño con infección chagásica, demostrada mediante xenodiagnóstico (Tabla 2).

En la serie de los sueros correspondientes a las embarazadas (Tabla 3). La RIFI-IgM-Chagas, practicada en muestras sin absorber (Tabla 3-a), resultó positiva en 43 de los 83 sueros provenientes de mujeres con infección chagásica (51,8%) y en 52 de los 75 controles (68,6%).

En 75 de los 95 sueros IgM positivos, según el primer examen, se disponía de una cantidad apropiada para repetir la prueba en muestras previamente absorbidas con IgG polimerizada.

La repetición de la RIFI-IgM-Chagas en las 75 muestras absorbidas, (Tabla 3-b) resultó negativa en 45 casos (60%). En el grupo chagásico se negativizaron 28 de las 40 muestras (70%) y en las 12 restantes se observó títulos de 1/5 al 1/40 (30%).

En el grupo control desaparecieron los resultados IgM positivos en 17 de los 35 casos (48,5%) y persistieron, a títulos de 1/5 al 1/20, en 18 muestras (51,5%).

La aparición de IgM, a títulos de 1/5 al 1/20, en el 51,5% de los sueros del grupo control, negativos para RIFI-IgG-Chagas, obviamente resta valor a toda demostración de dichos anticuerpos a este nivel en el grupo chagásico. De acuerdo con este criterio, la demostración de IgM específica en nuestra serie, se reduciría a una muestra, con título 1/40, correspondiente al grupo chagásico. El análisis posterior de los resultados permitió observar que dicho suero IgM positivo correspondía a una mujer de 19 años, procedente del Valle del Elqui, cuyos exámenes serológicos para enfermedad de Chagas, practicados en 1º y 2º trimestre del embarazo, habían resultado negativos para RIFI-IgG. Un tercer control, practicado en fecha cercana al parto, resultó positivo para RIFI-IgG-Chagas y en esta muestra se obtuvo el resultado positivo para RIFI-IgM-Chagas con título 1/40.

Tabla 3

Efecto de la absorción con IgG polimerizada sobre la RIFI-IgM para Chagas en sueros de adultos positivos y negativos para RIFI-IgG

	Resultados RIFI-IgM-Chagas a) Sueros sin absorber						Resultados RIFI-IgM-Chagas b) Sueros absorbidos					
	Total (-)		Positivos				Total (-)		Positivos			
RIFI-IgG Chagas			1/5	1/10	1/20	1/40			1/5	1/10	1/20	1/40
Positivos	83	40	10	22	5	6	40	28	5	5	1	1
Negativos	75	23	14	19	12	7	35	17	15	2	1	/
Totales	158	63	24	41	17	13	75	45	20	7	2	1

DISCUSION

Nuestros resultados confirman que la RIFI-IgM-Chagas constituye una prueba compleja que puede conducir a errores de diagnóstico; sin embargo, dicho método puede convertirse en un valioso elemento para la pesquisa de las infecciones chagásicas agudas en lactantes y adultos, si se toman debidas precauciones técnicas.

EL requisito fundamental para aplicar dicha técnica es la disponibilidad de sueros patrones de óptima calidad, que permitan seleccionar reactivos comerciales, de adecuada pureza y concentración, y precisar su dilución de trabajo. Dichos

sueros etalones sirven, además, para controlar los resultados que se obtienen en cada serie de reacciones.

Aconsejamos, además, someter la reacción antígeno/anticuerpo a una incubación prolongada a temperatura baja. Hemos observado que dicho proceso contribuye a mejorar la nitidez de las lecturas microscópicas, sin afectar la especificidad de los resultados, en muestras previamente absorbidas.

Nuestros resultados demuestran la indiscutible necesidad de eliminar las reacciones secundarias, no específicas para *T. cruzi*, mediante absorción con IgG polimerizada.¹² Dichos falsos positivos,

debidos a factores reumatoideos, aparecieron en el 15,5% de las muestras correspondientes a recién nacidos y lactantes (tabla 1) y en el 28,5% de los sueros de las embarazadas (tabla 3).

Para la interpretación de los resultados obtenidos mediante RIFI-IgM-Chagas, debe tenerse presente que la importancia diagnóstica del título positivo, varía de acuerdo con el origen de la muestra.

Según los estudios practicados por Stagno y Hurtado,¹² en recién nacidos y lactantes con infecciones chagásicas congénitas, clínicamente manifiestas, la demostración de IgM anti-*T. cruzi* indicaría infección en estos casos, incluso cuando los títulos no alcanzan niveles altos. En cambio, Camargo⁵ en sueros de adultos, encuentra un elevado porcentaje de falsos positivos a títulos bajos, por lo que otorga valor específico a la RIFI-IgM-Chagas a partir de un título de 1/40, en sueros de adultos.

De acuerdo con lo expuesto, el presente estudio demostró IgM específica para enfermedad de Chagas en tres muestras de un total de 48 sueros (6,3%), correspondientes a 28 hijos de madres chagásicas (tabla 1), y en una muestra de un total de 83 sueros (1,2%), correspondientes a 71 embarazadas con serología (IgG) positiva para enfermedad de Chagas. Los antecedentes de ambos casos positivos confirman la especificidad de dichos resultados. Las tres muestras positivas de la serie de los niños corresponden a un lactante con infección chagásica demostrada mediante xenodiagnóstico. El análisis de los exámenes practicados en dicho caso (tabla 2), indicaría que el contacto con el parásito habría ocurrido cerca del trigésimo día de vida (Xenodiagnóstico positivo); dicho contacto habría estimulado la producción de los anticuerpos IgM, que se pesquisaron en las muestras extraídas 6¹/₂ y 7 meses más tarde. La IgM demostrada en un suero de una de las embarazadas debe corresponder a una infección chagásica reciente, como se deduce del viraje de la RIFI-IgG-Chagas de negativa a positiva al 1/40.

Si bien lo observado en nuestra casuística confirma que la demostración de IgM anti-*T. cruzi* indica infección chagásica aguda, no disponemos de argumentos válidos para concluir que los resultados negativos permitan descartar dicha posibilidad. El reducido número de casos IgM positivos pesquisados en nuestro trabajo, podría indicar una falta de sensibilidad de la técnica; sin embargo, dicho fenómeno se explicaría, en gran parte, por

las características del material empleado. El presente estudio preliminar se enfocó bajo un criterio serológico, utilizando muestras de sangre correspondientes a encuestas seroepidemiológicas, practicadas en poblaciones aparentemente sanas. Dicha casuística no incluye casos sintomáticos y la tabulación de los antecedentes no reveló indicios de infección aguda, excepto en los dos casos analizados en el párrafo anterior. El problema de la sensibilidad de la RIFI-IgM-Chagas y de la posible aparición de resultados negativos falsos, debidos a situaciones inmunológicas, sólo puede precisarse con el estudio de una casuística compuesta de infecciones chagásicas agudas, comprobadas parasitológicamente.

Aconsejamos aplicar la RIFI-IgM-Chagas para la pesquisa precoz de las infecciones congénitas que no se manifiestan clínicamente en el recién nacido y en aquellas infecciones adquiridas cuya sintomatología vaga dificulta su detección. Además, debería ampliarse la experiencia sobre el valor diagnóstico de la prueba y la evolución de los anticuerpos de tipo IgM en diferentes situaciones clínicas e inmunológicas, mediante el estudio sistemático de los casos clínicamente manifiestos.

RESUMEN

La reacción de inmunofluorescencia anti-IgM con antígeno de *Trypanosoma cruzi* (RIFI-IgM-Chagas) se aplicó, en un estudio doble ciego, en 242 muestras de sangre, previamente examinadas mediante RIFI-IgG para enfermedad de Chagas. Para aumentar la sensibilidad de la prueba se utilizó incubación prolongada por 16 a 18 horas, a 4°C. La especificidad de los resultados IgM-positivos fue controlada mediante repetición de la reacción en muestras absorbidas con IgG polimerizada. Los resultados fueron tabulados posteriormente, de acuerdo a su origen y la presencia o ausencia de anticuerpos IgG para enfermedad de Chagas. 84 sueros correspondían a recién nacidos y lactantes y los 158 sueros, restantes a adultos. 131 muestras presentaban anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* y 111 sirvieron de controles negativos en ambos grupos.

Se demostró que un elevado porcentaje de los resultados IgM positivos observados en suero normal, proveniente de niños (15,5%) y adultos (28,5%), se debían al efecto del factor reumatoideo. La eliminación de dichos anticuerpos IgM inespecíficos, mediante absorción, redujo el total de positivos a tres muestras con títulos de 1/10 y

1/20 en el grupo de los niños. En cambio, en los sueros de los adultos persistieron resultados IgM-positivos, a títulos de 1/5 al 1/20, tanto en sueros provistos de anticuerpos IgG para enfermedad de Chagas, como en controles negativos. Se demostró IgM a título 1/40 en una muestra correspondiente al grupo IgG-positivo para enfermedad de Chagas.

Los tres sueros con demostración de IgM a títulos de 1/10 y 1/20, del grupo de los niños, correspondían a un caso de infección chagásica demostrada por xenodiagnóstico. La muestra IgM positiva al 1/40, del grupo de los adultos, correspondía a una mujer con infección chagásica reciente, como se deduce de la seroconversión (de (-) a + 1/40), observada en la RIFI-IgG para enfermedad de Chagas.

Los resultados indican que la RIFI-IgM-Chagas proporciona resultados específicos, si previamente se elimina el efecto del factor reumatoideo mediante absorción con IgG. Además, se confirma que la demostración de IgM a títulos bajos tiene valor diagnóstico en sueros de lactantes y recién nacidos. En cambio, en sueros de adultos, solamente los títulos de 1/40 o superiores pueden considerarse específicos.

REFERENCIAS

¹ Lorca M., Herskovic P., Thiermann E. Aplicación de la Reacción

de Inmunofluorescencia Indirecta en la toxoplasmosis Humana. Bol. Hosp. San Juan de Dios 25: 67-68, 1978.

² Cerisola J. A. Immunodiagnosis of Chagas disease: hemagglutination and immunofluorescence test. J. Parasitol. 56: 409-410, 1970.

³ Lorca M., Astorga B., Afías A., Garriga P., Muñoz P. Investigación de enfermedad de Chagas mediante la reacción de inmunofluorescencia Indirecta en diversos bancos de sangre. Rev. Méd. Chile, 104: 6, 1979.

⁴ Remington J.S., Miller M.J. and Browniec I. IgM antibodies in acute toxoplasmosis. Diagnosis significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatrics 41: 1080-1081, 1968

⁵ Camargo M.E., Amato Neto V. Anti-Trypanosoma cruzi IgM antibodies as serological evidence of recent infection. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 16: 200-202, 1974.

⁶ Stango S. Hurtado R. *Trypanosoma cruzi*: Una nueva causa de infección congénita capaz de inducir la formación de anticuerpos IgM (Comunicación preliminar) Bol. Chile Parasit. 25: 90-91, 1970.

⁷ Remington J., Desmonts G. Congenital toxoplasmosis; variability in the IgM fluorescent antibody response and some pitfalls in diagnosis. J. of Pediatric. 83(1): 27-30, 1973.

⁸ Reimer C.B. et al. The specificity of fetal IgM: antibody or anti-antibody Annals New York Acad. Of Sciences 1975.

⁹ Camargo M.E., Leser P.G., Roos A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-toxoplasma fluorescent test. A technique for specific results. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 14 (5): 310-313, 1972.

¹⁰ Robertson P.W. and Kertesz V. Modified fluorescent antibody technique to detect IgM antibody to *Toxoplasma gondii* in congenital infection Journal of Clinical Microbiology 2 (5): 461-462, 1975.

¹¹ Camargo M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 8: 227-234, 1966.

¹² Stango S. Hurtado R. Enfermedad de Chagas congénita. Estudio Inmunológico y diagnóstico mediante inmunofluorescencia con anti IgM. Bol. Chile Pasit. 26 (1-2): 20-27, 1971.