
Consideraciones acerca del diagnóstico inmunológico del síndrome TORCH

FERNANDO MONTOYA

Se revisa someramente la epidemiología del síndrome *TORCH* en Colombia. Se enumeran los métodos de diagnóstico inmunológico disponibles para las diferentes entidades y se describe detenidamente la técnica de *ELISA*. Se hace énfasis en la importancia de la detección de IgM específica mediante la técnica de *INMUNOCAPTURA*, como un marcador de infección de fase aguda y se introduce el concepto de la detección de IgA específica, igualmente mediante *INMUNOCAPTURA*, como un marcador de infección aguda de mayores sensibilidad y especificidad que la misma IgM.

PALABRAS CLAVES
SINDROME TORCH
TOXOPLASMOSIS
RUBEOLA
CITOMEGALOVIRUS
HERPES
INMUNOCAPTURA
DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

nomina ción obedece a la sumatoria de la letra inicial de los agentes responsables de las enfermedades incluidas en él; es así como la T corresponde a toxoplasmosis, la R a rubeola, la C a *Citomegalovirus*, y la H a herpes. La O (otros) da la posibilidad de incluir en el diagnóstico agentes diferentes a los enunciados, como el de la sífilis y, últimamente, el virus de la inmunodeficiencia humana. Sin embargo, aquí nos centraremos en el TORCH clásico.

De las estadísticas disponibles en Colombia sobre TORCH solamente conocemos las del Hospital Universitario del Valle, donde representa el 1.8% de los diagnósticos de egreso del servicio de neonatos; la sífilis es la entidad preponderante (0.8%).

Se requiere evaluación de TORCH en un niño sintomático en el momento del parto o asintomático si la madre está enferma o lo estuvo, bien sea a la luz de la clínica o de la serología. Cuando hay la sospecha se justifica seguir adelante con la pesquisa, si se encuentran niveles de IgM total en la sangre del niño iguales o mayores a 0.5 gm/lt.

El síndrome TORCH también se conoce con el nombre de infección perinatal crónica y su de-

DR. FERNANDO MONTOYA, Profesor, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Reproducido con autorización del Editor de Temas Microbiológicos.

El diagnóstico de cada uno de los agentes implicados en este síndrome se hace de acuerdo con los métodos clásicos como son los exámenes directos, los cultivos y las serologías. Sin embargo, los avances que ha habido en el terreno del diagnóstico de las enfermedades infecciosas y en el caso específico del síndrome TORCH, están fundamentados en el inmunoanálisis. Recordemos que éste tiene como base la reacción antígeno-anticuerpo. Si se dispone de un antígeno conocido podemos averiguar la presencia del anticuerpo correspondiente y viceversa. Cuando el complejo inmune utiliza reactivos solubles, una de las formas de detectar esa reacción es mediante la marcación de alguno de los elementos. En segundo lugar, cuando uno de éstos es una partícula, como por ejemplo la bacteria completa o fragmentos de microorganismos, se habla de las conocidas reacciones de aglutinación. Las de marcación tienen una altísima sensibilidad; sin embargo son elaboradas y requieren buena experiencia; en cambio, las reacciones con partículas son fácilmente realizables, los resultados son rápidos y el costo es bajo.

Las técnicas de marcación se clasifican de acuerdo al tipo de sustancias para revelar la reacción. Si son los fluorocromos tenemos el fluoroinmunoanálisis o inmunofluorescencia; si se trata de enzimas se habla de análisis inmunoenzimático (EIA) y cuando son los radioisótopos las técnicas se denominan de RIA.

Los métodos rápidos utilizados en el diagnóstico de TORCH se pueden dividir en técnicas de floculación, hemaglutinación, inmunofluorescencia directa e indirecta y las técnicas de ELISA.

La floculación (VDRL y RPR) sigue siendo muy importante para el diagnóstico de la sífilis neonatal o adquirida. La microhemaglutinación para *Treponema pallidum* (MHA-TP) reemplaza perfectamente la inmunofluorescencia (FTA-ABS), en la confirmación diagnóstica. En la evaluación pregestacional, las técnicas de hemaglutinación para detectar anticuerpos anti toxoplasma podrían reemplazar a las de inmunofluorescencia o ELISA, dadas su disponibilidad, bajo costo, sensibilidad y simplicidad. Lo mismo se podría decir de la rubeola con relación a las pruebas de látex, que no están disponibles en nuestro medio pero, de estarlo, se podría implementar su utilización más generalizada.

Para la detección de herpes se dispone de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales

específicos, tanto para *Herpesvirus* tipo I como para el tipo II. La búsqueda de anticuerpos es de poca importancia. En el diagnóstico de la infección por *Citomegalovirus* disponemos de la inmunocaptura, como un método altamente confiable.

La ELISA es simplemente una variante metodológica de los análisis inmunoenzimáticos. Utiliza para la reacción un soporte físico que puede ser una caja de micropozos, un pedazo de papel de celulosa, una perla de poliestireno, etc. Su utilidad clínica está fundamentada en dos aspectos: permite determinar la respuesta inmune frente a diversos patógenos y, en segundo lugar, detecta su presencia. La respuesta inmune define si el paciente está en la fase aguda de la enfermedad o en la de convalecencia. Esto se hace discriminando el tipo de inmunoglobulina que en un momento dado tiene el paciente; si tiene IgM para un determinado microorganismo, se puede afirmar que estamos en presencia de un fenómeno agudo y si la que está presente es la IgG, estuvo expuesto en el pasado. Dependiendo del agente se puede deducir si el paciente es o no inmune a la enfermedad; es el caso de los individuos que tienen IgG contra *Toxoplasma* o rubeola.

Para poder realizar una técnica de ELISA se requiere la presencia de antígenos, anticuerpos, enzimas, conjugados, sustratos y un soporte físico para la reacción.

Los anticuerpos utilizados en ELISA, como en cualquier otra técnica serológica, se pueden obtener por inyección del respectivo antígeno en animales de laboratorio o mediante técnicas más elaboradas como las de preparación de anticuerpos monoclonales. Las enzimas utilizadas en la marcación son diversas: maleato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa. Las fuentes de obtención han sido variadas: diversos tejidos animales, hongos como *Aspergillus*, vegetales como el rábano picante y bacterias como *Escherichia coli*; las más utilizadas en la actualidad en el laboratorio clínico de rutina son la fosfatasa alcalina, la galactosidasa y la peroxidasa. Los sustratos son las sustancias que van a interactuar con la enzima para permitir el cambio de color, que indica la presencia del antígeno o del anticuerpo respectivo.

Resultaría muy complejo adquirir en forma aislada todos los elementos que intervienen en las reacciones de ELISA; por ello los laboratorios fabricantes

los han reunido en estuches o *kits*, facilitando así la ejecución.

Las técnicas ELISA utilizadas en la actualidad pueden clasificarse en tres grandes grupos: a) la conocida de sánduche o emparedado; b) las de inhibición y c) las de inmunocaptura. Las de mayor difusión son las de sánduche e inmunocaptura. Las pruebas de inhibición se utilizan para detectar antígenos en líquidos corporales, cuando se encuentran en concentraciones ínfimas. Los métodos de sánduche sirven para la detección de anticuerpos de las clases IgG o IgM y la inmunocaptura se reserva para la de IgM.

La técnica de sánduche se esquematiza en la siguiente forma: sobre el elemento de fase sólida se pega el antígeno para el cual se va a determinar la presencia de la inmunoglobulina específica. Se agrega el suero del paciente; si contiene anticuerpos contra ese antígeno, van a ser capturados en la superficie. Para demostrar los anticuerpos que se pegaron sobre el antígeno se utiliza un segundo anticuerpo, que es una antiinmunoglobulina marcada con una enzima y conocida como conjugado. Si efectivamente el anticuerpo se pegó sobre el antígeno y el conjugado reaccionó con él, para poner en evidencia la presencia de este complejo, se agrega el sustrato, que al cambiar de color detecta la presencia de anticuerpos. Luego, mediante la lectura colorimétrica, utilizando un sistema de patrones de referencia, se calcula en qué cantidad están los anticuerpos dirigidos contra ese antígeno específico.

En definitiva, las técnicas de ELISA, como lo mencionábamos en un principio, van a servir para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Para ello se puede recurrir a dos procedimientos: el convencional, haciendo titulación de las IgG específicas y seguimiento del paciente (sueros de fases aguda y convalescente). Al observar el incremento de títulos se establece el diagnóstico. El segundo utiliza un criterio más ágil que permite el diagnóstico de una vez, prescindiéndose del seguimiento y de la cuantificación, mediante la determinación conjunta de IgG y de IgM, para establecer diferentes fases evolutivas de la enfermedad infecciosa: si la determinación muestra que la IgM es positiva y la IgG negativa, se trata de un paciente que tiene la infección en el momento actual. Cuando la determinación es positiva para ambas inmunoglobulinas la infección es reciente, pero puede que el microorganismo no se encuentre en los tejidos de la persona y cuando solamente se logra

determinar la positividad para la clase IgG, es una infección pasada y, dependiendo del microorganismo, nos informa del estado inmunitario del individuo.

La determinación de la IgM es un elemento muy importante para llegar al diagnóstico de infección de fase aguda; sin embargo, tiene limitaciones inherentes al huésped o al método de ejecución.

Con respecto al huésped, los neonatos y los lactantes menores producen poca cantidad de IgM y lo hacen en forma transitoria. Si la determinación no se hace con un método suficientemente sensible, pueden pasar por negativos siendo realmente positivos. Es el caso de la prueba de Remington en el diagnóstico de la toxoplasmosis y del FTA-IgM en el de la sífilis neonatal.

El segundo aspecto son las limitaciones metodológicas. Cuando la concentración de IgG es muy alta, entra en competencia con la IgM, la desplaza y no la deja determinar; por consiguiente, la técnica utilizada para la determinación de IgM va a dar un resultado falso negativo. Al contrario, la presencia del factor reumatoideo, que es positivo en el 90-95% de los neonatos con síndrome TORCH, puede dar resultados falsos positivos.

Los falsos negativos por exceso de IgG o los falsos positivos por presencia de factor reumatoideo se presentan sobre todo en las reacciones de inmunofluorescencia. Se pueden obviar utilizando las pruebas de ELISA y específicamente las de inmunocaptura que son uno de los adelantos más importantes en los últimos años en el diagnóstico serológico. La inmunocaptura garantiza, en definitiva, positividad cuando hay IgG en grandes cantidades y, aunque esté presente el factor reumatoideo, no produce falsos positivos.

La técnica de inmunocaptura se puede resumir en los siguientes pasos: sobre el elemento de fase sólida, se coloca una antiinmunoglobulina específica para IgM y, a continuación, se agrega el suero del paciente. Si en él hay anticuerpos de tipo IgM, se van a fijar sobre la pared del pozo, reaccionando con la antiinmunoglobulina. Luego se agrega un antígeno unido a una enzima, específico para el anticuerpo de tipo IgM que se está estudiando. Si hay anticuerpos de tipo IgM unidos a la antiinmunoglobulina, reaccionarán con el antígeno y se formará un complejo IgM-antígeno. Se agrega a continuación el sustrato específico para la enzima y si ésta se ha unido al antígeno y éste a su vez lo ha hecho al anticuerpo, habrá un cambio de color que permite llegar a la con-

clusión de que estamos en presencia de una reacción positiva para anticuerpos de tipo IgM.

Otra técnica de inmunocaptura es aquella que, en vez de utilizar un antígeno específico para la IgM marcado con la enzima, utiliza el antígeno sin marcar y, como conjugado, un anticuerpo específico para el antígeno, unido a la enzima respectiva.

Una tercera modalidad de inmunocaptura es algo más elaborada: en vez de un segundo anticuerpo, utiliza una cadena de anticuerpos que permiten amplificar la reacción, en tal forma que cuando los niveles de inmunoglobulina son muy pequeños, este procedimiento visualiza la reacción.

Veamos cuál es la sensibilidad de las diferentes técnicas utilizadas en la actualidad para la detección de IgM en pacientes con síndrome TORCH: la inmunofluorescencia sólo alcanza sensibilidades de un 30-40%; la ELISA de tipo sánduche o emparejado alcanza un 65%. La ELISA inmunocaptura es la de mayor sensibilidad, hasta un 90%.

Respecto a la sensibilidad de la inmunocaptura en el diagnóstico de infecciones postnatales, se tiene el caso de la toxoplasmosis en la que puede llegar a un 97% cuando la determinación se hace desde el momento de la infección hasta cuatro meses posteriores a ella. En la rubeola se hace el diagnóstico en el 100% de los casos, cuando la determinación se realiza entre los 4 días desde el inicio de la sintomatología y los 28 subsiguientes; en general, la IgM se puede detectar en la sangre, hasta en un 25% de los pacientes, aún después de 9 meses de la infección.

Existen estuches comerciales que permiten realizar la inmunocaptura para cada uno de los agentes del síndrome TORCH. En otros países están disponibles estuches de inmunocaptura para sífilis, pero en Colombia solamente tenemos los pertinentes a *Citomegalovirus*, rubeola y *Toxoplasma*.

Para hacer el diagnóstico del síndrome TORCH tenemos que saber de antemano cuál es la inmunidad materna frente a cada uno de los agentes implicados. Los métodos más empleados en Colombia para la evaluación de la inmunidad materna son: la inmunofluorescencia, muy utilizada para el diagnóstico de la toxoplasmosis, y las técnicas de ELISA para detección de IgG para el estudio del estado de inmunidad frente a rubeola o *Toxoplasma*.

Por estudios realizados en nuestro medio sabemos que el 90% de las mujeres que llegan al embarazo ya han estado expuestas al virus de la rubeola de modo que sólo un 10% no tienen inmunidad fren-

te a este microorganismo. En lo referente a la toxoplasmosis alrededor de un 50% ya han estado expuestas al agente y han adquirido, por consiguiente, inmunidad.

Los resultados de las pruebas serológicas para detección del estado de inmunidad de las mujeres gestantes, se pueden dar en diluciones o en unidades internacionales. En rubeola podemos decir que 15 ó más unidades internacionales son indicativas de inmunidad y en el caso de la toxoplasmosis resultados de 30 ó más unidades tienen ese significado.

Aquellas madres que no tienen niveles detectables de IgG contra *Toxoplasma* o contra rubeola son las que ameritan un seguimiento durante el embarazo; para realizarlo aconsejamos las técnicas de IgM inmunocaptura, que dan resultados rápidos, confiables y de altas sensibilidad y especificidad. No recomendamos utilizar para ello la determinación de IgG, porque sólo permite llegar al diagnóstico por el seguimiento serológico, ni otras técnicas de IgM como las que utilizan los métodos del sánduche o emparejado, porque su falta de sensibilidad o especificidad no garantiza un informe confiable.

El diagnóstico del síndrome TORCH se puede hacer no sólo en el momento del parto o con el seguimiento del niño en su etapa postnatal sino, aún, en la fase intrauterina. Para esto se utiliza, desde la semana 20 ó 24 de gestación, la punción de la vena umbilical, guiada por ultrasonido, con el fin de obtener muestras de sangre en cantidad suficiente para el aislamiento del agente o para técnicas serológicas. Las determinaciones se pueden hacer igualmente en el líquido amniótico. Los aislamientos más frecuentes se obtienen de sangre fetal hasta en un 100% de los niños infectados con *Toxoplasma gondii*. El resultado puede disminuir a un 80% cuando la muestra es líquido amniótico. Las serologías son muy confiables en sangre fetal; en cambio en el líquido amniótico los resultados generalmente son negativos; por consiguiente, se aconseja que si se va a hacer una pesquisa a nivel fetal, la muestra para el análisis serológico sea la sangre y no el líquido amniótico. Utilizando la primera, si la técnica de detección de IgM es de tipo emparejado la sensibilidad sólo llega a un 45 %; en cambio cuando se sigue la técnica de captura, aumenta al 90%. No es confiable la determinación de IgG porque la cantidad que se produce es mínima o porque hay mezcla con la sangre materna.

En la evaluación del niño con sospecha diagnóstica de síndrome TORCH, bien sea sintomático o asintomático, se deben cumplir los siguientes pasos: sangrar la madre; si da un resultado negativo sangrar al niño inmediatamente, en el momento del parto; en cambio, si el resultado es positivo para IgM, esperar unos 7 días antes de sangrar al niño; se aconseja esta espera porque, aunque no es frecuente, puede haber una mezcla de sangre de la madre con la del niño, por transfusión materno fetal, y dar resultados positivos. Si se sangra a los 7 días no tiene por qué haber niveles de IgM dado que su vida media es muy corta. Enfatizo que la determinación de la IgM, sea en la sangre de la madre o en la del niño, se debe hacer por la técnica de inmunocaptura que permite lograr resultados muy confiables dadas su sensibilidad y especificidad.

Desde 1982 se viene publicando una serie de investigaciones sobre la utilidad de la detección de IgA específica como marcador de infección de fase aguda de mayores sensibilidad y especificidad que la misma IgM. Estos trabajos han demostrado la fidelidad diagnóstica de dicha determinación usando el método de inmunocaptura en casos de toxoplasmosis, rubeola, infecciones herpéticas y por clamidias. No están comercialmente disponibles en la actualidad estuches de inmunocaptura para IgA específica pero, una vez existan, representarán un avance de importancia en el manejo de las enfermedades anotadas y de otras cuyo diagnóstico resulta complejo con los métodos actualmente disponibles.

Por último, esta serie de determinaciones no se debe realizar en forma indiscriminada ya que la evaluación completa, con los costos actuales del laboratorio clínico, incluyendo las 5 entidades, es de \$ 25.000,00 para el estudio de la madre y otro tanto para el del niño. Por consiguiente, se tiene que hacer un análisis muy cuidadoso y recordar que uno de los parámetros para seguir esta serie de evaluaciones onerosas, es la determinación en la sangre del niño de los niveles de IgM total.

SUMMARY CONSIDERATIONS ABOUT THE IMMUNOLOGIC DIAGNOSIS OF TORCH SYNDROME

The epidemiology of *TORCH* syndrome in Colombia is briefly reviewed, the methods available for the immunologic diagnosis of the different entities are listed and the *ELISA* is described in detail. Emphasis is put on the importance of detecting specific IgM by the *IMMUNOCAPTURE* technique, as a marker for acute infection; the concept of the detection of a specific IgA (by the same method) as a marker for acute infection but with greater specificity and sensitivity than IgM, is introduced.

BIBLIOGRAFIA

1. REY H. El recién nacido latinoamericano. Hospital Universitario del Valle. Cali, Colombia. Primera edición, 1986.
2. LEAL F, JACQUES G, SANDOVAL C, et al. Estado de la inmunidad específica frente al síndrome TORCH en gestantes colombianas y determinación de población de riesgo. Laboratorio de Inmunología. Hospital Infantil Universitario Lorencita Villegas de Santos. Bogotá, 1983.
3. KURSTAK E, TIJSEN P, KURSTAK C, MORISSET R. Enzyme immunoassays and related procedures in diagnostic medical virology. *Bull WHO* 1986; 64: 465-479.
4. CARDONA N, GAVIRIA M, URIBE G, JARAMILLO C, RAMIREZ R. Anticuerpos contra los agentes del síndrome TORCH en un grupo de gestantes. *Boletín Epidemiológico de Antioquia* 1987; 12: 183-186.
5. DECOSTER A, CARON A, DARCY F, CAPRON A. IgA antibodies against P 30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* 1988; 1: 1104-1107.