

TITULO: Seroprevalencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en pacientes con afecciones Oncohematológicas.

TITLE: Seroprevalence of antibody against Toxoplasma gondii in patients with oncohematological diseases

AUTORES:

1. Ing Lic. Dailín Cobos Valdes.
2. Lic. Walter Góngora Amores.
3. Dr. Leonardo Laguna Salvia.
4. Dr. Rolando Sánchez Artigas.

COLABORADORES:

5. DrC Lic. Zuleidis Torres Ponce.
6. Ing. Bladimir Castañeda Comerón.

PAÍS: Cuba

RESUMEN:

Se analiza la reactividad de 23 muestras de suero de pacientes con hemopatías malignas provenientes de la sala de hematología del Hospital Clínico Quirúrgico de Holguín, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, reportándose un 65,2% de seroprevalencia. La Toxoplasmosis es una enfermedad causada por el agente etiológico Toxoplasma gondii, parásito intracelular obligado ampliamente distribuido en todo el mundo y capaz de infectar un gran número de huéspedes, incluida la especie humana. Numerosas han sido las investigaciones sobre la presencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en individuos inmunodeficientes, donde los pacientes con enfermedades oncohematológicas son un grupo representativo dentro de esta población.

PALABRAS CLAVES: TOXOPLASMA GONDII, SEROPREVALENCIA, INMUNODEFICIENCIA, AFECCIONES ONCHEMATOLÓGICAS.

ABSTRACT:

The reactivity of 23 sample of serum of patients with hematological diseases in Lucia Iñiguez Landín Hospital were analyzed by means Indirect Immunoflorescence Technique resulting a 65,2 % of seroprevalence. Toxoplasmosis is an illness caused by the ethiologic agent Toxoplasma gondii, a parasite broadly distributed in the world and able of infecting a great number of guests, included the humans. A great number of researchers about the seroprevalence of antibody against Toxoplasma gondii in immunodepresses peoples were written and the patients with hematological diseases are an important group inside this population.

KEY WORDS: TOXOPLASMA GONDII, SEROPREVALENCE, IMMUNODEFICIENCY, ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES.

INTRODUCCIÓN

Los pacientes con hemopatías malignas presentan un menoscabo de su sistema inmunológico, caracterizado por una inmunodeficiencia celular y/o humoral, asociado en ocasiones a leucopenia con neutropenia severas.

Agravado por el tratamiento con poliquimioterapia y/o Radioterapia a que son sometido acorde a los protocolos de tratamientos actuales los cuales en los últimos años, con el objetivo de lograr mayores tasas de sobrevida libre de eventos se han incluidos nuevas drogas, así como el empleo de dosis más altas de los fármacos quimioterápicos, Transplante de Médula Ósea (TMO) Autólogos y Alogénicos, los cuales traen aparejados mayor inmunosupresión, por lo cuál estos pacientes constituyen huéspedes de alto riesgo frente a las infecciones por virus, bacterias, micoplasma y parásitos, constituyendo la Toxoplasmosis una infección oportunista grave. La infección aguda en dichos pacientes suele ir acompañada de manifestaciones clínicas extensas y generalizadas y a veces mortales. Puede aparecer fiebre, adenopatías, cefalea, erupción cutánea, hepatoesplenomegalia, neumonía, miocarditis y, especialmente, la alteración del sistema nervioso central con lesiones ocupantes de espacios intracerebrales o meningoencefalitis, cursando con: hemiplejía, hemiparesia, síndrome cerebeloso, ataxia, desorientación y confusión (Martínez, 1998). El sistema inmunitario controla la infección por *Toxoplasma gondii*, produciendo quistes, que persisten de por vida en los tejidos del sujeto infectado, con especial predilección por el cerebro, corazón y músculo (Robinson, 1995). Este parásito intracelular obligado invade el citoplasma de cualquier célula nucleada y se multiplica asexualmente dentro de ella, provocando reactivaciones frecuentes en pacientes inmunocomprometidos después de una infección previa, provocando complicaciones severas e incluso la muerte del paciente. El diagnóstico clínico es difícil de establecer, dada la ausencia o diversidad de sintomatología, por lo que el diagnóstico específico se fundamenta en la investigación de la inmunidad humoral y en la detección del parásito (Martínez, 1998).

Después de la infección, aparecen en primer lugar anticuerpos específicos contra la membrana del parásito y posteriormente contra los constituyentes citoplasmáticos del mismo. Las primeras inmunoglobulinas son de tipo IgM e IgA que alcanzan el nivel máximo en tres a cuatro semanas, desapareciendo normalmente a los tres o cuatro meses. No obstante, tanto la IgM como la IgA pueden permanecer durante largo tiempo, incluso años (Patel, 1993; Rodríguez, 1996), por lo que la detección individual de cada uno de estos anticuerpos no puede ser utilizada como único marcador de infección activa, aunque sirve como importante apoyo en el diagnóstico. Los anticuerpos de tipo IgG alcanzan su máximo hacia el tercer mes, disminuyendo lentamente hasta alcanzar un nivel que permanece en sangre durante toda la vida (inmunidad permanente) (Martín, 1998).

De las técnicas desarrolladas para el diagnóstico serológico, se sigue considerando como técnica de referencia el dye-test, (Sabin, 1948), por su especificidad y sensibilidad, pero dada la dificultad y el riesgo de trabajar con el parásito vivo, sólo se realiza en centros especializados.

Las pruebas más utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), cuya curva de evolución de la IgG es muy similar a la obtenida en el dye- test, y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), que son cualitativas y cuantitativas.

Teniendo presente las características inmunológicas de los pacientes con hemopatías malignas y la terapéutica a la cual son sometidos, consideramos de interés realizar una investigación para determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-Toxoplasma gondii en pacientes con enfermedades oncohematológicas atendidos en el servicio provincial de Hematología de adultos de la provincia de Holguín.

MATERIALES Y METODOS.

Se realizó un estudio descriptivo donde el universo de la investigación estuvo representado por 23 pacientes con diagnóstico de Leucemias Agudas no Linfoblásticas (LANL), Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Mieloma Múltiple (MM), Linfoma no Hodgkin (LNH) y Enfermedad de Hodgkin (LH), con seguimiento en el servicio de Hematología del Hospital Clínico Quirúrgico Lucía Iñiguez Landín, a los cuales como parte de la metodología investigativa, se le extrajo una muestra de sangre venosa previo consentimiento informado del paciente, para la determinación de anticuerpos específicos IgG anti-*Toxoplasma gondii*, al debut de la enfermedad.

Técnica serológica empleada

Para el procesamiento de las muestras se utilizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). En láminas de 10 pocillos fueron fijados 1x 10⁶ taquizoitos de la cepa RH obtenidos a partir de un cultivo en células vero, contados en cámara de Neubauer, fue colocado 10ul de cada una de las diluciones de las muestras en su respectivo orden, partiendo de una dilución de la muestra de 1/16, la que se realizó en Cloruro de sodio al 0,9%. Se realiza una primera incubación en cámara húmeda por 30 minutos a 370 C. Se realizaron posteriormente 2 lavados de 10 minutos con PBS 1X y se secó a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta. El conjugado Anti-IgG, producido en el Centro de Inmunología y Biopreparados, en dilución de trabajo 1/20 con Azul de Evans previamente diluido con PBS al 1X según estandarización establecida en el laboratorio, fue depositado 10ul en cada pocillo de las láminas, las láminas fueron incubadas durante 30 minutos a 37 0C, se lavaron nuevamente en dos ocasiones durante 10 minutos con PBS al 1X. Fueron secadas a temperatura ambiente, luego se le adicionó glicerol al 1% en PBS 1X y le fue colocada a cada lámina un cubreobjetos. Las láminas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia marca Olympus, y observada con objetivo 40X.

Esta técnica empleada en el trabajo Cox R y colaboradores (Cox, 1998) se adaptó a las condiciones del laboratorio de Investigaciones y Desarrollo.

Reactivo Comercial empleado

Se utilizó el conjugado anti IgG-FITC de la firma comercial Sigma

Controles positivos y negativos empleados:

Se emplearon como controles negativos (pool de sueros certificados) y como controles positivos (pool de sueros certificados con título 1:16).

Paquete estadístico

Se empleó el paquete estadístico SPSS versión 11.1

RESULTADOS DEL TRABAJO

Las negativas consecuencias de la Toxoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo en este grupo a los pacientes con afecciones oncohematológicas, en especial aquellos tributarios de un tratamiento con quimioterapia mieloablativa o intensiva, o con criterios de realización de TMO, enfatizan la necesidad de detectar esta infección oportunista para establecer medidas terapéuticas encaminadas a evitar la fase aguda y las complicaciones propias de la misma, que complican la evolución del paciente y en ocasiones con llevan al traste con la vida del mismo.

Como parte de nuestra investigación, antes de iniciar el análisis de las muestras, nos planteamos como hipótesis alternativa que tendríamos un porcentaje de seroprevalencia mayor que 50. Esto se demostró empleando la prueba estadística T para una muestra con un 95% de confiabilidad del paquete estadístico SPSS (Ver anexo 1).

De las 23 muestras de pacientes estudiados, se obtuvieron 15 muestras positivas para un 65.2% de seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-Toxoplasma gondii, lo cuál evidencia tasas elevadas de prevalencias de esta parasitosis en nuestra muestra de estudio, resultados similares fueron reportados en Turquía por Güleşçi, 2005, donde se reporta un 67.5 % de seropositividad en pacientes con afecciones oncohematológicas, empleándose la misma técnica de diagnostico, a pesar de existir diferencias en cuanto a situación geográfica y hábitos alimentarios, lo cual evidencia que el factor más predisponente para la infección y desarrollo de la enfermedad es la inmunodeficiencia, características que comparten ambos grupos de estudios.

En el anexo 2 se desglosa la cantidad de muestras positivas y negativas de las diferentes afecciones oncohematológicas analizadas.

Los resultados obtenidos (ver anexo 3) demuestran la importancia de la infección por *Toxoplasma gondii* en este grupo de riesgo, específicamente en el curso y tratamiento de estas afecciones por el deterioro de la respuesta inmune celular, factor clave contra la invasión parasitaria de *Toxoplasma gondii*, caracterizada por la actividad de linfocitos T CD4+ y CD8+.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un porcentaje de seroprevalencia de Ac IgG anti-Toxoplasma gondii de 65.2.
- El porcentaje de seroprevalencia de este estudio resultó ser similar al del estudio realizado en Turquía por Güleşçi E and Otkun MT.

RECOMENDACIONES

- Ampliar la muestra de estudio para obtener un análisis más representativo.
- Incluir una batería de pruebas estadísticas para lograr un estudio más profundo de seroprevalencia de Ac IgG anti- Toxoplasma gondii en pacientes con afecciones oncohematológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cox Iraola, Raymundo. Montaje de la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta. La Habana; Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 1998. 3 h. (Protocolo)
2. Güleşçi, E. Investigation of anti-Toxoplasma antibodies in patients with hematological malignancy. **Turkiye Parazitol Derg** (Turkish) 29(2): 85-88, 2005.
3. Martínez, A.R. Toxoplasmosis. **Medicine** (España) 7(81): 3760-3766, 1998.
4. Patel, B. Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. **Journal Medical Microbiology** (Scotland) 38: 286-292, 1993.
5. Robinson, R.D. Parasitic infections associated with HIV-AIDS in the Caribbean. **Bulletin of the PanAmerican Health Organization** (Washington) 29: 129-137, 1995.
6. Rodríguez, C. R. Toxoplasmosis en el embarazo: nuevas técnicas diagnósticas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** (España) 14: 145-149, 1996.
7. Sabin, A.B. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoal parasite. **Science** (Estados Unidos) 108: 660-663, 1948.

ANEXOS

Anexo 1:

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
presencia de anticuerpos IgG anti-Toxoplasma gondii	6,423	22	,000	,65	,44	,86

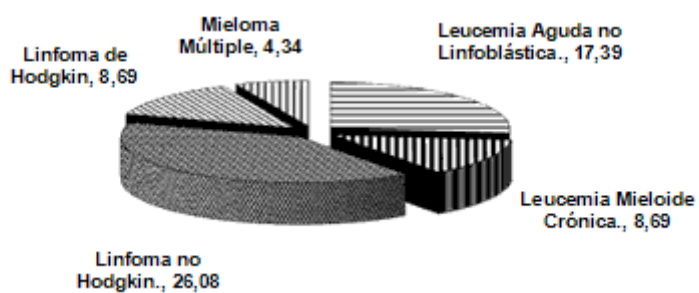
Anexo 2: Representación de los resultados obtenidos

Diagnóstico	Positivo		Negativo		Total	
	No	%	No	%	No	%
Leucemia Aguda no Linfoblástica.	4	17,39	3	13,04	7	30,43
Leucemia Mieloide Crónica.	2	8,69	1	4,34	3	13,04
Linfoma no Hodgkin.	6	26,08	1	4,34	7	30,43
Linfoma de Hodgkin	2	8,69	2	8,69	4	17,39
Mieloma Múltiple	1	4,34	1	4,34	2	8,69
Total	15	65,2	8	34,8	23	100,0

Seroprevalencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en pacientes con afecciones Oncohematológicas.

Anexo 3: Seroprevalencia de Ac IgG anti-Toxoplasma gondii en las afecciones oncohematológicas estudiadas

Seroprevalencia de Ac IgG anti-Toxoplasma gondii en las afecciones oncohematológicas estudiadas



DATOS DE LOS AUTORES

Nombre:

1. Ing Lic. Dailín Cobos Valdes. Lic. Microbiología. Profesor Instructor
2. Lic. Walter Góngora Amores. Lic. Microbiología.
3. Dr. Leonardo Laguna Salvia. Dr. en Medicina, Especialista de Segundo Grado en Hematología, Primer Grado en Medicina Interna.
4. Dr. Rolando Sánchez Artigas. Dr. en Medicina. Especialista de Segundo Grado en Inmunología. Centro de Inmunología y Biopreparados.

COLABORADORES:

5. DrC Lic. Zuleidis Torres Ponce. Lic en Educación Especialidad Biología. Profesor Instructor.
6. Ing. Bladimir Castañeda Comerón. Ing. Químico.

Correo:

1. dailin@cibho.hlg.sld.cu
2. wga@cibho.hlg.sld.cu
3. leonardo@hcq.hlg.sld.cu
4. rolando@cibho.hlg.sld.cu
5. zule@cibho.hlg.sld.cu
6. blad@cibho.hlg.sld.cu

Centro de trabajo:

Centro de Inmunología y Biopreparados. Ave de Los Álamos entre Ave. Lenin y Calle Mariana de La Torre. CP. 80 100. Holguín.

Teléfono: (53) (24) 427663. Fax: (53) (24) 427664.