

**MODIFICACIONS A LA TÈCNICA
D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA APLICADA
AL TOXOPLASMA I RESULTATS**

Comunicació presentada el dia 18 de maig de 1967 per

JOAN MESTRE i ESPINACH

Cap de Laboratori de la Clínica Barraquer. Barcelona.

Sembla interessant de precisar alguns aspectes relacionats amb el diagnòstic serològic de la toxoplasmosi, qüestió que ens ocupa des del primer cas descrit al nostre país per BALLABRIGA i OPENHEIMER l'any 1949.

El *Toxoplasma* es troba arreu de la terra, si exceptuem els països esquimals. El seu reservori és inesgotable, i, per tant, el contagi entre la població és molt gran.

El protozou fou descrit per primera vegada l'any 1908, simultàniament i independentment, per SPLENDORE a São Paulo en el conill, i per NICOLLE i MANCEAUX a Tunís en el Gondii. Aquests darrers autors li posaren el nom de *Toxoplasma* per la seva forma d'arc, i el classificaren en el grup de les Leishmànies. L'any 1923, JANKU descobrí el paràsit a la corioretina d'un nen amb microoftalmia, que morí al cap d'onze mesos per hidrocefalia. El classificà com a esporozou o coccídia. LEVADITTI, cinc anys més tard, en revisar les mateixes preparacions, l'identificà com el *Toxoplasma Gondii* descrit vint anys abans. Les dificultats d'aquesta primera identificació del paràsit en l'home demostren que no és fàcil de caracteritzar el *Toxoplasma* per la seva morfologia en els teixits. També cal remarcar que la primera forma coneguda d'una infecció sigui la forma congènita. Amb aquesta troballa, la fase de les verificacions necropsíquiques que acabarien per confirmar l'existència de la malaltia no feia sinó començar.

El diagnòstic clínic no fou possible fins que es desenrotllaren les tècniques immunològiques. La primera que conserva un interès purament històric fou la prova de neutralització de WARREN i SABIN, i la primera prova de fixació del complement de SABIN i RUCHMAN, fins a arribar a la prova de SABIN i FELDMAN (*Dye test*) l'any 1948. D'aleshores ençà els procediments serològics s'han multiplicat, perquè el *Toxoplasma* en els teixits i per examen directe difícilment es distingeix dels detritus cel·lulars, d'altres protozous o micets o de simples artefactes; cal identificar-lo per les seves propietats biològiques, patogèniques i immunològiques.

Pot adoptar una forma vegetativa o proliferativa i una forma de resistència, quística, segons la situació defensiva de l'hoste. La forma vegetativa és fràgil, de 2,5 a 7 micres de longitud, per 2,5 a 4,5 d'ample. Té forma de croissant allargat, més o menys arquejat, amb un extrem afilat

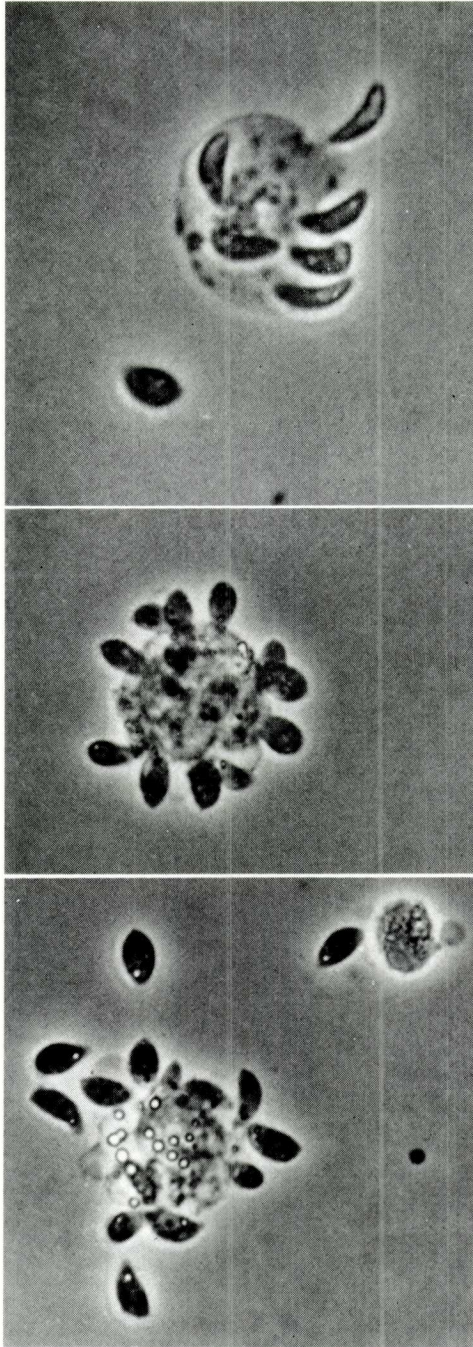
i l'altre arrodonit; també pot mostrar-se ovalat, piriforme o fusiforme. És unicel·lular, gram negatiu, i obligatòriament intracel·lular. Es coloreja bé amb solucions alcalines de blau de metilè, però perd aquesta propietat en presència de sèrums immunes. Precisament aquesta fou l'observació prínceps de SABIN, sobre la qual es fonamenta el *Dye test*. El *Toxoplasma* es multiplica per divisió binària longitudinal endògena (endodiogènia), forma especial d'esquizogonia de la qual resulten solament dos merozoïts.

Al microscopi electrònic hom observa que el *Toxoplasma* és un organisme bastant diferenciat, en el qual hom distingeix, a part el nucli, abundants mitocondries, un reticle endoplàsmic, un aparell de Golgi i diferents grànuls i vacuoles. Està proveït d'una doble membrana cel·lular, llevat a nivell del pol anterior o afilat, on la membrana és senzilla i amb algunes ondulacions. L'extremitat afilada s'anomena conoide, i és l'òrgan de penetració; a la seva base presenta l'anomenat per LUDVIK anell polar, d'on surten els toxonemes, que són de 15 a 18 tubs als quals hom atribueix una funció digestiva i secretòria. L'anell polar és format per la conjunció de les dues membranes cel·lulars i per una capa de petites fibres submembranoses amb capacitat contràctil. La funció de moltes d'aquestes estructures es desconeix, però nosaltres en fem menció per posar de manifest que el *Toxoplasma* és un complex mosaic antigènic que cal conèixer per a comprendre el significat i la correlació entre les diferents reaccions immunològiques, que depenen de la natura i de la qualitat de l'antigen que s'utilitzi, és a dir, de la seva preparació i de la seva puresa.

Interessa, per tant, de comparar les proves més utilitzades, més específiques i sensibles i amb les quals hem treballat. Són la reacció de fixació del complement, la reacció de Sabin i Feldman, l'hemaglutinació i la immunofluorescència.

La *desviació del complement* de Bordet i Gengou ha estat aplicada al *Toxoplasma* per la majoria dels seròlegs especialitzats. Gairebé podríem dir que hi ha tants antigens com seròlegs. L'antigen és una suspensió de toxo plasmes de la soca Rh, procedents del cervell del conill, de la membrana corioalantoïdea de l'embrió de pollet o de l'exsudat peritoneal del ratolí. La suspensió és tractada amb formol, o més sovint s'utilitzen els estromes del paràsit lisat amb aigua amb l'ajuda o sense l'ajuda d'ultrasons, i sotmesos a congelacions repetides. És un antigen soluble amb aigua.

La *reacció de Sabin i Feldman* consisteix en l'aplicació del fenomen de Pfeiffer al *Toxoplasma*. La lisi del paràsit pels anticossos específics és evident, si s'observa directament al microscopi de contrast de fases, o al microscopi normal perquè no s'acolorix amb solucions alcalines de blau de metilè per les quals normalment té molta avidesa. L'antigen és l'exsudat peritoneal del ratolí inoculat 48 hores abans. És un antigen de superfície insoluble, però el líquid ascític pot contenir antigen soluble i pot



FIGS. 1, 2 i 3.
Toxoplasmes vius
sortint de les cèl-
lules de l'exsudat

peritoneal del ra-
toli (J. Mestre,
contrast de fosa
× 1200).

ésser anticomplementari. La prova depèn principalment de l'activitat del factor accessori o complement, però és absolutament específica, i des de la reunió de Roma de l'any 1953 constitueix la prova standard. El títol de la reacció és la més alta dilució de sèrum a la qual el 50 % o més dels toxoplasmes no s'han acolorit o es veuen lisats.

Els inconvenients de la reacció de Sabin i Feldman, com són l'entreteniment d'una soca perillosa i la dificultat a aconseguir un bon factor accessori, entre d'altres, portaren JACOBS i LUNDE, l'any 1957, a aplicar al *Toxoplasma* la reacció d'hemaglutinació de Middlebrook i Dubos, que es basa en el fet que els eritròcits sensibilitzats amb un antigen, s'aglutinen si hi ha presents anticossos específics. La lectura és senzilla. L'antigen pot conservar-se liofilitzat i, per tant, no és perillós; s'obté lisant amb aigua els toxoplasmes de l'exsudat peritoneal del ratolí i per mitjà de congelacions i descongelacions repetides, la qual cosa evoca el seu origen protoplasmàtic. És, doncs, un antigen proteic i soluble amb aigua.

Amb les mateixes intencions que JACOBS i LUNDE i també l'any 1957, GOLDMAN aplica al *Toxoplasma* la immunofluorescència ideada per COONS. Podem distingir dues varietats fonamentals: el «blocking-test» de Goldman i la prova indirecta o «sandwich» de Fletcher (any 1962). En aquesta la fixació dels anticossos presents en el sèrum problema, al toxoplasma, es manifesta a la llum ultraviolada, per mitjà d'un sèrum antiglobulina humana marcat amb una substància fluorescent. En el «blocking-test» el sèrum marcat en comptes d'un sèrum de Coombs és un sèrum antitoxoplasma. Una de les dificultats més importants de la tècnica és la presència de fluorescències inespecífiques que poden ésser degudes a la mateixa natura de l'antigen, espontàniament brillant en alguns casos, o a la utilització d'un sèrum marcat insuficientment purificat.

Per tal de corregir l'autofluorescència de certes preparacions hom ha proposa la utilització de filtres especials. Aquesta solució no és del tot satisfactòria, ja que ofereix possibilitats molt limitades, atès el petit nombre de filtres utilitzables a la pràctica.

A fi de disminuir la inespecificitat del conjugat hom ha procurat de purificar al màxim el sèrum marcat —sigui per diàlisi, per cromatografia amb gel de dextrà o per adsorció—. D'altra banda, el sèrum de Coombs ha de tenir un títol molt elevat, car s'utilitza molt diluït.

Per aquestes raons nosaltres hem assajat un sistema emprat per GOLDMAN en l'amebíasi, i NICHOLS i MACCOMB en el tracoma. Consisteix a practicar, després de la fixació del sèrum de Coombs, una contracoloració amb una solució de blau d'Evans a l'1 per 10 000 durant 10 minuts. Els resultats amb la contracoloració són extremament nets, car s'eliminen totes les fluorescències inespecífiques. En les reaccions positives els toxoplasmes presenten a la perifèria una clara fluorescència groc-verdosa, i la part cen-

tral, més rogenca i fosca. En les reaccions negatives els protozous, com els leucòcits i d'altres cèl·lules de l'exsudat es manifesten uniformement acolorits d'un roig fosc.

La tècnica indirecta així modificada és molt sensible i substitueix satisfactòriament el *Dye test* de Sabin i Feldman, car els resultats amb les dues proves són concordants.

Es tracta d'un antigen de superfície, insoluble a l'aigua, resistent a l'acetona o al metanol que s'utilitza per a fixar; està completament desposseït del líquid ascític del ratolí que pot contenir antigen soluble.

Resumint, en la reacció de Sabin i Feldman i en la immunofluorescència l'antigen és de superfície o membrana, insoluble amb aigua. Ambdues proves són més específiques i sensibles que les que utilitzen antigens solubles amb aigua i rics en substàncies proteiques intracel·lulars com són la desviació del complement i l'hemaglutinació.

D'altra banda, els anticossos detectats amb el *Dye test* o la immunofluorescència apareixen cap al final de la segona setmana de la malaltia o infecció, mentre que els detectats per la desviació del complement o l'hemaglutinació ho fan una setmana més tard, possiblement perquè l'antigen proteic procedent del soma dels toxoplasmes no apareix en l'hoste en quantitat convenient per a estimular la formació d'anticossos fins que el nombre de toxoplasmes lisats és quantitativament important. Per últim, el fet que els títols obtinguts amb les proves d'immunofluorescència i de Sabin i Feldman siguin per un mateix sèrum, més alts que els obtinguts amb altres proves fa que constitueixin les tècniques d'elecció.

Totes les modificacions de les tècniques de preparació d'antígens, orientades a aconseguir un augment de la sensibilitat de les reaccions, com, per exemple, les modificacions de DESMONTS a la D. del C., i les d'ENGELBREICHT a l'hemaglutinació, van acompanyades d'una pèrdua important d'especificitat.

Per a nosaltres, algunes recaigudes serològiques o cicatrius serològiques, i moltes discrepàncies entre diferents tècniques aplicades al mateix sèrum, no són sinó la conseqüència d'utilitzar antigens impurs, poc controlats o defectuosos, és a dir, hi ha ocasions en què les diferències no són en els sèrums, sinó en les tècniques.

Una qüestió interessant és el significat dels títols. Quan els resultats són negatius, o quan són positius a títols alts (iguals o superiors a $1/1024$) la interpretació no ofereix problemes, però quan el títol és relativament baix i pot tractar-se d'un focus toxoplàsmic molt aïllat o delimitat o d'un focus secundari, la interpretació es fa més difícil. Afortunadament aquestes situacions no són les més corrents. Naturalment, el significat d'un títol també depèn del moment que es faci la determinació. Un títol baix, per exemple a $1/64$ o a $1/256$, pot ésser un títol residual sense relació amb

el procés actual del pacient, o pot ésser un títol que augmenta per tractar-se d'una infecció recent. Per a interpretar un títol, doncs, no solament són indispensables les dades clíniques, sinó que de vegades cal repetir la titulació al cap d'uns quants dies per observar la possible variació del resultat, perquè, atesa la prolongada persistència dels anticossos en el sèrum, una determinació única no és suficient per a informar-nos sobre l'activitat o l'antiguitat de la infecció.

D'altra banda, el títol i el temps necessari per a arribar a l'acmè de la corba d'anticossos és independent de la gravetat del procés, i també varia segons la virulència de la soca, lloc i quantitat de la inoculació i segons la resposta de l'hoste. Nosaltres hem observat els títols més alts en les formes ganglionars i hepàtiques.

Per últim, unes dades estadístiques de la nostra casuística. En el nostre ambient, entre la població de trenta anys la infestació és del 80 %. La incidència de la infecció té dos màxims: un a la primera infància, i l'altre, dels 15 als 30 anys, és a dir, l'època que la dona esdevé mare.

Hom distingeix una forma de toxoplasmosi congènita, és a dir, adquirida pel fetus abans del naixement, i una forma pròpiament adquirida. Segons DESMONTS, un 8^o/₁₀₀ de les dones adquireixen la toxoplasmosi durant l'embaràs, i en la meitat dels casos la transmeten al fill. Sortosament, la majoria dels nou nats presenten formes inaparents o benignes. La més sovint diagnosticada és la coriorretinitis, i és quasi patognomònic el focus en roseta paramacular, d'uveïtis granulomatosa descrit per FRANÇOIS.

De les formes adquirides, la ganglionar afectant un sol gangli o grup ganglionar (en general cervicals) és la més freqüent. Té també interès l'endometritis toxoplàsmica pel fet d'ésser causa freqüent d'avortaments repetits i de naixements prematurs.