

VALORES REFERENCIALES DE ANTIESTREPTOLISINA O EN ESTUDIANTES DE 10 A 15 AÑOS DEL MUNICIPIO "FRANCISCO LINARES ALCÁNTARA". ESTADO ARAGUA, VENEZUELA.

Clara Nancy Gutiérrez G.¹, Nurys Alejandra Guzmán H.², Yuccely Andreína González M.³, Juan Luis-León¹, Luis Manuel Pérez-Ybarra⁴, María Zoiret Chacón H.¹

ANTISTREPTOLYSIN O REFERENCE VALUES IN STUDENTS OF 10 TO 15 YEARS OF THE MUNICIPALITY "FRANCISCO LINARES ALCANTARA", ARAGUA STATE, VENEZUELA.

ABSTRACT

The most useful for evidence of streptococcal infection of group A beta hemolytic serological response is the determination of antistreptolysin O (ASO). Strep throat is most common infection caused by these organisms, which can lead to non-suppurative complications such as acute rheumatic fever and glomerulonephritis. These complications can be prevented by proper diagnosis and treatment. For determination of ASO in Venezuela imported reagents are used whose reference values have been established in different populations and latitudes; so the aim of this study is to determine the reference values of ASO titles in 203 students aged 10 to 15 years old enrolled in four institutions of the Municipality "Francisco Linares Alcántara", Aragua state, through an investigation of cross-sectional descriptive. Each student a sample of whole blood was collected for determination of ASO titles using neutralization tests and agglutination. The correlation between positive ASO titles were determined by both methods, the sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of the agglutination test was calculated. The results refer to as reference value for the method of neutralization to 250 Todd Units/mL and for technical agglutination 400 International Units/mL. The concordance was weak between the two tests and obtained sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 100%, 60%, 24.2% and 100%, respectively. The disclosure in the health centers in the mentioned municipality of referential values of ASO found in this study is suggested.

KEY WORDS: ASO Title, reference values, normal upper limit.

RESUMEN

La respuesta serológica más útil para evidenciar la infección por estreptococo beta hemolítico del grupo A, es la determinación de antiestreptolisina O (ASTO). La faringitis estreptocócica es la infección más frecuentemente causada por estos microorganismos, que puede conllevar a complicaciones no supurativas como la fiebre reumática aguda y la glomerulonefritis. Dichas complicaciones pueden prevenirse mediante un diagnóstico y tratamiento oportuno. Para la determinación de ASTO en Venezuela se emplean reactivos importados cuyos valores referenciales han sido establecidos en poblaciones y latitudes diferentes a la de nuestro país; por lo que el objetivo del presente estudio es determinar los valores referenciales de ASTO en 203 estudiantes de 10 a 15 años de edad inscritos en cuatro instituciones del Municipio "Francisco Linares Alcántara", estado Aragua, mediante una investigación de tipo descriptivo de corte transversal. De cada estudiante se recolectó una muestra de sangre total para la determinación de ASTO empleando pruebas de neutralización y aglutinación. Se determinó la concordancia entre los títulos positivos de ASTO por ambos métodos; se calculó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la prueba de aglutinación. Los resultados refieren como valor referencial para el método de neutralización hasta 250 Unidades Todd/mL y para la técnica aglutinación hasta 400 Unidades Internacionales/mL. La concordancia fue débil entre ambas pruebas y se obtuvo una sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de 100%, 60%, 24,2% y 100%, respectivamente. Se sugiere la divulgación de los resultados de este estudio en los centros de salud del municipio mencionado.

PALABRAS CLAVE: Título de antiestreptolisina O, valores referenciales, límite superior normal.

INTRODUCCIÓN

La evidencia de una respuesta inmune del huésped frente a una infección faríngea por estreptococo beta hemolítico grupo A (EBHGA) y del grupo C (EBHGC),¹ es el aumento del título de antiestreptolisina O (ASTO).^{2,3} Esta determinación es necesaria para confirmar el diagnóstico de secuelas no supurativas como fiebre reumática aguda.^{4,5} El título de ASTO también es empleado para el diagnóstico de infección reciente y el seguimiento y eficacia del tratamiento.⁶ El título de ASTO varía con la edad, la ubicación geográfica,

Recibido: Enero, 2014 Aprobado: Agosto, 2014

¹Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas "Dr. Carlos Palacios". Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo-Sede Aragua.

²Licenciada en Bioanálisis. INIA-Sanidad Animal-Laboratorio de Bacteriología. ³Licenciada en Bioanálisis. Laboratorio de Calidad y Seguridad Alimentaria. Industrias Kellogg'ss.

⁴Departamento de Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo-Sede Aragua.

Correspondencia: claranancy88@hotmail.com.

condiciones climáticas y el sitio de la infección.^{7,8} Los valores referenciales sugeridos por los fabricantes de las pruebas para determinar los títulos de ASTO son establecidos en la población adulta; por lo que no es raro que los médicos malinterpreten los títulos de ASTO en individuos con edades entre 5 a 15 años, debido a que los anticuerpos antiestreptolisina O se encuentran más elevados en esta grupo etario.^{4,8} Para el diagnóstico de infección por EBHGA es recomendable obtener dos sueros, uno en fase aguda y otro en fase convaleciente; pero a menudo no es posible la obtención de ambos sueros.⁹ Por lo tanto, la obtención de un solo espécimen de suero requiere ser comparado con un valor de referencia predeterminado en una zona geográfica determinada.⁹

En Venezuela no existen valores referenciales de ASTO propios de la región y se utilizan los que recomiendan los kits comerciales. Por estas razones, en la presente investigación se planteó la determinación de valores referenciales de ASTO en estudiantes del grupo etario de 10 a 15 años del Municipio "Francisco Linares Alcántara" del estado Aragua por los métodos de neutralización y aglutinación pasiva (indirecta).

MATERIALES Y MÉTODOS

La población en estudio estuvo constituida por 906 estudiantes inscritos en cuatro instituciones, dos públicas y dos privadas del Municipio "Francisco Linares Alcántara" del estado Aragua. Para la determinación de los niveles de referencias en pacientes sanos, se siguió el procedimiento establecido en el protocolo C28 A3 del "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI),¹⁰ el cual establece que dicha determinación se debe realizar con base a una muestra de al menos 120 individuos para tener un intervalo de confianza de 90%; en ese sentido, en el presente trabajo se incluyeron 203 adolescentes de 10 a 15 años de edad, previniendo la aparición de datos extremos (del inglés: "outliers") que tendrían que ser descartados, y de esta forma se garantizó que el tamaño de muestra fuera igual o mayor a 120 individuos. Se trató que el número de pacientes fuera el mismo según el género; sin embargo, se obtuvo una mayor participación del género femenino.

Se realizó un muestreo no probabilístico de tipo intencional donde la selección de los elementos fue realizada con base a criterios de inclusión, destacando los siguientes: estudiantes con edades comprendidas entre 10 a 15 años, sin síntomas de infección faríngea y

sin tratamiento con antibióticos actual o que no hayan recibido tratamiento con antibióticos en los últimos 15 días. En atención a las normas éticas concordantes con la Declaración de Helsinki de 1964, enmendada en 2008, se solicitó el consentimiento informado a todos los padres y representantes de aquellos estudiantes incluidos en la investigación y se entregó el propósito de la investigación.

Se recolectó sangre total por punción venosa, en tubos sin anticoagulante. Después de retraído el coágulo se separó el suero y se almacenó a -20 °C hasta su uso en las pruebas de neutralización y aglutinación. Para la determinación de los títulos de ASTO por el método de neutralización, se siguió la metodología recomendada en el inserto del kit (Wiener Lab, Rantz y Randall), para lo cual se procedió a realizar distintas diluciones del suero, el cual contiene anticuerpos, éstos en presencia de dosis constantes de estreptolisina O, generó una reacción antígeno-anticuerpo que neutraliza la capacidad hemolítica de la estreptolisina O. Este fenómeno se evidenció por una inhibición de la hemólisis al agregar la suspensión de glóbulos rojos humanos del grupo sanguíneo O al 4%. El título de antiestreptolisina O fue la recíproca de la máxima dilución del suero del paciente, que tuvo la capacidad de neutralizar totalmente la estreptolisina O; el resultado se expresó en Unidades Todd/mL.

Para la prueba de aglutinación, también se utilizó la técnica recomendada en el inserto (Teco Diagnostics, aglutinación pasiva indirecta), cuya reacción se fundamenta en la interacción producida entre la estreptolisina O conjugada a las partículas de látex con las aglutininas correspondientes contenidas en el suero, lo que formó aglutinación, evidenciándose por la presencia de grumos visibles. Cuando la muestra dio positiva en la prueba cualitativa se realizaron diluciones seriadas de la misma 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64 con el buffer correspondiente. Se reportó la mayor dilución que presentó aglutinación. La sensibilidad de la prueba es de 200 Unidades Internacionales/mL, por lo que se multiplicó el inverso del título por la sensibilidad para estimar la concentración relativa.

Para el análisis de los resultado se determinaron los valores referenciales por el método de neutralización y aglutinación mediante el cálculo del percentil 95 para cada una de las pruebas.

Para comparar la concordancia entre los títulos positivos de ASTO por los métodos de neutralización y

aglutinación se calculó el coeficiente k (kappa) de Cohen.¹¹ Para la interpretación del mencionado coeficiente se utilizó la siguiente escala.

Valor de κ	Fuerza de la concordancia
< 0,20	Pobre
0,21- 0,40	Débil
0,41- 0,60	Moderada
0,61- 0,80	Buena
0,81-1,00	Muy buena

La sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica, valores predictivos positivos y negativos para la prueba de aglutinación con respecto a la prueba de oro, (la cual corresponde a la prueba de neutralización) se calcularon a través de una tabla de contingencia 2x2, según procedimientos previamente establecidos.¹² Los cálculos se realizaron utilizando los programas informáticos estadísticos Minitab 14.3, Statistix 8.0 y StatXact 8.0 para Windows.

RESULTADOS

Para determinar los títulos de ASTO por neutralización y aglutinación, entre octubre 2011 a junio 2012, se recolectaron y procesaron 203 muestras de suero procedentes de igual número de adolescentes inscritos en cuatro instituciones, dos públicas y dos privadas, del municipio "Francisco Linares Alcántara" en el estado Aragua. La muestra de estudio estuvo conformada por 122 adolescentes del género femenino y 81 adolescentes

del género masculino. El promedio general de las edades fue de $12 \pm 1,5$ años. La distribución de acuerdo a la edad para el género femenino es la siguiente: 10 años: 13,9 % (n=17); 11 años: 25,4% (n=31); 12 años: 22,1% (n=27); 13 años: 20,5% (n=25); 14 años: 11,5% (n=14); 15 años: 6,6% (n= 8). La distribución según edad de los participantes del género masculino es: 10 años: 22,2% (n=18); 11 años: 16,1% (n=13); 12 años: 27,2 % (n=22); 13 y 14 años: 14,8% (n=12) cada uno; 15 años: 4,9% (n= 4)

La distribución porcentual de los títulos de antiestreptolisina O hallados mediante la prueba de neutralización, reveló (Figura 1) que un total de 196 escolares (96,6 %) de los 203 incluidos en el análisis, presentaron títulos iguales o menores a 250 Unidades Todd/mL. El título citado se corresponde con el percentil 95 y constituye el valor referencial obtenido mediante la aplicación de la prueba mencionada.

Asimismo, en la Figura 2 se representa la distribución porcentual de los títulos de antiestreptolisina O determinados a través de la prueba de aglutinación, en la misma se puede observar que también 96,6% (196 de 203) de los escolares examinados presentaron títulos iguales o menores a 400 UI/mL. Este título se corresponde con el percentil 95 y constituye el valor referencial obtenido mediante la aplicación de esta prueba. Por este método se detectó un resultado falso negativo, ya que al realizar la prueba cualitativa se obtuvo un resultado negativo; sin embargo, a dicho suero se le había detectado previamente un título igual o mayor a 625 Unidades Todd/mL por el método de neutralización. Con base a estos hallazgos se procedió a analizar el suero mediante el procedimiento semicuantitativo de la técnica de aglutinación, realizando diluciones dobles seriadas del mismo, obteniéndose por este procedimiento un título de 1600 UI/mL.

Tabla 1
Concordancia entre la prueba de Neutralización y Aglutinación.

Aglutinación	Neutralización		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	23	72	95
Negativa	0	108	108
Total	23	180	203

Coeficiente de concordancia k de Cohen

$k=0,2537$; $p< 0,0001$; Ic (k) 95% = (0,16150; 0,34584)

En la Tabla 1 se describe la concordancia entre los métodos de neutralización y aglutinación con partículas de látex. Un total de 131 datos resultaron concordantes (64,5%) y 72 (35,4%) discordantes. Los análisis estadísticos realizados mostraron una fuerza de concordancia débil ($k=0,25367$) entre las técnicas empleadas y diferencias estadísticamente significativas entre el número de individuos con títulos positivos detectados mediante la aplicación de ambos procedimientos ($p=0,00000001$; IC 95% = 0,16150 - 0,34584).

Los resultados descritos en la Tabla 1 también permitió el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la prueba de aglutinación con partículas de látex con respecto a la prueba de oro, que en este caso correspondió a la prueba de neutralización. Al aplicar las fórmulas correspondientes se encontró una sensibilidad de 100%, una especificidad de 60% y valores predictivos positivos y negativos de 24,2 y 100%, respectivamente.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación fue la determinación de los valores referenciales de antiestreptolisina O por los métodos de neutralización y aglutinación, debido a que estos valores varían de acuerdo a la localización geográfica, grupo etario de la población estudiada y condiciones climáticas. En este orden de ideas, tenemos que en Venezuela uno de los kits más utilizados por el método de neutralización trae como valor referencial hasta 166 Unidades Todd/mL por lo que un valor de 250 Unidades Todd/mL sería interpretado como elevado; sin embargo, este fue el valor referencial encontrado en esta investigación utilizando la modalidad mencionada. Valor semejante se observa en el estudio realizado por Sethi y cols.,⁸ quienes encontraron en la India para este mismo grupo etario un valor referencial hasta 243 Unidades Todd/mL, mientras que otros investigadores reportan valores referenciales hasta 320 Unidades Todd/mL en estudios realizados en Estados Unidos⁷ y Australia.⁹ Los valores relativamente elevados de ASTO en este grupo etario puede deberse a que los niños presentan faringoamigdalitis a repetición por SBHGA hasta llegar a este grupo de edad.¹⁰ Por otro lado, en un trabajo publicado por Berríos y cols.¹³ en Chile mostraron valores referenciales hasta 127 Unidades Todd/mL para el grupo etario de 10 a 14 años.

En este mismo sentido, la determinación de anticuerpos antiestreptolisina O por el método de aglutinación mostró un valor referencial de hasta 400 Unidades Internacionales/mL, valor que resultaría

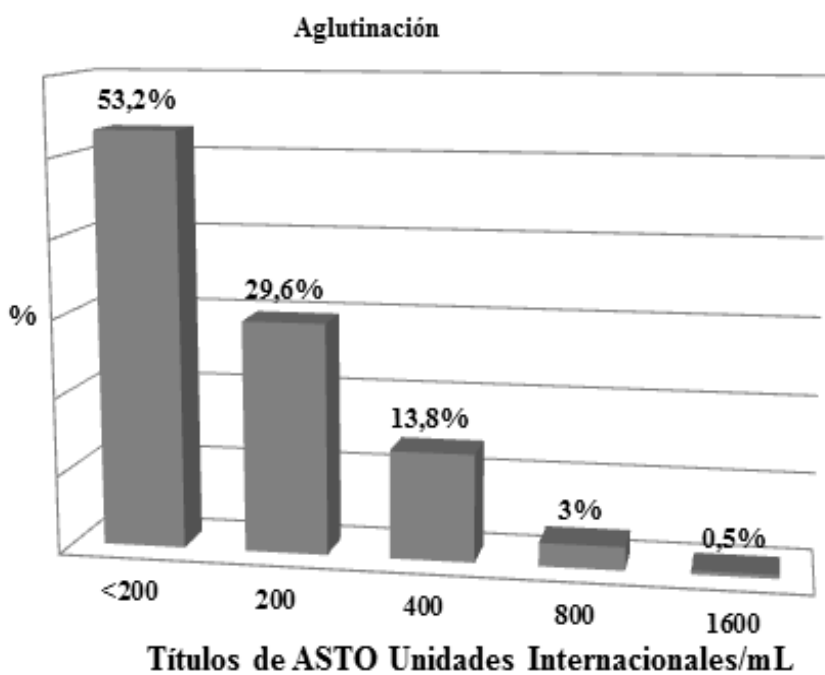
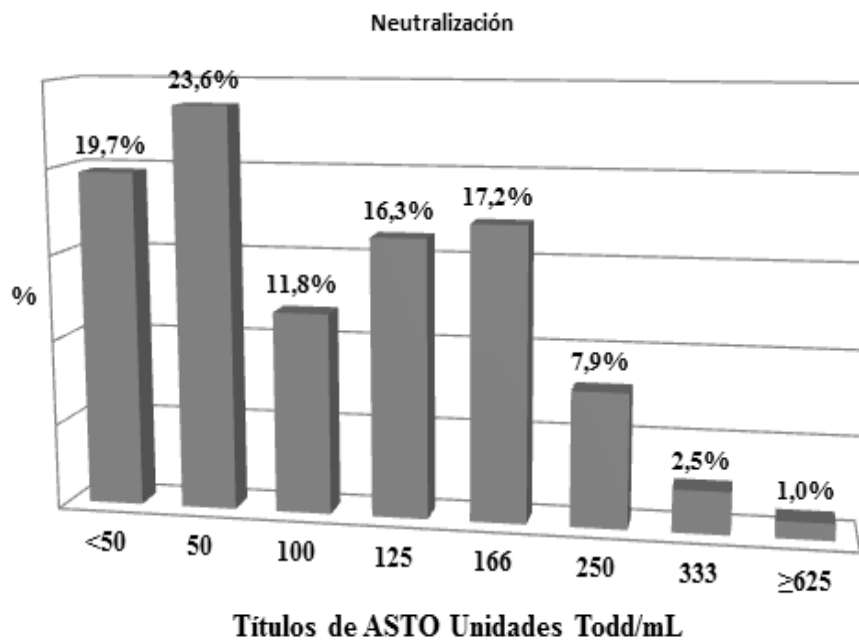
elevado si utilizáramos el valor referencial menor a 200 Unidades Internacionales/mL, recomendado por el kit comercial que se utilizó en esta investigación. Recientemente, en un estudio realizado en Egipto¹⁴ se determinaron los valores referenciales en un grupo de niños sanos y cinco grupos de niños con fiebre reumática y faringitis. El grupo de niños sanos estuvo conformado por 200 individuos de 7 a 12 años y en los mismos se encontraron como valor referencial hasta 400 Unidades Internacionales/mL, coincidiendo este valor con el obtenido en el presente estudio.

En este trabajo se evidenció la desventaja que presenta este método al no detectar los falsos negativos debido a los fenómenos zonales por exceso de anticuerpos, ya que el inserto no advierte al usuario acerca de estos fenómenos, lo que traería como consecuencia reportes no confiables de los resultados, al no diluir los sueros que dieran negativos en la prueba cualitativa.

Otro aspecto importante de esta investigación fue el cálculo de la concordancia entre el método de neutralización y el de aglutinación, el cual dio como índice Kappa de Cohen 0,25367, interpretándose como una concordancia débil entre ambos métodos. Esta concordancia débil se refleja en 72 sueros discordantes al demostrarse como negativos por la técnica de neutralización mientras que por aglutinación resultaron positivos, esto pudo deberse a la presencia de anticuerpos inespecíficos que reaccionan con la estreptolisina O que recubren las partículas de látex, tal como lo afirman Pozo y cols.,¹⁵ quienes también encontraron sueros discordantes positivos por aglutinación y negativos por neutralización. Otro estudio realizado por Ota y cols.,¹⁶ reveló la presencia de anticuerpos inespecíficos al realizar western blot con la estreptolisina O que recubre las partículas de látex, ya que al realizar esta técnica algunos sueros además de reconocer una proteína de 64 kDa específica para la estreptolisina O también reconocieron otras dos proteínas consideradas inespecíficas de la estreptolisina O. Estos investigadores recomiendan mejorar los kits comerciales que utilizan este método.

La estimación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de aglutinación con respecto a la prueba de oro, correspondiente a la técnica de neutralización, estuvo representada por 100% y 60% respectivamente. Es decir, que al evaluar 100 individuos con títulos iguales o mayores a 200 Unidades Internacionales/mL, la prueba de aglutinación tiene la capacidad de detectarlos en su totalidad. Siguiendo el ejemplo, con relación a la

Figura 1
Distribución de títulos de ASTO por el método de Neutralización.



lutinación con partículas de látex.

especificidad, dicha prueba detectará 60 individuos con títulos menores a 200 Unidades Internacionales/mL, mientras, que 40 individuos presentarán títulos falsos positivos. En este mismo orden de ideas, se calcularon los valores predictivos positivos y negativos, obteniendo resultados de 24,2% y 100% respectivamente, lo cual indica que al realizar la prueba de aglutinación y se detecta un título igual o mayor a 200 Unidades Internacionales/mL, hay 24,2% de probabilidad que dicha prueba detecte un verdadero título positivo, siendo conveniente realizar la técnica de neutralización para verificar si en realidad es positivo. Caso contrario al valor predictivo negativo, puesto que este cálculo estima la probabilidad que los títulos menores a 200 Unidades Internacionales/mL, son verdaderos títulos negativos. Por lo tanto, la prueba de aglutinación puede utilizarse en el laboratorio clínico como técnica de tamizaje siempre y cuando todo resultado negativo se diluya 1/2 para evitar reportar falsos negativos por los fenómenos zonales.

La estimación de los valores referenciales en el grupo etario de 10 a 15 años de la presente investigación contribuirá con la correcta interpretación de los resultados de los títulos de antiestreptolisina O en este grupo etario de la población del municipio "Francisco Linares Alcántara" lo cual disminuirá la propagación de la infección a huéspedes susceptibles al tratar apropiadamente a los pacientes que presenten títulos altos y al mismo tiempo reducirá la administración de una terapia antibiótica inadecuada a quienes presenten títulos normales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a los estudiantes y representantes, así como al personal docente de las diferentes instituciones académicas que colaboraron e hicieron posible el desarrollo de esta investigación. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), Proyectos: CDCH-UC N° 2012-003 y PI-M 173-11

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Carpinelli L, Fariña N, Samudio M, Figueredo L, Laspina F, Sanabria R. Frecuencia de serogrupos de estreptococos beta-hemolíticos en hisopados faríngeos de pacientes con faringitis. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud 2008;6:15-19.
- 2) Gerber MA, Caparas LS, Randolph MF. Evaluation of a new latex agglutination test for detection of streptolysin O antibodies. J Clin Microbiol 1990;28(3):413-415.
- 3) Gutiérrez CN, Chacón M., Martínez M, Sibrian B, Márquez Y, Herrera E, et al. Frecuencia de antiestreptolisina O y antidesoxirribonucleasa B como indicador de infección estreptocócica en estudiantes de una unidad educativa del estado Aragua. Rev Soc Ven Microbiol 2010; 30:6-10.
- 4) Pérez C, Borda A, Zuñiga A, Restrepo L. Interpretación clínica de anticuerpos antiestreptococo en fiebre reumática. Rev. Panam Infectol 2008; 10(3):36-42.
- 5) Karmarkar MG, Venugopal V, Joshi L, Kamboj R. Evaluation & revaluation of upper limits of normal values of anti-streptolysin O & anti-deoxyribonuclease B in Mumbai. Indian J Med Res 2004; 119 (Suppl.):26-28.
- 6) Kim S, Lee NY. Asymptomatic infection by Streptococcus pyogenes in schoolchildren and diagnostic usefulness of antideoxyribonuclease B. J Korean Med Sci 2005;20(6): 938-940.
- 7) Kaplan EL, Rothermel CD, Johnson DR. Antistreptolysin O and anti-deoxyribonuclease B titers: normal values for children ages 2 to 12 in the United States. Pediatrics 1998; 101(1 Pt 1):86-88.
- 8) Sethi S, Kaushik K, Mohandas K, Sengupta C, Singh S, Sharma M. Anti-streptolysin O titers in normal healthy children of 5-15 years. Indian Pediatr 2003; 40(11):1068-1071.
- 9) Danchin MH, Carlin JB, Devenish W, Nolan TM, Carapetis JR. New normal ranges of antistreptolysin O and antideoxyribonuclease B titres for Australian children. J Paediatr Child Health 2005;41(11):583-586.
- 10) Geffre A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun J. Reference values: a review. Vet Clin Path 2009;38(3):288-298.
- 11) López I, Pita S. Medidas de concordancia: El índice de Kappa. Atención Primaria 1999; 6:169-173.
- 12) Bellmunt-Montoya S. Validación de pruebas diagnósticas. Angiología 2007; 59: 433-8.
- 13) Berríos X, Herbage S, Rodríguez C, Pierotic M, Moraga V. Anticuerpos antiestreptocócicos, en población general: estudio comparativo en dos períodos en un servicio de salud. Rev Chil Pediatr 1989;60 (6):333-337.
- 14) Kotby A, Habeeb N, Ezz El Elarab S. Antistreptolysin O titer in health and disease: levels and significance. Pediatr Rep 2012; 4(1):25-29.
- 15) Pozo E, Romero T, Ruiz A, Hidalgo R, Quintero S, Vivas C. Métodos de aglutinación con partículas de látex y Rantz-Randall para el diagnóstico de las infecciones estreptocócicas. Kasmera 1999; 27(1):29-39.
- 16) Ota H, Sato A, Matsumoto H, Shimohiro H, Tanimoto A, Kotani K et al. Immunological analysis of pseudo-positive reaction in healthy adults at anti-streptolysin O measurement by latex agglutination method. Rinsho Byori 2005; 53(4):279-283