

LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS EN EL DIAGNOSTICO PRE-NATAL DE MALFORMACIONES CONGENITAS

Auramarina Villalobos de Roldán*, Lía Angarita Avila**

** Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526, Maracaibo. ** Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.*

RESUMEN

Se estudiaron 500 muestras de líquido amniótico, tomadas por amniocentesis trans-abdominal, en mujeres entre 16, 40 y más semanas de gestación, donde se determinó la presencia de alfa 1-fetoproteína (AFP) con la finalidad de ver si su presencia tenía relación con la aparición de alguna malformación en el producto de ese embarazo.

La determinación se hizo mediante la técnica de inmunodifusión (ID) simple y la contrainmunolectroforesis (CIE).

Con ambas pruebas pudimos detectar esta proteína en 20 de las 500 muestras estudiadas, 14 de las cuales se acompañaron de anencefalia, malformación ésta que fué la única detectada en nuestro estudio, los 6 casos restantes no se acompañaron de ninguna malformación, pero en estos últimos se pudo demostrar que la muestra fué obtenida con sangre y pensamos que esta sangre era de origen fetal; de allí que aconsejamos que en toda mues-

tra de líquido sanguinolento, debe investigarse la presencia de eritrocitos fetales.

Una vez más sostenemos que la amniocentesis es una de las indicaciones más importantes en el diagnóstico pre-natal de malformaciones congénitas del SNC y recomendamos la determinación de AFP cada vez que ésta se practique, sobre todo cuando ésta se hace en el segundo trimestre del embarazo.

INTRODUCCION

Hoy día se ha abierto un nuevo campo de investigación de indudable valor al estudiarse las malformaciones congénitas en etapa pre-natal.

En la actualidad se emplean diversas técnicas para el diagnóstico pre-natal de ciertas malformaciones congénitas, pero, la que goza de mayor aceptación es la amniocentesis transabdominal, ya que dicho procedimiento permite el examen del líquido amniótico y de las células que en él se encuentran, cuyo cultivo resulta indispensable para el análisis cromosómico y las determinaciones enzimáticas.

Gracias a la determinación de la alfa I-fetoproteína (AFP) en el líquido amniótico, se han logrado grandes progresos en el diagnóstico pre-natal de ciertas malformaciones congénitas como: atresia esofágica y duodenal, nefrosis congénita y sobre todo de algunas malformaciones del Sistema Nervioso Central (SNC) como: anencefalia, mielomeningocele, espina bífida, hidrocefalia y otras (1-9, 12-19, 21, 22, 23-32).

El paso de la alfa I-fetoproteína (AFP) al líquido amniótico es particularmente importante sobre todo en casos de malformaciones abiertas del Sistema Nervioso Central (SNC); su determinación es de mucha ayuda y quizás constituye un procedimiento rutinario en estos casos; de allí que consideramos que en toda mujer con embarazo considerado como de alto riesgo, a quien se le practique amniocentesis, debe investigarse la presencia de alfa I-fetoproteína (AFP) en el líquido amniótico, sobre todo si ésta es practicada en el segundo trimestre del embarazo, más aún si tomamos en cuenta que la prueba es sumamente sencilla y fácil de realizar y que esta prueba sumada a la amniografía y sonografía podría llevarnos a un diagnóstico definitivo de malformación grave del Sistema Nervioso Central (SNC).

Para la determinación de alfa I-fetoproteína (AFP) en líquido amniótico se han empleado varias pruebas (23-25), pero en la actualidad se cuenta

con una prueba altamente sensible, específica y sencilla de realizar, la cual permite hacer el diagnóstico de malformaciones congénitas en el término de pocas horas o minutos. Esta prueba conocida con el nombre de contra-inmunolectroforesis (CIE), combina la electroforesis con la inmunodifusión y se fundamenta en dos principios: 1) en el desplazamiento del antígeno hacia el ánodo por influencia de la corriente eléctrica y 2) en la movilización del anticuerpo hacia el cátodo por el efecto electroendosmótico; al encontrarse ambos reactivos en la zona intermedia; se producirá una línea de precipitación, la cual es fácilmente visible.

El objeto de este trabajo es el de utilizar la contra-inmunolectroforesis (CIE) en la determinación cualitativa de alfa I-fetoproteína (AFP) a fin de evaluar la utilidad de esta prueba en el diagnóstico de malformaciones congénitas y comparar los resultados obtenidos con los encontrados al hacer la misma determinación mediante la inmunodifusión (ID).

MATERIAL Y METODOS

Se determinó la presencia de AFP en 500 muestras de líquido amniótico, obtenidas de pacientes con edad gestacional comprendida entre 16 y 40 semanas o más. Las pacientes provenían tanto de consulta hospitalaria como de clínicas privadas.

Las muestras fueron obtenidas por amniocentesis transabdominal. Se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm y el sobrenadante claro fué guardado a -20°C hasta el momento de ser procesadas.

La presencia de AFP se determinó mediante la técnica de inmunodifusión, modificada por Hernández y cols (10, 11, 24, 25), utilizando láminas portaobjetos de vidrio recubiertas con 3 ml de agarosa al 1.25% en amortiguador barbital 0,1 M pH: 8.6. La muestra problema se colocó en tres hoyos con capacidad de 5, 30 y 50 μl y a 3 mm de separación entre cada uno de ellos se colocó 5 μl de antisuero comercial (Behring-werkw, AG, K-Batch N° 2942 D) (Fig. 1). Luego las láminas fueron incubadas en cámara húmeda a temperatura ambiente, observándose posteriormente la presencia o no de bandas de precipitación, las cuales aparecen a partir de las 6 horas, hasta las 24-48 horas.

La CIE fué realizada según la técnica utilizada por Kohn (13) a la cual se le hicieron algunas modificaciones. Se utilizaron placas de vidrio de 8 x 8 mm. recubiertas con 15 ml de agarosa al 1.25% en amortiguador barbital 0, 1 M pH: 8.6 a la cual se le perforaron hoyos de 3 mm de se-

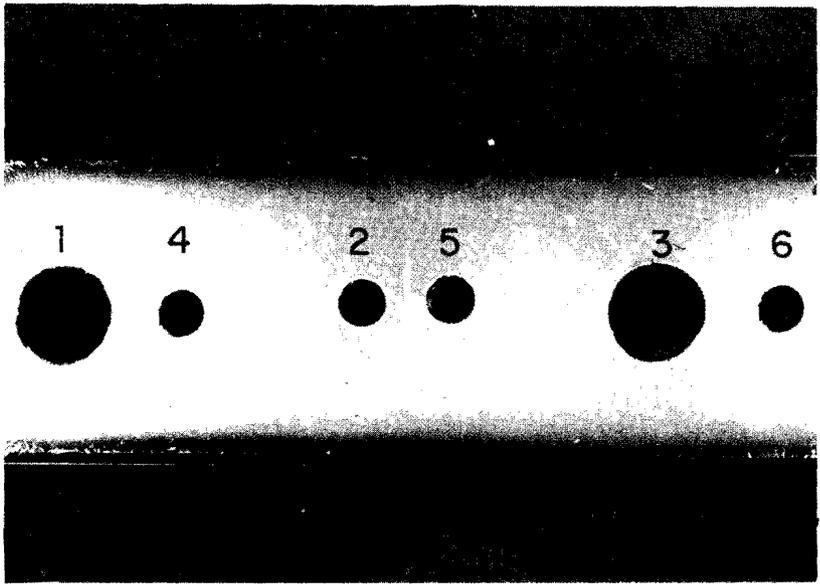


Fig. 1.— Prueba de inmunodifusión simple modificada por Hernández y cols. Los hoyos 1, 2 y 3 corresponden a muestras de líquido amniótico en cantidades de 30, 5 y 50 μ l respectivamente. Los hoyos 4, 5 y 6 corresponden a 5 μ l de antisuero anti alfa I-fetoproteína.

paración uno frente al otro. En el hoyo situado en el polo negativo (cátodo) se colocaron 30 μ l de líquido amniótico y en el polo positivo (ánodo) se colocaron 15 μ l de antisuero comercial (Behringwerke AG, K-Batch N° 2942 D). Las placas fueron luego colocadas sobre el envase de electroforesis cuyos tanques contenían 30 ml de amortiguador barbital 0, 1 M pH: 8.0 conectados a una fuente de poder del equipo Austigen de los Laboratorios Hyland (Laboratorios Baxter, Caracas), para pasar la corriente eléctrica de 40 MA durante 15 a 20 minutos. Después de este tiempo las placas fueron leídas inmediatamente y luego se colocaron en refrigeración durante 10 minutos. Para facilitar la visualización de las bandas de precipitación se utilizó una lupa con iluminación adecuada (Fig. 2).

Todas las muestras fueron montadas por duplicado. Se utilizaron como testigos positivos: AFP comercial (Behringwerke, AG K-Batch N° 11 D) suero de un paciente con hepatoma y suero obtenido de sangre de cordón. Seis de las muestras estudiadas presentaban eritrocitos y sin investigar si éstos eran de origen fetal a todas ellas se les practicó ambas pruebas.

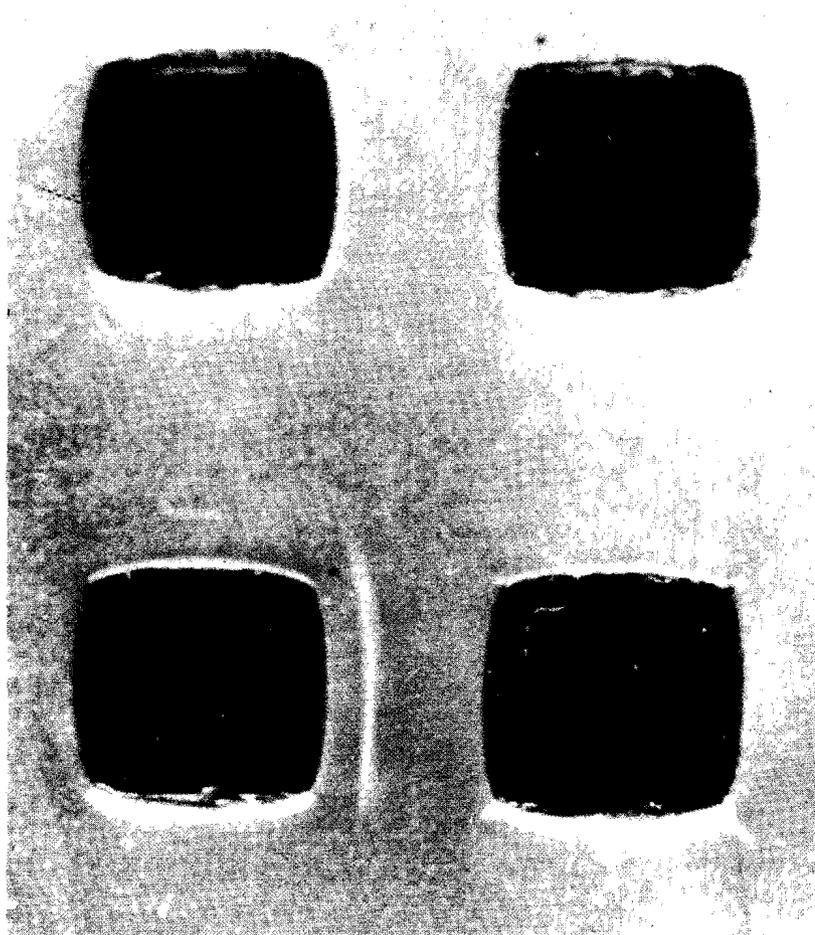


Fig. 2.— Prueba de CIE donde se observa con nitidez la línea de precipitación entre 2 hoyos donde se colocó el líquido amniótico en el polo negativo (cátodo) y el antisuero anti-alfafetropoteína en el polo positivo (ánodo).

RESULTADOS

La agrupación de las muestras estudiadas de acuerdo a los antecedentes obstétricos de la madre se presentan en la Tabla I. Allí podemos observar el número de casos por cada grupo y el porcentaje de los mismos; como podemos observar el grupo más numeroso correspondió al de madres con embarazos anteriores normales.

TABLA I**ANTECEDENTES OBSTETRICOS DE LA MADRE
MARACAIBO 1978-1982**

Grupo	Antecedentes Obstétricos	Número de Casos	Porcentaje
I	Malformaciones del SNC	20	4.00
II	Isoinmunización	10	2.00
III	Embarazo Normal	470	94.00
Total		500	100.00

F de I: Maternidad Castillo Plaza. Maracaibo, 1978-1982.
Clínicas Privadas. Maracaibo, 1978-1982

Para facilitar el análisis de distribución de las muestras procesadas, éstas se agruparon por edad gestacional, lo cual se presenta en la Tabla II. En la misma, se observa el número de muestras estudiadas por edad gestacional; encontrándose el mayor número en los grupos de 36-39 semanas y en el de 40-43, es decir en los grupos que corresponden a un embarazo a término.

TABLA II**MUESTRAS DE LIQUIDO AMNIOTICO SEGUN EDAD GESTACIONAL
MARACAIBO 1978-1982**

Semanas de gestación	Número de muestras	Porcentaje
16 - 19	3	0.60
20 - 23	10	2.00
24 - 27	20	4.00
28 - 31	15	3.00
32 - 35	30	6.00
36 - 39	373	74.60
40 - 43	49	9.80
Total	500	100.00

F de I: Maternidad Castillo Plaza. Maracaibo. 1978-1982.
Clínicas Privadas. Maracaibo. 1978-1982

Al emplear ambas técnicas los hallazgos fueron iguales, lo cual se representa en la Tabla III. En ella observamos el número de muestras positivas encontradas por edad gestacional y su porcentaje; como vemos el mayor número y por lo tanto el mayor porcentaje se observó en los grupos de 40-43 semanas (10 casos) y en el de 20-23 (4 casos) semanas de gestación, siguiéndoles en frecuencia los restantes 16-19, 24-27 y 36-39 con dos casos cada uno de ellos.

TABLA III

**ALFA 1-FETOPROTEINA EN LIQUIDO AMNIOTICO
SEGUN EDAD GESTACIONAL
MARACAIBO 1978-1982**

Semanas de Gestación	Número de Muestras	Pruebas Positivas	Porcentaje
16 - 19	3	2	66.66
20 - 23	10	4	40.00
24 - 27	20	2	10.00
28 - 31	15	—	—
32 - 35	30	—	—
36 - 39	373	2	0.73
40 - 43	49	10	20.40
Total	500	20	4.00

F de I: Maternidad Castillo Plaza. Maracaibo. 1978-1982
Clínicas Privadas. Maracaibo. 1978-1982

En la Tabla IV observamos el número de muestras positivas que no se acompañaron de anencefalia. Como vemos el mayor número de muestras positivas se encontraron en los grupos de 40-43 semanas y en el de 20-23 semanas de gestación, en ambos casos, es decir en los casos que se acompañaron de anencefalia y en aquellos donde la determinación de AFP no se acompañó de ninguna malformación. Por otro lado en aquellos casos en los cuales no se detectó ninguna malformación le siguieron en frecuencia los grupos de 20-23, 16-19 y 36-39 con dos casos cada uno de ellos.

TABLA IV

**POSITIVIDAD DE A.F.P. EN LIQUIDO AMNIOTICO SEGUN EDAD
GESTACIONAL, CON O SIN MALFORMACION
MARACAIBO 1978-1982**

Semanas de Gestación	Pruebas Positivas				Total
	Con anencefalia		Sin anencefalia		
	N° de Casos	Porcentaje	N° de Casos	Porcentaje	
16 - 19	2	14.29	—	—	2
20 - 23	3	21.42	1	16.67	4
24 - 27	1	7.14	1	16.67	2
28 - 31	—	—	—	—	—
32 - 35	—	—	—	—	—
36 - 39	2	14.29	—	—	2
40 - 43	6	42.86	4	66.66	10
Total	14	100.00	6	100.00	20

F de I: Maternidad Castillo Plaza. Maracaibo. 1978-1982.
Clínicas Privadas. Maracaibo. 1978-1982.

DISCUSION

Dado que en trabajos anteriores (24, 25) donde nos abocamos a determinar la presencia de AFP en líquido amniótico utilizando la inmunodifusión con el fin de hacer un diagnóstico pre-natal de ciertas malformaciones del SNC, encontramos un cierto porcentaje de anencefalia, quisimos ver la posibilidad de utilizar una prueba que nos permitiera detectar esta proteína en el menor tiempo posible; de allí que en el presente trabajo utilizamos la CIE utilizada por Kohn (13), pero al mismo tiempo la quisimos comparar con la inmunodifusión modificada por Hernández y cols (10, 11, 24, 25), ya que al variar las proporciones de antígeno y anticuerpo se obtienen mayores posibilidades de detectar bandas de precipitación.

En este trabajo al igual que en los anteriores pudimos detectar la presencia de AFP en 6 de los casos estudiados y los cuales no se acompañaron de malformación fetal; en éstos 6 casos, la muestra de líquido amniótico fué obtenida con sangre y la positividad de ambas pruebas la explicamos por esa razón, ya que pensamos que la sangre contaminante era fetal, ya que muestras posteriores de éstas 6 pacientes, fueron negativas. Dado estos hallazgos aconsejamos que en toda muestra de líquido amniótico sangui-nolenta, debe investigarse la presencia de eritrocitos fetales, ya que se ha

demostrado que solo 1 ml de sangre fetal es capaz de producir cantidades alarmantes de AFP en el líquido amniótico a las 14 semanas y que esta cantidad disminuiría si ésta se mezcla completamente con el líquido amniótico (30). Sin embargo hay otros autores (19) que afirman que la presencia de sangre en el líquido amniótico no tiene influencia significativa en la aparición de AFP en el mismo.

En los 14 casos positivos restantes se recomendó practicar sonografía, demostrándose con esta última, la presencia de anencefalia, por lo que se decidió interrumpir el embarazo. Esto confirma aún más lo observado por Harris y cols (9) y Roldán y cols (24-25) quienes concluyen que, cuando la determinación de AFP, amniografía y ultrasonografía son empleadas para detectar anencefalia y espina bífida, muchos casos pueden ser detectados antes de las 20 semanas de gestación.

En todos los casos de Isoinmunización estudiados, la AFP fué negativa, a pesar de que hay autores (29) que han reportado la presencia de esta proteína en el líquido amniótico.

La utilización de la CIE no aumentó el número de muestras que inicialmente fueron positivas por ID simple, a pesar de que la primera es una prueba mucho más sensible que la segunda; ambas pruebas fueron de mucha ayuda en nuestro estudio, ya que con ellas pudimos detectar y demostrar lo que ya otros autores habían encontrado (1-9, 12-19, 21, 22, 23-32). Además con la CIE pudimos acortar el tiempo necesario para obtener un resultado en todos aquellos casos donde se presume la existencia de alguna de las malformaciones descritas anteriormente; debido a ésto nos permitimos recomendar cualquiera de las dos pruebas para este tipo de investigación.

Dada la importancia de hacer un diagnóstico pre-natal de cualquiera de las malformaciones descritas, donde es posible detectar la AFP, nosotros al igual que Nadler (20) sugerimos que la mejor manera de vigilar los embarazos que presentan riesgos de malformaciones del SNC, consiste en asociar la ultrasonografía y amniocentesis y por ende las determinaciones de la AFP en el líquido amniótico, dosificación que debería ser sistemática al practicarse una amniocentesis sobre todo si ésta se practica en el segundo trimestre del embarazo.

Llegamos a la conclusión de que la determinación de AFP debe hacerse en forma sistemática al practicarse una amniocentesis, sobre todo si ésta se practica en el segundo trimestre del embarazo, y más aún si éste es considerado de alto riesgo. Igualmente recomendamos que toda muestra de líquido amniótico obtenida con sangre, debe descartarse o de lo con-

trario se debe investigar en la misma si los eritrocitos presentes son de origen fetal. Sugerimos que en toda paciente, donde se detecte la AFP en líquido amniótico, debe repetirse la determinación de la misma en una nueva muestra; si ésta resulta positiva, se debe recomendar practicar sonografía y/o amniografía con el fin de confirmar y/o descartar en el producto de ese embarazo alguna de las malformaciones descritas. Finalmente recomendamos cualquiera de las dos pruebas utilizadas en este trabajo para este tipo de investigación.

ABSTRACT

The counter-current electrophoreses in antenatal diagnosis of congenital malformations. Villalobos de R., A. (*Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526, Maracaibo, Venezuela*), Angarita A., L. *Invest Clín* 24(4): 169-181, 1983.— The presence of alpha 1-fetoprotein (AFP), was investigated in 500 samples of amniotic fluid taken by transabdominal amniocenteses in pregnant women between 16 and 43 weeks of gestation, in order to correlate its presence with any central nervous system (CNS) malformations. The immunodiffusion method, was used also the counter-current (cross-over) electrophoreses in agar gel method used. With both tests we could detect this protein in 20 of the 500 samples. Of these 20 cases, 14 presented anencephaly, the only malformations detected in our studies. In the other six cases, no malformations were present but in these cases blood was present in the sample and we think, it was from foetal origen. We recommended that every specimen of amniotic fluid that shows traces of blood should be investigated for the presence of foetal eritrocites. We recommended the amniocenteses for prenatal diagnosis of CNS malformations, and AFP determination every time it is done, mostly if it is taken in the second trimester of pregnancy.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ALLAN L., FERGUSON-SMITH M., DONALD I., SWEET E., GIBSON A.: Amniotic fluid alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of spina bifida. *Lancet* 2: 522-525, 1973.
- 2- BROCK D., SUTTCLIFFE R.: Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* 2: 197-199, 1972.
- 3- BROCK D., SCRIMGEOUS J.: Early prenatal diagnosis of anencephaly. *Lancet* 2: 1252-1253, 1972.

- 4- BROCK D., BOLTON A., MONAGHAN J.: Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum-alpha fetoprotein measurement. *Lancet* 2: 923-924, 1973.
- 5- BROCK D., SCRIMGEOUS J.: Alpha-fetoprotein diagnosis of CNS malformations. *Lancet* 1: 569, 1974.
- 6- CARTER C., ROBERTS J.: The risk of recurrence after two children with central-nervous-system malformations. *Lancet* 1: 306, 1967.
- 7- DE BRUIJN H., HUISJES H.: Onphalocele and raised alpha-fetoprotein in amniotic-fluid. *Lancet* 1: 525-526, 1975.
- 8- FIELD B., MITCHELL G., GARRET W., KERR C.: Amniotic alpha-fetoprotein levels and anencephaly. *Lancet* 2: 798, 1973.
- 9- HARRIS R., JENNISON R., BARSON A., LAURENCE K., ROUSLAHTI E., SEPPALA M.: Comparison of amniotic-fluid and maternal serum-alpha-fetoprotein levels in the early antenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly. *Lancet* 1: 429-433, 1973.
- 10- HERNANDEZ M., ZAPATA R., GUTIERREZ G., KUMATE J.: Determinación de alfa 1-fetoproteína en el curso de niños con amibiasis invasora. En: *Memorias del V Simposium sobre Amibiasis. México, Febrero, 1974.*
- 11- HERNANDEZ M., ROLDAN, A. DE, RODRIGUEZ F., GARCIA F., KUMATE J.: Alfa 1-fetoproteína en el suero de niños con hepatitis viral. En: *Memorias de las Jornadas Nacionales de Microbiología. Mérida, Venezuela, 1978, p. 8.*
- 12- KJESSLER B., JOHANSSON A., SHERMAN M., GUSTAVSON K.: Alpha-fetoprotein in antenatal congenital nephrosis. *Lancet* 2: 432-433, 1975.
- 13- KOHN J.: Method for the detection and identification of alpha fetoprotein in serum. *Tech Meth* 733-735, 1971.
- 14- LAURENCE K., TEW B.: Natural history of spina bifida cystica and cranium bifidum cysticum. *Arch Dis Child* 46: 127-138, 1971.
- 15- LAURENCE K., TURNBULL A., HARRIS R., JENNISON R., ROUSLAHTI E., SEPPALA M.: Antenatal diagnosis of spina bifida. *Lancet* 2: 860, 1973.
- 16- LORBER J., STEWARD C., WARD A.: Alpha-fetoprotein in antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* 1: 1187, 1973.

- 17- MACRI J., WEISS R., JOSHI M.: Antenatal diagnosis of neural tube defects using cerebrospinal fluid protein. *Lancet* 1: 14-15, 1974.
- 18- MACRI J., WEISS R., JOSHI M.: β -trace protein and neural tube defects. *Lancet* 1: 1109-1010, 1974.
- 19- MILUNSKI A., ALPERT E.: The value of alpha-fetoprotein in the prenatal diagnosis of neural tube defects. *J Pediat* 84: 889-893, 1974.
- 20- NADLER H.: Diagnóstico pre-natal de las enfermedades hereditarias. *Consulta* 1: 9-17, 1977.
- 21- NEVIN N., NESBITT S., THOMPSON W.: Myelocele and alpha-fetoprotein in amniotic fluid. *Lancet* 1: 1383, 1973.
- 22- PUDIE D., HOWIE P., EDGAR W., et al.: Raised amniotic fluid FDP in fetal neural tube anomalies. *Lancet* 1: 1013, 1975.
- 23- PURVES L., GODDES E.: A more sensitive test for alpha-feto-protein. *Lancet* 1: 47, 1972.
- 24- ROLDAN A DE, ANGARITA L., GONZALEZ F.: Alfa 1-fetoproteína en el diagnóstico pre-natal de malformaciones congénitas. *Invest Clín* 19(1): 2-23, 1978.
- 25- ROLDAN A DE, ANGARITA L.: Anencefalia. Diagnóstico pre-natal. *Invest Clín* 19(2): 49-61, 1978.
- 26- SELLER M., CAMPBELL S., COLTART T., SINGER J.: Early termination of anencephalic pregnancy after detection by raised alpha-fetoprotein levels. *Lancet* 2: 73, 1973.
- 27- SELLER M., SINGER J., COLTART T., CAMPBELL S.: Maternal serum alpha-fetoprotein levels and prenatal diagnosis of neural tube defects. *Lancet* 1: 428-429, 1974.
- 28- SEPPALA M.: Increased alpha-fetoprotein in amniotic fluid associated with congenital esophageal atresia. *Obstet Gynecol* 42: 613-624, 1973.
- 29- SEPPALA M., RUOSLHTI E.: Alpha-fetoprotein: Physiology and pathology during pregnancy and application to antenatal diagnosis. *J Perinat Med* 1: 104, 1973.
- 30- WARD A., STEWARD C.: False positive results in antenatal diagnosis of neural tube disorders. *Lancet* 2: 345-346, 1974.

- 31- WEIMBERG A., MILUNSKY A., HARROD M.: Elevated amniotic fluid alpha-fetoprotein and duodenal atresia. *Lancet* 13: 496, 1975.
 - 32- WEISS R., JAMES G., MACRI N., ELLIGERS K., PRINCLER G., McINTIRE R., WALDMAN T.: Amniotic fluid alpha-fetoprotein as a marker in pre-natal diagnosis of neural tube defects. *Obst Gynecol* 47: 148-150, 1976.
-