

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE INFECCION AGUDA Y CRONICA
POR *Toxoplasma gondii* EN GRUPOS DE RIESGO POR
MEDIO DE UN ENSAYO DE AVIDEZ DE ANTICUERPOS
IgG

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA

HAIDE JATZIRY GONZALEZ HENKEL

MEXICO, D.F

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE

PROF. ABEL GUTIERREZ RAMOS

VOCAL

PROF. FERNANDO GARCIA TAMAYO

SECRETARIO

PROFA. IRMA CAÑEDO SOLARES

1er SUPLENTE

PROF. ENRIQUE ORTEGA SOTO

2° SUPLENTE

PROF. JOSE CORDERO HERNANDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA
SECRETARIA DE SALUD

ASESORA:

M en c. IRMA CAÑEDO SOLARES

SUSTENTANTE:

HAIDE JATZIRY GONZALEZ HENKEL

**ESTA TESIS FUE PARCIALMENTE FINANCIADA POR CONACYT,
PROYECTO U - 43079 - M.**

DEDICATORIAS

A mi tío José

A ti mi querido tío Pepe, porque aunque el tiempo no te permitió ver este trabajo terminado, siempre mostraste especial preocupación por mi y por mis proyectos. Estaré eternamente agradecida por todos los momentos que compartí contigo y por los conocimientos que me transmitiste. Tu gran espíritu de lucha, será para mí un gran ejemplo de vida.

Siempre estarás presente en mis recuerdos y en mi corazón.

A mis padres Maria Elena y Epifanio

Gracias por darme la vida, cuidarme y por todos los sacrificios que han realizado para hacer de mi, la mujer que soy. Todos los logros que alcance a lo largo de mi vida, serán siempre sus logros.

A ti mamita, por ser más que mi madre, mi mejor amiga y mi cómplice en todo.

A ti papito, por formarme con un carácter fuerte, por enseñarme a luchar y alcanzar todas las metas que me propongo.

A los dos, gracias por todo su cariño, apoyo y comprensión, sobre todo por confiar en que podía lograrlo.

A mi hermano Paul (Gordo)

Aunque en muchas ocasiones peleamos, sabes que a mi manera te quiero. Siempre agradeceré tus consejos y regaños, recuerda que eres mi hermano mayor y mi ejemplo a seguir.

A mi hermanito Schmeling (Flaqui)

A ti, por la gran nobleza de tus sentimientos, por tu cariño y por que siempre estas ahí, dispuesto a ayudarme cuando yo te necesito. Sabes que toda mi vida serás mi hermanito consentido y que cuentas conmigo para todo.

A mis abuelitas Marcelina y Adela

A mamá Marce por su cariño, por acercarme a Dios y enseñarme el gran poder de la oración.

A mi abuelita Adela por todo su cariño y por consentirme con su exquisito sazón.

A mis tíos y primos

A ustedes por todos los momentos compartidos y los consejos, que aportaron siempre algo bueno en diferentes momentos de mi vida.

A ti mi vida (Mario)

Por enseñarme a amar, por estar conmigo y llenarme de ilusiones. Espero que sigamos caminando juntos como hasta ahora. Te adoro y recuerda que mis logros son tus logros y tus sueños son mis sueños.

Gracias por todo tu amor, apoyo y confianza.

A mi amigo Roberto

A ti por todas las anécdotas vividas, por ser mi único amigo. Gracias por todo tu apoyo y tu amistad incondicional.

A Mónica

Porque con el tiempo que hemos convivido, te he llegado a considerar una amiga, me has demostrado que eres leal y que puedo confiar en ti. Te agradezco tu compañerismo y apoyo siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la Facultad de Química por mi formación académica y por los excelentes momentos vividos.

A la **Dra. Ma. Dolores Correa** por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio y por compartir sus conocimientos conmigo. Gracias por su confianza, apoyo y cariño en todo momento.

A **Irma Cañedo Solares** por dirigir mi tesis, te agradezco toda tu ayuda y paciencia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Héctor Luna, José Luis Hernández, Esther Calderón, Heriberto Caballero, Edith, Mónica Olmedo, Dilia Solís, Aidé Fernández, Belinda Ortiz, Claudia Rico.

A todas las personas que de alguna forma colaboraron en la realización de este trabajo, mi agradecimiento sincero.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	4
ASPECTOS GENERALES DEL PARÁSITO	4
CICLO DE VIDA.....	5
VÍAS DE TRANSMISIÓN	7
a) <i>La oral</i>	7
b) <i>La transplacentaria</i>	7
c) <i>Otras</i>	7
EPIDEMIOLOGIA	8
ASPECTOS CLÍNICOS	9
<i>Toxoplasmosis en pacientes inmunodeprimidos</i>	9
<i>Toxoplasmosis congénita</i>	10
<i>Tratamiento</i>	11
RESPUESTA INMUNE.....	11
a) <i>Respuesta celular</i>	12
b) <i>Respuesta humoral</i>	13
RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO POR ANTICUERPOS.....	15
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	16
a) <i>Estudios de gabinete</i>	16
b) <i>Pruebas de detección directa</i>	17
c) <i>Pruebas serológicas</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
OBJETIVO	23
HIPOTESIS	23
HIPÓTESIS GENERAL.....	23
HIPÓTESIS PARTICULARES	23
METODOLOGIA	24
TIPO DE ESTUDIO	24
ESTRATEGIA GENERAL.....	24
<i>FASE I. Clasificación de las muestras.</i>	24
<i>FASE II. Adaptación del ensayo de avidéz.</i>	27
<i>FASE III. Determinación de la relación entre las pruebas presuntivas y el ensayo de avidéz.</i>	27
MÉTODOS DE LABORATORIO	27
<i>Obtención del antígeno</i>	27
<i>ELISA para detección de anticuerpos IgM</i>	28
<i>Titulación de anticuerpos por ELISA indirecto</i>	29
<i>ELISA de avidéz para IgG</i>	29
ANÁLISIS DE RESULTADOS	30
RESULTADOS	31
ADAPTACIÓN DEL ELISA DE TITULACIÓN DE IgG COMO ENSAYO DE AVIDEZ	31
a) <i>Muestras de suero</i>	31
b) <i>Muestras de sangre total embebida en papel filtro</i>	42
CORRELACION DE LA AVIDEZ EN MUESTRAS DE SUERO Y LA AVIDEZ EN MUESTRAS DE SANGRE TOTAL EMBEBIDA EN PAPEL FILTRO	54
ANTICUERPOS IgM Y SU RELACIÓN CON LA AVIDEZ.....	54
LA RESPUESTA AL EXTRACTO CRUDO Y A LA P30 COMO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES DE AVIDEZ.....	57
LA DIFERENCIA DE TÍTULOS Y SU RELACIÓN CON LA AVIDEZ.....	61
DIAGNOSTICO MATERNO CON BASE EN EL RECIEN NACIDO, Y SU RELACIÓN CON AVIDEZ	64
CINETICA DE LA AVIDEZ DURANTE LA INFECCIÓN	66
ANALISIS DE RESULTADOS	66
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	73

RESUMEN

La toxoplasmosis es una infección cosmopolita causada por el parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii*. Este parásito infecta muchas especies de aves y mamíferos incluyendo al ser humano. En personas inmunocompetentes la infección por *T. gondii* regularmente se presenta de manera asintomática y autolimitada. Una de las formas más severas es la toxoplasmosis congénita, ocasionando el desarrollo de secuelas irreversibles y en ocasiones hasta muerte del feto. La posibilidad de prevenir la toxoplasmosis congénita estriba en el diagnóstico de infección aguda en mujeres embarazadas ya que de esto dependerá el tratamiento que se administre a la madre, que se ha demostrado disminuye tanto transmisión y el grado de afectación al producto. También ha sido útil demostrar la infección en recién nacidos aparentemente sanos.

Generalmente se ha considerado la presencia de anticuerpos IgM como un indicador de infección reciente (aguda), sin embargo, se ha observado que existen casos donde la IgM puede durar hasta más de un año. Mientras que la presencia de anticuerpos de clase IgG, sólo significa contacto con el parásito y no permite discernir entre la fase aguda ó crónica.

Para el diagnóstico de la infección aguda por *T. gondii*, se han desarrollado algunas estrategias. Una de ellas consiste en titular los anticuerpos IgG en muestras seriadas, y determinar si los títulos de estos anticuerpos están aumentando (infección aguda). La otra es determinar la avidéz de los anticuerpos, que es la afinidad promedio que tienen éstos para reconocer al antígeno, y tiene la ventaja de que puede darnos una indicación de la fase de infección con una sola muestra, lo que permite tomar decisiones terapéuticas más tempranamente. En este estudio se adaptó un ELISA previamente estandarizado en muestras de suero y sangre embebida en papel filtro para convertirlo en un ensayo de avidéz de IgG. El ensayo de avidéz consistió en llevar a cabo los pasos generales de un ELISA indirecto con la diferencia de que se realizaron lavados o incubaciones con urea, a diferentes concentraciones, después de incubada la muestra. La urea es un agente capaz de romper los enlaces antígeno – anticuerpo cuando estos son débiles. El valor

de avidéz se obtuvo dividiendo la absorbancia de la muestra con urea entre la absorbancia de ésta sin urea y así se pudieron establecer los rangos a partir de los cuales se determinó si un caso era agudo o crónico.

Se usaron muestras de suero o de sangre embebida en papel filtro de pacientes infectados por *Toxoplasma gondii* pertenecientes a grupos tanto de alta como de baja probabilidad de infección aguda, los cuales se definieron por medio del resultado de pruebas presuntivas (presencia de anticuerpos IgM, IgA, IgG con un extracto crudo o la proteína p30 como antígeno y diferencia en títulos de anticuerpos IgG) .Estos resultados se obtuvieron por medio de ELISA y Western blot.

Para adaptar el ensayo de avidéz en muestras de suero, se probaron diferentes concentraciones de urea (6M y 8M) con diferente tratamiento (lavados o incubaciones de 30min), diferentes diluciones de muestra (1:50 – 1:800) y 3 concentraciones del extracto crudo como antígeno (0.5, 1.0 y 2.0), iniciando con las más cercanas a lo reportado en la literatura. Al elegir las mejores condiciones para el ensayo, se desechó la concentración de antígeno 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ porque no permitió distinguir entre casos agudos e intermedios-crónicos, y la dilución de suero 1:50, ya que provocó fondo en los resultados.

Entre las otras condiciones aplicadas al ensayo, no se eligieron algunas en específico, ya que en todas se pudo distinguir entre casos pertenecientes a alguna de las 3 etapas de infección. Las diferencias entre los valores de avidéz de cada etapa fueron significativas ($P < 0.05$); así mismo, las correlaciones entre las condiciones del ensayo resultaron altas además de significativas ($R > 0.91$; $P < 0.0001$).

Con base en los resultados obtenidos en muestras de suero, se realizó la adaptación del ensayo en muestras de sangre embebida en papel filtro. Se inició con las mismas condiciones tanto de antígeno como de urea, variando únicamente la dilución de la muestra, la cual se usó a partir de 1:80 (una perforación de 3mm de diámetro de la muestra, equivalente a 5 μL de sangre [2.5 μL de suero] en 200 de PBS-Tween). Al igual que en suero, todas las condiciones aplicadas al ensayo permitieron distinguir entre etapas de infección, las diferencias entre los valores de avidéz fueron significativas ($P <$

0.05). También las correlaciones entre condiciones fueron altas y con significancia estadística ($R > 0.93$; $P < 0.0001$).

Como no hubo diferencias significativas entre distintas condiciones para realizar el ensayo, se elaboraron los rangos de valores de avidéz en los que se consideró a cada muestra como aguda, intermedia o crónica, para cada una.

Entre los valores de avidéz de una muestra en suero y su correspondiente en sangre embebida en papel filtro, la correlación fue alta, situación que fue corroborada por el análisis estadístico (U de Mann-Whitney) en el cual las diferencias no resultaron significativas.

A partir de los valores de avidéz, se determinó la frecuencia de casos verdaderos agudos y verdaderos intermedios-crónicos dentro de los grupos formados por los criterios de clasificación, así como la relación existente entre ellos para ubicar las pruebas presuntivas más adecuadas con el fin de definir la etapa de infección. La diferencia de anticuerpos IgG entre muestras seriadas, la respuesta conjunta a un extracto crudo y a la proteína p30, y el uso del diagnóstico del recién nacido para definir la fase de infección en la madre, fueron los criterios de clasificación de muestras que tuvieron mayor relación con los valores de avidéz ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$ y $P = 0.03$, respectivamente). Contrariamente, los niveles de IgM y la diferencia de títulos de anticuerpos IgG de una misma muestra a dos concentraciones de antígeno, no mostraron relación alguna con los valores de avidéz ($P = 0.39$ y $P = 0.65$ respectivamente). Por lo tanto se recomiendan sólo los tres primeros criterios para establecer el riesgo de que un caso se encuentre en infección aguda.

Y dado que el ensayo de avidéz mantuvo buena correlación con la diferencia de anticuerpos IgG en muestras seriadas, que es el método más usado para definir un caso dentro de infección aguda o crónica, resulta confiable emplearlo para la confirmación oportuna de casos en los que se cuente con una sola toma. Además no se limita a muestras de suero ya que, como se mencionó, existe buena relación entre éstas y las muestras de sangre embebida en papel filtro, por lo que se pueden usar ambas indistintamente para la determinación de avidéz.

INTRODUCCION

ASPECTOS GENERALES DEL PARÁSITO

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado, capaz de sobrevivir en el interior de los macrófagos y, en general, de toda célula nucleada de cualquier mamífero. Su nombre proviene del griego y hace referencia a su forma en arco o media luna. Es un protozoario perteneciente al orden de los *Coccidia*.^{1,2,3} Puede presentarse bajo tres formas:

- Taquizoítos o trofozoítos.
- Quistes tisulares, que contienen bradizoítos
- Ooquistes, que contienen esporozoítos

Los taquizoítos son formas de división rápida, observadas en la infección aguda, son ovales o en forma de media luna y su tamaño es de 3-4 μm de ancho por 7-8 μm de largo. No permanecen mucho tiempo fuera de la célula. Residen en vacuolas y, al dividirse, pueden provocar la lisis celular o dar lugar a los bradizoítos que sobreviven en los quistes tisulares. Éstos se forman en el interior de las células cuando la aparición de anticuerpos y la inmunidad celular específica limitan la proliferación de los taquizoítos (figura 1).^{4, 5}

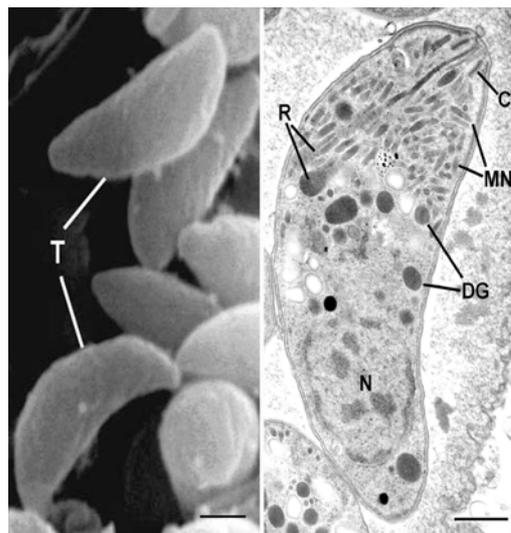


Figura 1. Microfotografías electrónicas de barrido (izquierda) y de transmisión (derecha) de *Toxoplasma gondii* en su estado de taquizoíto (T). En la figura de la derecha se marcan algunos organelos, como el conoide (C), los micronemas (MN), las roptrias (R) y los gránulos densos (DG). La barra de abajo equivale a 2 y 1 μm , respectivamente.

Los quistes son formas resistentes, que pueden llegar a alcanzar un tamaño de 10 a 200 μm y contener miles de bradizoítos, formas de multiplicación lenta. Los quistes pueden encontrarse en cualquier órgano, pero predominan en el SNC y en el tejido muscular (corazón y músculo esquelético estriado), donde pueden persistir en fase de latencia durante toda la vida y son capaces de reactivarse. La desecación, la congelación por debajo de los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el calor superior a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ los destruye.^{4,5}

Los ooquistes son formas ovales de 10-12 μm que se eliminan con las heces de los gatos (únicos huéspedes definitivos de *T. gondii*) que han ingerido quistes tisulares u ooquistes esporulados. En el medio ambiente los ooquistes maduran en 1 a 5 días (se requieren condiciones de humedad y temperatura entre 4 y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), al formarse en su interior 8 esporozoitos.⁶ Una vez esporulados persistirán con capacidad infectante hasta 18 meses. La ebullición o bien el calor seco a temperaturas superiores a los $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ los destruye.⁷

CICLO DE VIDA

El ciclo de reproducción sexual se inicia en algún felino (como el gato doméstico de importancia para el ser humano), que corresponde al huésped definitivo,^{8,9} ingiere carne con formas infecciosas llamadas quistes tisulares que contienen bradizoítos (formas de proliferación lenta). Una vez que pasan al intestino, las enzimas digestivas rompen estos quistes y se liberan las formas infectivas del parásito que invaden el intestino delgado. Aquí, se lleva a cabo la gametogonia, que corresponde a un proceso sexual de reproducción que origina el ooblasto, que a su vez da origen al ooquiste inmaduro, que contiene las fases infecciosas llamadas esporozoítos y que es eliminado con las heces.^{10,11}

En el ciclo de reproducción asexual, los huéspedes intermediarios se pueden infectar por ingestión de ooquistes esporulados o quistes tisulares presentes en tejidos de otros huéspedes intermediarios.⁷ Una vez ingeridos, la pared es destruida por las enzimas digestivas, con lo cual se liberan los esporozoitos o los bradizoítos, respectivamente,¹² que tras invadir las células del epitelio intestinal, se convierten en taquizoítos, y, después de replicarse, se diseminan

y pueden alcanzar cualquier órgano, aunque se localizan sobre todo en el músculo esquelético, el corazón y el cerebro. Los taquizoítos se multiplican en el interior de las células y, al lissarlas, invaden por contigüidad las células próximas y pueden permanecer viables durante períodos muy prolongados en el interior de los macrófagos. La multiplicación cesa con la aparición de la respuesta inmunitaria (humoral y celular). Como consecuencia, los taquizoítos se transforman en bradizoítos y se enquistan, permaneciendo viables durante toda la vida del huésped. La proliferación de los taquizoítos se puede prolongar más tiempo en el SNC y en la retina de los pacientes, debido a la dificultad de los anticuerpos para alcanzar estos lugares o en caso de que la primoinfección se produzca en un huésped inmunodeprimido. Las reactivaciones se producen por depresiones transitorias o permanentes de la inmunidad celular (figura 2).¹³

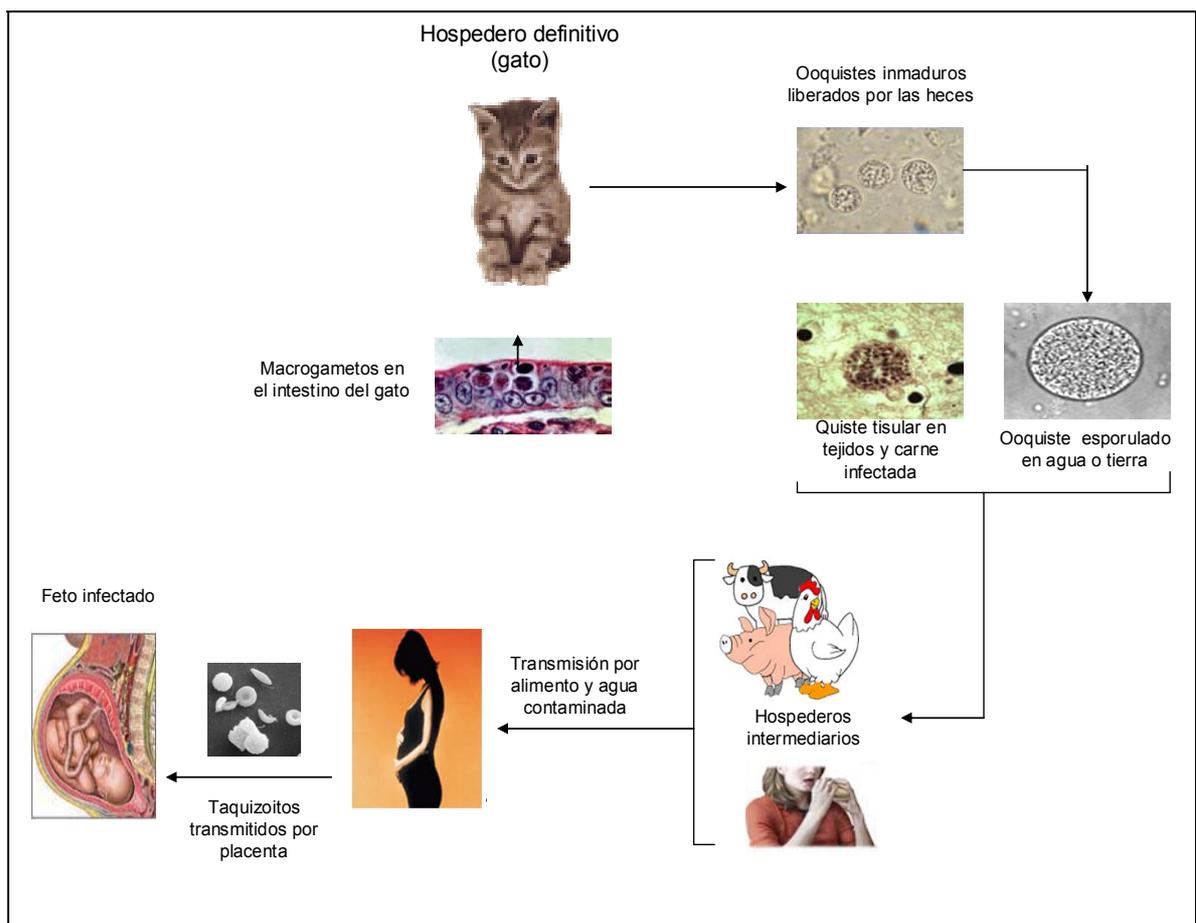


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

VÍAS DE TRANSMISIÓN

Las principales vías de transmisión al ser humano son:

a) La oral

Por la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces de gato o la de carne cruda o insuficientemente cocida de borregos, cerdos y cabras, y aun de aves que contengan quistes tisulares del parásito.^{13,14,15,16} La convivencia con gatos tiene una relación estrecha con la seroprevalencia de anticuerpos ya que ésta es por lo menos dos veces mayor entre personas con gatos en sus casas que en aquellas que no los tienen.^{6,17,43}

b) La transplacentaria

Durante el periodo inicial de la infección, el parásito circula en sangre por lo que cuando una mujer que se infecta por primera vez en el embarazo o en un momento cercano al mismo, tiene riesgo de que el parásito invada la placenta y pase al feto.^{18,19,20} A pesar de que ella es capaz de responder inmunológicamente y limitar al parásito en sus tejidos, no evita la transmisión al niño, que está condicionada a factores como la carga parasitaria y la virulencia de la cepa, así como el trimestre de la gestación en la que se dé.²¹ Asimismo, se ha observado transmisión a través de la leche materna.^{6,22}

c) Otras

Existe la posibilidad de adquirir una toxoplasmosis también a partir de transfusiones de sangre total o leucocitos provenientes de pacientes en fase de diseminación hematológica o bien a través de órganos trasplantados que contengan quistes del parásito. También se ha descrito la inoculación accidental en personal de laboratorio.⁶

EPIDEMIOLOGIA

La toxoplasmosis es altamente prevalente en seres humanos, aunque su frecuencia varía dependiendo de las condiciones climatológicas, y los hábitos higiénicos y alimentarios.^{11,23}

Se ha estimado que alrededor de un tercio de la población humana mundial presenta anticuerpos de clase IgG contra *T. gondii* en suero, que indican contacto con este parásito.¹⁵ La prevalencia de seropositivos es más alta en las regiones tropicales o en lugares donde se consume la carne cruda. Este valor es bajo en niños menores de cinco años y alcanza su máximo entre los 20 y los 50 años, según la región geográfica. Se ha encontrado alta prevalencia en diversos lugares como Francia, algunas Islas del Pacífico y países de América Central, como Panamá y Costa Rica.^{24,25} En Latinoamérica, donde la ingesta de carne mal cocida es común y donde la población de felinos es abundante y el clima favorece la sobrevivencia de los ooquistes, se han encontrado tasas de seroprevalencias muy elevadas, con valores que van desde el 9 al 98%.^{23,26}

En México varios autores han reportado valores entre 16 y 56%.¹⁵ En la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de México en 1987 se encontraron anticuerpos en 50% de los individuos, con variaciones regionales que van desde 17% para Baja California Sur hasta 67.5% para Tabasco.^{11,29}

En cuanto a la epidemiología de infección en mujeres embarazadas en México, se ha referido una seropositividad del 18.2% al 30% y de éstas el 34.5% de sus hijos nacieron infectados.^{15,30} En nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo un estudio en una población de mujeres embarazadas, del Estado de Morelos, en el que se encontró una seroprevalencia de 11% para IgM y de 84% para IgG.

Para la infección congénita, se tiene un estudio de Roch y Bravo-Becherelle en el que encontraron que de cada 1000 recién nacidos de la ciudad de México, 19 tenían anticuerpos IgM contra *T. gondii*.²⁷ Finalmente, en un estudio reciente de 1003 niños de la Ciudad de México encontraron 2 casos positivos a IgM.²⁸

ASPECTOS CLÍNICOS

Debido a que las personas inmunocompetentes desarrollan una respuesta innata, seguida de una adaptativa (inmune) humoral y celular, y restringen el crecimiento del parásito, la infección por *T. gondii* suele ser asintomática y autolimitada. Este estado pasa inadvertido en el 80 al 90% de los adultos y en niños con infección adquirida después del nacimiento.³¹ Una infección primaria por *Toxoplasma gondii* induce una respuesta inmune específica que protege contra cualquier re-infección. Por lo anterior, se suele generalizar que *T. gondii* produce problemas clínicos graves en casos en los cuales la respuesta inmune está deprimida o no se ha desarrollado, como en el caso de los pacientes con transplante, con VIH, y los seres humanos durante el desarrollo embrionario y fetal.^{15,32}

Toxoplasmosis en pacientes inmunodeprimidos

La toxoplasmosis en individuos inmunodeprimidos como es el caso de pacientes que han recibido algún transplante o en pacientes con VIH, ocasiona graves problemas clínicos e incluso puede ser fatal. Principalmente ocasiona problemas como coriorretinitis y consecuente pérdida de la visión, daños en el sistema nervioso central, pulmones y corazón. La probabilidad de desarrollar la toxoplasmosis aguda es mayor debido a una reactivación de una infección latente, o a una primo-infección de fuentes exógenas tanto por vía oral como por órganos contaminados transplantados. Más del 50% de los pacientes con SIDA y toxoplasmosis presentan manifestaciones clínicas de afectación cerebral (encefalitis, meningoencefalitis, etc.), y más del 95% de los casos se deben a una reactivación de la infección por *T. gondii*.^{15,32} Por lo anterior, en pacientes con SIDA los anticuerpos IgM rara vez son detectados,³³ por lo que se ha intentado la demostración del parásito mediante procedimientos histológicos o inmunohistoquímicos (cuando ya es demasiado tarde), o mediante el aislamiento del parásito *in vivo* o *in vitro*, o bien mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Dado que el parásito no circula libre en sangre, sino dentro de leucocitos y durante periodos cortos, esta técnica no ha resultado de alta sensibilidad.

Toxoplasmosis congénita

Si una mujer se infecta por primera vez durante el embarazo o en un momento cercano al mismo, puede ocurrir la infección de la placenta y del feto.^{18,19,20,26} A pesar de que ella es capaz de responder inmunológicamente y limitar al parásito en sus tejidos, no evita la transmisión al niño. El riesgo de adquirir la infección en el primer trimestre es menor; sin embargo, si llega a ocurrir, las consecuencias son fatales, pues puede presentarse muerte y aborto espontáneo. En la etapa más tardía del embarazo la frecuencia de transmisión al feto es alta pero la severidad del daño es baja y el bebé generalmente nace asintomático, aunque puede desarrollar secuelas posteriormente.^{18, 20, 34} Por lo tanto la severidad del daño depende del momento en que la madre adquiere la infección durante el embarazo.^{22,26} Se ha reportado que el 80% de los niños infectados son asintomáticos al nacer.¹⁹ El recién nacido con toxoplasmosis congénita sintomática (normalmente adquirida durante el segundo trimestre de gestación) presenta formas clínicas graves, incluyendo lesiones neurológicas y oculares, e incluso puede morir.^{21,35,36}

Una de las posibilidades para prevenir la toxoplasmosis congénita o las consecuencias graves de ésta, estriba en el diagnóstico de la primo-infección materna durante el embarazo.^{37,38,44} De confirmarse la infección aguda y dependiendo del tiempo de gestación puede interrumpirse el embarazo, o proporcionar tratamiento a la madre con espiramicina (fármaco que no atraviesa la barrera placentaria) para disminuir la circulación del parásito en sangre y su transmisión al bebé en gestación.^{6,39} A partir de la semana 18 de gestación es posible tomar una muestra de líquido amniótico o de sangre fetal e intentar el aislamiento del parásito por inoculación de ratones o cultivo celular, así como análisis de la muestra por PCR,⁴⁰ y si el feto está infectado se le da tratamiento a través de la madre.^{15,35,40}

El diagnóstico de infección congénita en neonatos asintomáticos al nacimiento permite proporcionar tratamiento farmacológico a los niños, lo que disminuye la posibilidad de que se generen secuelas o la gravedad de las mismas.^{6, 41}

Antes de llevar a cabo una amniocentesis o, incluso de proporcionar

tratamiento preventivo a la madre, es muy importante demostrar que la paciente cursa con infección aguda.⁴⁵ Así mismo, demostrar la infección aguda en los neonatos es imprescindible para tomar la decisión de dar tratamiento, el cual es altamente tóxico y prolongado.

Tratamiento

Existen diversos fármacos empleados para el tratamiento de infección por *T. gondii*. Principalmente se emplean las sulfonamidas que son agentes antibacterianos que inhiben a la enzima sintetasa del ácido dihidrofólico e interfieren con la habilidad del parásito para utilizar el ácido p-aminobenzoico. La sulfadiacina, sulfametacina y sulfameracina son las que han mostrado mayor eficacia.¹⁵ En combinación con los inhibidores de la enzima dihidrofolato reuctasa (DHRF), proporcionan un bloqueo secuencial del metabolismo de folatos a dos niveles, por lo que existe una actividad sinérgica contra *T. gondii*. Dentro de éstos últimos la pirimetamina es el fármaco más utilizado. La combinación que ha dado mejores resultados es la de pirimetamina y la sulfadiacina, se estima que la sulfadiazina multiplica por 6 su acción antiparasitaria.³⁵ La pirimetamina está contraindicada antes de las 16 semanas de gestación por el riesgo teratogénico que provoca. El ácido fólico se administra al mismo tiempo que el tratamiento con pirimetamina/sulfadiacina, ya que permite eliminar los efectos adversos de estos agentes.³⁵

RESPUESTA INMUNE

En un individuo inmunocompetente la infección por *T. gondii* induce una respuesta innata mediada por macrófagos, células dendríticas y células NK, seguida por una respuesta inmune adquirida tanto humoral como celular.^{31,42} Por esto la infección puede autolimitarse y pasar prácticamente inadvertida⁶ (figura 3).

a) Respuesta celular

Durante la fase activa de la infección, los taquizoitos invaden células y se multiplican exponencialmente: cada taquizoito puede dar origen hasta a 32 parásitos; entonces, las células son destruidas y son liberados e invaden células vecinas. Durante este proceso, algunos parásitos pueden interactuar con células del sistema inmune. Las células presentadoras de antígenos (CPAs) procesan algún taquizoito y lo presentan a través de antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, de las siglas en inglés). Si los antígenos son presentados por medio del MHC clase I, son reconocidos por los linfocitos-T CD8+ y proliferan, que son capaces de identificar células corporales que presentan por el MHC-I antígenos específicos, y se lleva a cabo el proceso de citotoxicidad, para finalmente inducir apoptosis a las células infectadas. Al mismo tiempo, algunas CPAs presentan antígenos a través del MHC clase II interactuando con linfocitos-T CD4+; si en el microambiente se encuentran algunas citocinas como la interleucina 12 (IL-12), se desarrolla una respuesta de tipo Th1 contra *T. gondii*, liberando citocinas como interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e IL-15, que activan a macrófagos y células NK, los cuales son importantes para controlar la replicación de los taquizoitos en ambas fases de infección, aguda y crónica, además de que son capaces de activar a más linfocitos-T CD8+ y CD4+. ^{42,46}

Al inicio de la infección algunos linfocitos T-CD4+ liberan IL-2 que activa a los linfocitos-B con receptores específicos, que han sido estimulados, y éstos se diferencian a células plasmáticas para después dar origen a anticuerpos séricos dirigidos contra antígenos del parásito ⁴². Asimismo, algunos antígenos de *T. gondii* interactúan directamente con receptores de linfocitos-B y éstos son capaces de producir inmediatamente anticuerpos de clase IgM (fase aguda de la infección), e IgG. ⁶

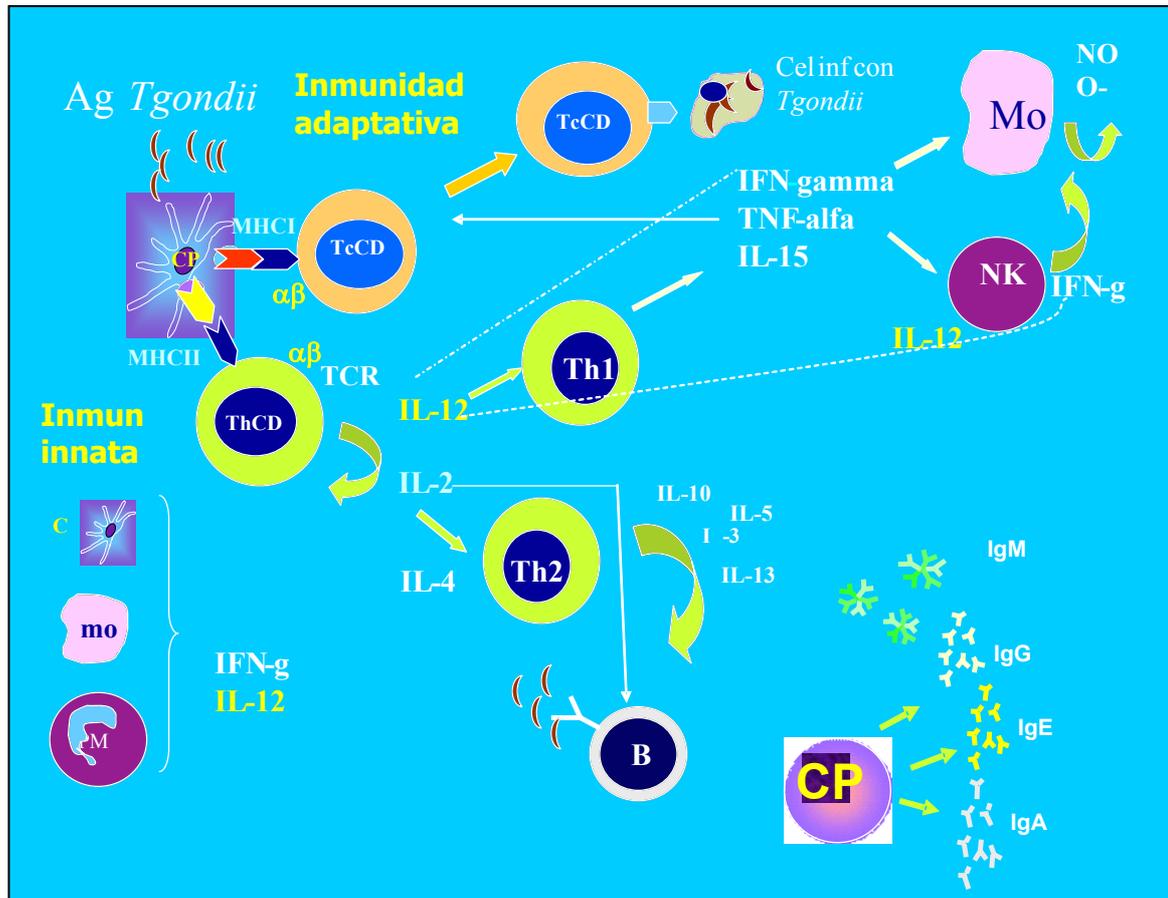


Figura 3. Respuesta inmune celular y humoral contra *Toxoplasma gondii*. Ag: antígenos, CPA: células presentadoras de antígeno, B: linfocitos B, NK: células natural killer, Mo: macrófago, Th: linfocitos Th 1 y 2, MHC I y II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, IL: interleucinas, Cp: célula plasmática, IFN g: interferon gamma, NO: óxido nítrico, O⁻: radical libre de oxígeno, IgM, IgG, IgA, IgE: inmunoglobulinas tipo M, G, A y E.

b) Respuesta humoral

La respuesta inmune humoral se pone de manifiesto con la presencia de los anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en el suero (figura 4).

Anticuerpos IgM

Este tipo de anticuerpos aparecen 1 a 2 semanas después de la infección y llegan a su máximo a las 2-3 semanas.^{26,42,47} Por mucho tiempo, su detección fue considerada como el marcador de la fase aguda, pero la evidencia de que los títulos de IgM anti-*Toxoplasma* pueden permanecer detectables durante

muchos meses, o incluso años, después de producida la infección primaria ha cambiado este concepto. ⁴⁸Por lo anterior, el principal valor de las IgM radica en que su ausencia puede prácticamente descartar la infección reciente, y por el contrario su presencia implica la necesidad de proseguir el estudio de un paciente.

Anticuerpos IgA

Considerado también como un marcador de fase aguda y juega un papel importante en la inmunidad de la mucosa oral contra infección por *T. gondii*. ⁴⁷Se ha comprobado que, si bien al igual que la IgM puede también permanecer positivo varios meses después de la primoinfección, el porcentaje de IgA residuales es mucho menor que el de las IgM. En el adulto, la cinética de la producción de IgA específica es prácticamente paralela a la de la IgM, aunque aparece un poco más tarde y desaparece más precozmente. ⁴⁷

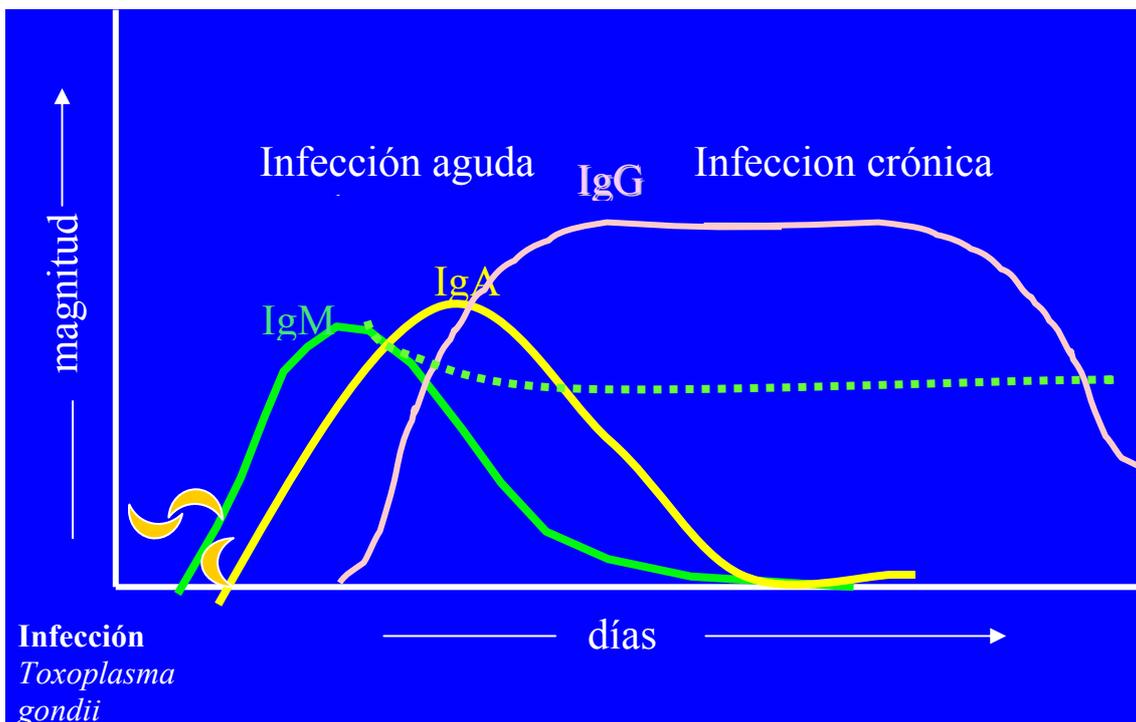


Figura 4. Respuesta de anticuerpos contra *toxoplasma gondii*.

Anticuerpos IgG

La presencia de anticuerpos IgG implica que ha habido contacto entre el paciente y el parásito en algún momento de la vida. La infección aguda o reciente suele acompañarse con títulos elevados, pero no se trata de un criterio diagnóstico definitivo. Si existe la evidencia de una seroconversión o de un aumento significativo del título de IgG entre dos muestras separadas 3-4 semanas, es diagnóstica de infección reciente.^{49,50}

Anticuerpos IgE

Algunos estudios iniciales sugieren que las IgE antitoxoplasma aparecen pronto, al inicio de la enfermedad,⁵¹ y desaparecen más rápidamente que los anticuerpos de las clases IgM e IgA. Sin embargo, por el momento existe poca experiencia para establecer qué puede aportar al diagnóstico.

RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO POR ANTICUERPOS

Algunas de los antígenos de *T. gondii* son de naturaleza proteica, por lo que han sido clonados y estudiados con mayor detalle: La p22 cuyo gen se ha clonado y expresado, se ha empleado en forma recombinante para detectar IgG en inmunoblots y en el ELISA.^{15,84}

Los taquizoitos en cultivo de tejidos excretan y secretan antígenos. Estos antígenos constituyen el 90% del antígeno de *Toxoplasma gondii* que circula en el hospedero. Los antígenos de excreción-secreción más estudiados son el p23 y el p28. El p23 se encuentra en gránulos densos, tanto de taquizoitos como de bradizoitos y se secreta en la red reticular rica en proteínas dentro de la vacuola parasitófora. Este antígeno es reconocido frecuentemente por los sueros de los pacientes con infección crónica y con menos frecuencia de aquellos con infección aguda.⁵² La p28 es un antígeno intracelular presente en los gránulos densos y es secretado por los taquizoitos; también es un componente menor de la red reticular rica en proteínas secretadas por el

parásito en la vacuola parasitófora, ⁵²La proteína p29 es reconocida con frecuencia por anticuerpos de clase IgG en muestras de pacientes con seroconversión reciente. ⁵³

La proteína de superficie más abundante es la P30, constituye el 5% del total de las proteínas del taquizoito. ^{53,54}Se ha clonado su gen y secuenciado la proteína. La secuenciación del gen en algunas cepas de *T. gondii* muestra que es altamente conservado. ⁵³La p30 es una proteína altamente inmunogénica e induce la producción de anticuerpos IgG, IgM e IgA. Purificada, se ha utilizado para el diagnóstico de toxoplasmosis aguda y crónica. ⁵³

El antígeno P35 se ha empleado para distinguir infección reciente de infección crónica, debido a que permite identificar mejor anticuerpos IgM que anticuerpos IgG. ⁵⁵Sin embargo, como se sabe los anticuerpos IgM pueden durar meses e incluso años, por lo que la aseveración anterior, no siempre es válida. ^{48, 56}

El factor estimulador de la penetración (FEP), es otra proteína aislada de taquizoitos, cuya ubicación es dentro de las roptrias. ⁵²La proteína recombinante tiene un peso molecular de 75 kDa, y la nativa en el lisado del parásito es de 60 kDa. En altas concentraciones, esta proteína rompe la integridad de la membrana de la célula hospedero. ⁵⁷

La P66 del taquizoito es reconocida con frecuencia por anticuerpos de clase IgM presentes en sueros de pacientes con infección aguda. ^{54,84}

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la toxoplasmosis puede hacerse por métodos parasitológicos y pruebas inmunológicas.

Existen diversas pruebas y estudios que permiten el diagnóstico, a continuación se mencionan algunas de ellas:

a) Estudios de gabinete.

Actualmente los médicos se apoyan en algunos estudios de adicionales para reforzar el diagnóstico clínico de toxoplasmosis; dentro de éstos, se encuentran la radiografía para búsqueda de calcificaciones cerebrales, la tomografía axial computarizada (TAC) el ultrasonido, y la resonancia magnética nuclear (RM). ⁶

b) Pruebas de detección directa

Estas pruebas tienen por objeto demostrar la presencia del parásito. Entre ellas se encuentran:

Aislamiento in vivo e in vitro.

Toxoplasma gondii puede aislarse de sangre, de líquido cefalorraquídeo (LCR) y de otros líquidos o tejidos corporales incluyendo el material ganglionar; su aislamiento directamente indica una infección aguda.¹⁵ Se inocula el líquido corporal en la cavidad peritoneal de ratones o en cultivos celulares (células Vero o fibroblastos).

Un buen aislamiento *in vivo* requiere la demostración de los anticuerpos específicos contra el parásito en el suero o la detección de los quistes en tejidos del ratón infectado.^{58,59} La sensibilidad de este método en el diagnóstico de infección aguda es de aproximadamente 90%, pero los resultados se demoran hasta 30 días después de la inoculación.¹⁵

La sensibilidad del aislamiento *in vitro* es comparable al aislamiento en ratones, con la ventaja de que en 6-8 días se pueden obtener resultados.

Identificación histológica

En material de biopsia de tejidos corporales, los taquizoitos y los bradizoitos enquistados son demostrables con las tinciones de Wright, de hematoxilina-eosina y de Schiff-ácido periódico; o bien por inmunofluorescencia específica o tinción con inmunoperoxidasa.¹⁵

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Consiste en efectuar una replicación repetitiva *in vitro* de una secuencia específica de DNA.⁶⁰ Al amplificar o copiar varias veces una misma secuencia se aumenta en forma proporcional la sensibilidad de la misma. El producto amplificado se analiza en un gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio. Clínicamente, se ha empleado con buenos resultados para detectar la presencia de *T. gondii* en líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejidos.⁶¹

c) Pruebas serológicas

Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos específicos en suero y sangre, algunas de estas son:

Prueba de Sabin y Feldman

Es una prueba considerada como clásica, llamada también la prueba del colorante, dado por el fenómeno observado en los taquizoitos que pierden su afinidad para ser teñidos por el azul de metileno cuando están en contacto con un anticuerpo específico, mientras que los parásitos no tratados con sueros inmunes se colorean intensamente.^{15, 62} Para la realización de esta prueba se utilizan parásitos vivos, lo cual es un inconveniente por el riesgo de contaminación o accidentes de laboratorio.^{63,64} Además, el ensayo sólo indica que hay anticuerpos pero no de qué clase.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Esta prueba se emplea para detectar IgM o IgG. Consiste en la fijación de taquizoitos en portaobjetos y éstos se ponen en contacto con el suero del paciente, a diferentes diluciones; enseguida se adicionan anticuerpos conjugados a sustancias fluorescentes. La reacción antígeno-anticuerpo se identifica por microscopía de fluorescencia. En los casos positivos se observa una fluorescencia amarilla-verdosa brillante y para los negativos un color rojo sin fluorescencia.^{15,62} La inmunofluorescencia es menos sensible que el ELISA para detección de IgM. Además, se han observado resultados falsos-positivos en muestras que contienen factor reumatoide o factor antinuclear.⁶²

Hemaglutinación

El fundamento de esta prueba consiste en la aglutinación de eritrocitos de oveja o pavo, previamente sensibilizados por antígenos de *Toxoplasma*, en presencia de sueros que contienen anticuerpos específicos.

Esta prueba es útil, presenta una alta sensibilidad pero no parece tener ventajas sobre la inmunofluorescencia, pudiendo ser negativa en toxoplasmosis

congénita, por lo que este método es útil para determinar si hay infección pero no el tipo de infección de que se trata. Su sensibilidad y especificidad son menores que las de la prueba de Sabin y Feldman.⁶²

ELISA

El ELISA descrito inicialmente en 1971 por Envía y Perlman, se emplea para la identificación de las diferentes clases de anticuerpos: IgA, IgE, IgM e IgG (y sus subclases). Es una técnica que utiliza anticuerpos conjugados a una enzima, que se unen a anticuerpos presentes en el suero del paciente, y que conservan su capacidad de unión específica al antígeno. En este sistema, el antígeno o el anticuerpo se adsorben a una fase sólida insoluble (microplacas de poliestireno), y la enzima es capaz de producir una reacción de óxido-reducción, en la cual el sustrato se transforma en un producto colorido.⁶⁴

Existen diversos tipos de ELISA: directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto que sólo detecta anticuerpos. En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima. En cambio, en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno. En los de captura, el conjugado enzima-anticuerpo se une al antígeno antes fijado a un primer anticuerpo, adsorbido a la fase sólida. Se agrega el sustrato de la enzima y se mide la intensidad del color desarrollado, la cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.⁶⁴ Las enzimas más empleadas son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG). Los sustratos para la enzima HPR son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos que se oxidan y desarrollan color. La más empleada es la *o*-fenilendiamina (OPD), que continúa en forma soluble después de ser oxidada. Los sustratos para la FA son el *p*-nitrofenil fosfato y el 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato.⁶⁴

Western blot

La técnica de “western blot”, descrita por Towbin y col. en 1989⁶⁵ combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), en presencia o ausencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), con el ELISA en fase sólida. Primeramente, las proteínas se separan mediante electroforesis conforme a sus pesos moleculares, en geles de poliacrilamida, lo que permite su identificación. Después, las proteínas separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (NC) o de nylon, quedando inmovilizadas y expuestas en la superficie. El patrón que se obtiene en el papel es una copia del patrón de separación del gel.⁶⁶ En esta fase es necesario bloquear los sitios reactivos del papel que quedan libres con alguna proteína inerte (por ejemplo, gelatina, albúmina sérica bovina o leche), para evitar la unión específica de los anticuerpos que se emplean después. En la siguiente etapa, la membrana de NC se hace reaccionar con un fluido biológico, donde se supone la presencia de anticuerpos específicos, los cuales se unen a sus antígenos correspondientes inmovilizados en el papel. La reacción antígeno-anticuerpo que se efectúa corresponde a la primera etapa de la reacción. Para ponerla de manifiesto se agrega un anticuerpo que va dirigido contra el tipo de anticuerpos del paciente, unido a una enzima (conjugado) como peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Entonces, la reacción se hace visible con la ayuda de un sustrato de la enzima y un cromógeno, el cual revela bandas en la membrana de nitrocelulosa. Dependiendo del tipo de conjugado que se emplee para hacer visible la reacción es posible identificar la clase de anticuerpos del individuo (IgM, IgG, IgA, IgE).⁶⁴ El western blot se emplea para identificar un patrón de reconocimiento antigénico por anticuerpos.⁶² Debido a que es una prueba muy sensible y específica, se ha empleado como prueba confirmatoria.

Avidez de anticuerpos IgG

Método descrito por Hedman et al en 1989,⁶⁷ se basa en la distinta fuerza de la unión entre antígeno y anticuerpo en la infección aguda y en la crónica. Algunos estudios demuestran que durante las primeras semanas después de la infección, predominan los anticuerpos IgG de baja avidez después del cambio

antigénico primario, por lo que se han de interpretar como altamente sugerente de infección aguda, mientras que durante las siguientes semanas y meses por la selección de células B de acuerdo al antígeno, predominan las IgG de elevada avidéz, lo cual es indicativo de infección crónica.^{67,68,69}

En realidad existen IgG de elevada y baja avidéz siempre; lo que varía es la proporción relativa de uno y otro tipo según la fase de la enfermedad. Al parecer, la presencia de anticuerpos IgG de elevada avidéz en proporción superior al 50% excluye la infección aguda. Más difícil es interpretar el resultado cuando las IgG son mayoritariamente de baja avidéz, ya que no se reconoce con exactitud cuándo cambia la avidéz de los anticuerpos y porqué en determinadas situaciones, como por ejemplo durante el tratamiento específico, se alarga el tiempo de las IgG de baja avidéz.

La avidéz de anticuerpos IgG se puede determinar por medio de ELISA indirecto o Western blot, ensayos en los que se siguen pasos básicos, pero aquí se colocan las muestras por duplicado, y después de incubadas, a uno de los duplicados se le trata con algún agente desnaturizante, como la urea, que es usado para disociar los complejos antígeno-anticuerpo de baja avidéz.^{67, 70}

El resultado de la avidéz es determinado en el ELISA por el cociente de la absorbancia de cada muestra tratada entre la no tratada con urea, y en el Western blot se define por la diferencia de bandas obtenidas en la muestra no tratada con las de la muestra tratada con urea.⁶⁷

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La toxoplasmosis congénita representa un problema importante de salud pública en nuestro país,^{18,28,71,72,73} por lo tanto el diagnóstico de la infección por *Toxoplasma gondii* requiere de pruebas de alta sensibilidad y especificidad; además, se recomienda confirmar un resultado por medio de dos o más pruebas validadas en el laboratorio.

Clínicamente, el diagnóstico de la toxoplasmosis tiene impacto si es capaz de definir la fase de la infección, pues durante la etapa aguda ocurre la diseminación rápida del parásito, causa principal de los daños a diversos órganos y tejidos.

Además, el tratamiento existente presenta un alto grado de toxicidad, por lo que es necesario un claro diagnóstico de la enfermedad, razón por la cual es importante tener varios métodos que permitan conocer de manera eficiente la fase aguda de la infección.

Por lo anterior, se han desarrollado estrategias para determinar la fase de la infección en casos sero-positivos. La primera consiste en titular los anticuerpos IgG en muestras seriadas, y determinar si los títulos de estos anticuerpos están aumentando, lo cual nos indica que se trata de una infección aguda o una reactivación. La prueba presenta limitaciones cuando no se cuenta con dos tomas seriadas del mismo paciente o la definición de la fase es urgente.^{49,50}

La segunda es la prueba de avidéz; este ensayo puede darnos una indicación de la fase de infección con una sola muestra, lo que permite tomar decisiones terapéuticas más tempranamente.⁶⁷ Sin embargo, este ensayo sólo se ha desarrollado para muestras de suero. Siendo de gran importancia su desarrollo también en muestras de sangre total embebida en papel filtro, pensando en las muestras provenientes del tamiz prenatal (proyecto de recién inicio) y del tamiz postnatal, que abarcan a los dos grupos de la población susceptibles de la forma de infección en estudio.

Por lo tanto es necesario que en los laboratorios en los que se diagnostica la infección por este parásito, se cuente con un ensayo de avidéz adaptado tanto a muestras de suero como de sangre embebida en papel filtro.

Así mismo, resulta relevante establecer la relación de los resultados de las pruebas presuntivas de infección aguda por *Toxoplasma gondii* con los del ensayo de avidéz que es una prueba confirmatoria, para saber que tan confiables son éstas para orientar sobre el riesgo de un caso de estar en fase aguda de infección.

OBJETIVO

Determinar infección aguda y crónica por *Toxoplasma gondii* en grupos de riesgo por medio de un ensayo de avidéz de anticuerpos IgG

HIPOTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

Los resultados del ensayo de avidéz confirmarán la etapa de infección en la que se encuentran los casos clasificados por las pruebas presuntivas, demostrando cuales de éstas son las más confiables para establecer el riesgo de infección aguda.

HIPÓTESIS PARTICULARES

Los resultados de avidéz de suero y de sangre total embebida en papel filtro tendrán una correlación mayor a 0.9

La diferencia de títulos de anticuerpos IgG entre muestras seriadas de un mismo paciente será mejor que la IgM positiva o la diferencia en respuesta a distintas concentraciones de antígeno, para predecir infección aguda, demostrada por la prueba de avidéz.

METODOLOGIA

TIPO DE ESTUDIO

Transversal, prospectivo, observacional y comparativo

ESTRATEGIA GENERAL

FASE I. Clasificación de las muestras.

Se utilizaron principalmente muestras de suero y de sangre total embebida en papel filtro de mujeres embarazadas, de neonatos y otros casos con evidencia de infección por *T. gondii* las cuales provienen tanto del Instituto Nacional de Pediatría como del Instituto Nacional de Perinatología.

Las muestras fueron obtenidas de un banco de sueros, previamente probadas por diferentes ensayos inmunológicos para determinar la infección por este parásito (presencia de IgM, IgA o IgG), estas pruebas sirvieron como presuntivas para establecer el criterio bajo el cual se clasificaron como agudas o crónicas.

Las muestras de sangre embebida en papel filtro provenientes del Instituto Nacional de Perinatología, fueron probadas por un estuche comercial de captura para IgM específicos de *Toxoplasma* (Lab System) y confirmadas por Western blot. A las pacientes que resultaron positivas a IgM (≥ 10 UI/mL), se les solicitó una segunda muestra con una diferencia de 15 a 30 días entre tomas, para realizar comparación del título de anticuerpos IgG entre ambas muestras, usando ELISA indirecto.

Se clasificaron los casos como probablemente en riesgo de pertenecer a una de las etapas de infección bajo los siguientes criterios:

Presencia de anticuerpos IgM

El primer criterio fue basado en el nivel de anticuerpos IgM:

1. IgM < 10.0 UI/mL (pero positivo a IgG). Casos clasificados como crónicos.
2. $10.0 \text{ UI/mL} \leq \text{IgM} < 20 \text{ UI/mL}$. Casos clasificados como indeterminados.
3. IgM $\geq 20 \text{ UI/mL}$. Casos clasificados como agudos.

Respuesta de anticuerpos IgG al extracto crudo y a la p30 como antígeno

Se incluyeron en esta clasificación todas las muestras en las cuales se contó con los valores de anticuerpos IgG obtenidos por ELISA indirecto, usando como antígeno tanto el extracto crudo como la proteína p30. El extracto crudo es una mezcla de antígenos internos del parásito, para los cuales se espera una respuesta inmunológica más tardía, y que por ende se asocia a infección crónica, mientras que la p30 es la proteína más abundante en la superficie del taquizoito (fase de replicación rápida presente en etapa aguda), por lo que se espera que los anticuerpos contra ésta aparezcan temprano después de la infección.^{52,53}

Para esta clasificación los rangos de valores usados fueron:

1. Respuesta alta para la proteína P30 (>0.5) y respuesta baja para el extracto crudo (<0.5). Muestras clasificadas como agudas.
2. Alta respuesta al extracto crudo (>0.5) y baja respuesta a la proteína P30(<0.5). Muestras clasificadas como crónicas.
3. Respuesta igual al extracto crudo que a la proteína P30, en niveles bajos (< 0.5). Muestras clasificadas como indeterminadas.

Los anticuerpos del recién nacido para el diagnóstico de fase aguda en la madre

Los anticuerpos IgM, IgA e IgG presentes en el recién nacido se usaron para clasificar la posible etapa de infección en la que se encontraba la madre, y fueron los siguientes.^{48,50,67,68,74,75,76}

1. Recién nacido con presencia de IgM o IgA (en conjunto se consideran indicativas de infección hiperaguda) = mamá en infección aguda.
2. Recién nacido con presencia de IgM, IgA e IgG = mamá en infección intermedia.
3. Recién nacido con presencia sólo de IgG = mamá en infección crónica.

Diferencia en títulos de anticuerpos IgG entre muestras seriadas

Las muestras que se consideraron en esta clasificación fueron en las que se contaba con más de una toma del mismo paciente. Los criterios de clasificación fueron:

- Títulos de IgG de la 2ª toma ≤ 2.0 Caso clasificado como crónico.
Títulos de IgG de la 1ª toma
- Títulos de IgG de la 2ª toma > 2.0 La 1ª toma se clasificó como aguda.
Títulos de IgG de la 1ª toma

Diferencia en títulos de anticuerpos IgG con dos concentraciones de antígenos

En los casos en los que no se contó con las dos o tres muestras seriadas, se optó por realizar la titulación de las muestras usando dos concentraciones de antígeno: 0.5 ug/mL y 2.0 ug/mL, con el fundamento teórico de que si se aumenta la concentración de antígeno en el ensayo, se aumentan los sitios de unión disponibles para los anticuerpos de menor afinidad, y por ende, la probabilidad de que éstos que se encuentran en mayor concentración en las muestras de baja avidéz, se unan dando como resultado una absorbancia más alta en los ensayos con alta concentración de antígeno con respecto a los ensayos con baja concentración. Por lo tanto, se tomó el siguiente criterio:

- Título Ag 2.0 ug/mL > 2.0 Casos agudos.
Títulos Ag 0.5 ug/mL

- Título Ag 2.0 ug/mL ≤ 2.0 Casos crónicos.
Título Ag 0.5 ug/mL

FASE II. Adaptación del ensayo de avidéz

Para la adaptación del ELISA indirecto para IgG como ensayo de avidéz en suero se determinó la concentración óptima del antígeno, así como de las diluciones de la muestra que permitieran discernir mejor entre los casos agudos, intermedios y crónicos. Una vez adaptado el ensayo anterior, se continuó con el de papel filtro, tomando como base las condiciones del ensayo en suero ya que no se encuentra reportado en la literatura el uso del método de avidéz en muestras de papel filtro.

FASE III. Determinación de la relación entre las pruebas presuntivas y el ensayo de avidéz.

Una vez probadas todas las muestras se compararon los resultados del ensayo de avidéz con la clasificación de las muestras, para corroborar los casos en infección aguda, crónica e indeterminada/intermedia.

Así mismo, se estableció la relación de los resultados de las pruebas presuntivas con los ensayos de avidéz, cuales son las que permiten una mejor predicción de la etapa de infección en la que se encuentra cada caso.

METODOS DE LABORATORIO

Obtención del antígeno

Mantenimiento de la cepa de *Toxoplasma gondii* in vivo

El antígeno usado en este estudio se produjo a partir de parásitos de la cepa RH de *T. gondii* que se mantuvieron por medio de pases en peritoneo de

ratones de la cepa Balb/c. El manejo y cuidado que se dio a los animales dentro del procedimiento experimental fue realizado conforme a la NOM-062-ZOO-1999 y a los lineamientos internos del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría. La infección se realizó inoculando 6 ratones por semana con 10^5 parásitos por vía intra-peritoneal; a los dos días se cosecharon los parásitos del peritoneo por punción con jeringa estéril y se sacrificaron humanitariamente por dislocación cervical.

Antígeno crudo

Para el ELISA, los parásitos obtenidos del exudado peritoneal de los ratones, se resuspendieron en solución de NaCl 0.15 M, amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.4 (PBS) y se centrifugaron a 1,200 rpm 5 min, para quitar detritus celular; si era necesario, se centrifugaba a baja velocidad hasta obtener un grado de pureza >95% de los taquizoitos. Se resuspendieron en una solución comercial (Sigma) que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Dentro de un recipiente con hielo se sonicaron 3 veces a 7 hz por periodos de 1 minuto con descansos intermedios de 5 minutos. El sonicado se centrifugó a 30,000 x g durante 1 hora a 4° C; el sobrenadante se fraccionó y se almacenó a -70°C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford con el reactivo comercial de Bio-Rad (Bradford, 1976).⁷⁷

Sag1 (P30)

El antígeno p30 fue adquirido de una casa comercial. Viene a una concentración de 20 mg/mL.

ELISA para detección de anticuerpos IgM

Para la detección de los anticuerpos de clase IgM se empleó un ELISA comercial (Labsystems) de captura. En este estuche comercial se empleó sangre absorbida en papel filtro de los pacientes. El principio de esta prueba se basa en un inmunoensayo enzimático de captura en fase sólida. En la superficie de las placas de poliestireno se encuentran adsorbidos anticuerpos anti-IgM. A éstas se les adicionan las muestras de los pacientes y a continuación se agrega el extracto antigénico de *T. gondii* (principalmente p30), que se unen a los anticuerpos IgM. Por último se adiciona el conjugado anti-

p30 fijado a peroxidasa. Se revela con un sustrato fluorescente; la reacción se detiene con ácido sulfúrico. La intensidad de la fluorescencia es convertida automáticamente a Unidades Internacionales por mililitro.

Titulación de anticuerpos por ELISA indirecto

Se usó un procedimiento estándar: se colocaron en placas de fondo plano para ELISA (Maxisorp, NUNC) 100 μ L/pozo del antígeno de *T. gondii* en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.0 (a la concentración requerida por cada ensayo 0.5 ó 2.0 μ g/mL), y se incubó durante toda la noche a 4° C. Los lavados se realizaron 3 veces con 200 μ L/pozo de PBS con Tween 20 al 0.3% v/v (PBS-T), durante 5 minutos y 2 veces con PBS. Se incubó con albúmina bovina al 1.0% en PBS-T durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar otras 5 veces, las muestras problema se preparan partiendo de una dilución 1:100 en PBS-Tween 0.3 % v/v para el caso de las muestras de sueros y 1 perforación de 3mm de diámetro (equivalente a 5 μ L de sangre)/ 200 μ L de PBS- Tween 0.3% v/v, en el caso de las muestras de sangre total embebida en papel filtro, a partir de la cual se realizaron 7 diluciones dobles seriadas en PBS-T y se incubaron, durante 2 horas a 37°C. Después de lavar 5 veces se añadieron 100 μ L/pozo del conjugado correspondiente (se emplean conjugados comerciales de peroxidasa-anticuerpos contra la inmunoglobulina G, a la dilución establecida en ensayos previos de titulación, en este caso 1: 1000 en PBS-Tween). Se incubó 2 horas a 37°C y se hicieron 3 lavados con PBS-Tween y 2 con PBS. Para revelar la reacción se añadieron 100 μ L/pozo de la solución de sustrato/cromógeno que contiene, por cada 10 mL de una solución 0.1M de citratos: 4.5 μ l de H₂O₂ al 30%, y 4.5 mg de O-fenilendiamina. Se incubó durante un máximo de 30 min, y se detuvo la reacción con 50 μ L/pozo de H₂SO₄ 1.0 N. Se registró la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA.

ELISA de avides para IgG

En este ELISA el antígeno se utilizó a la concentración requerida para cada

ensayo durante su adaptación (0.5, 1.0 ó 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), las condiciones de incubación, lavados, incubación con albúmina y lavados se realizaron igual al procedimiento descrito arriba. Las muestras fueron colocadas por duplicado partiendo de las diluciones mencionadas durante el estudio, para suero 1:50 y 1:100 y para sangre total embebida en papel filtro 1 perforación de 3mm de diámetro (5 μL de sangre)/ 200 μL de PBS-Tween, pero sólo se realizaron a partir de éstas, 3 diluciones dobles seriadas. Después de incubadas las muestras 2 horas a 37° C, se realizó un lavado con PBS-Tween, para eliminar el exceso de muestra. La urea 6M u 8M preparada en PBS-T (al 0.3%) se añadió e incubó durante 30 min o se realizaron 3 lavados de 5min. Después del tratamiento con urea, se realizaron 5 lavados normales. A partir de este paso los siguientes se realizaron de igual forma que en ELISA de titulación. Los resultados de avidéz de cada muestra, se obtienen dividiendo la absorbancia de la muestra tratada con urea, entre su absorbancia sin urea.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Todos los procedimientos estadísticos y de graficación se realizaron utilizando los programas de cómputo SPSS versión 12.0 y Excell versión 6.0. Para comparar los resultados de avidéz obtenidos entre los grupos clasificados con base en los criterios establecidos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la U de Mann-Whitney. Las relaciones entre las diferentes condiciones de tratamiento o entre los dos tipos de muestra se establecieron por medio de la correlación lineal (R), usando la prueba de Pearson como prueba estadística. Para medir la asociación entre las pruebas presuntivas usadas en la clasificación de muestras y la avidéz (o fase de infección) se usaron tablas de contingencia 2 x 2 ó 3 x 3, χ^2 o Fisher exacta para determinar la significancia estadística, considerando una $P < 0.05$ significativa.⁷⁸

RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de este trabajo fue determinar infección aguda y crónica por *Toxoplasma gondii* en grupos de riesgo, por medio de un ensayo de avidéz en muestras de suero y de sangre embebida en papel filtro. Para ello se adaptó un ELISA indirecto para determinación de anticuerpos IgG en forma de una prueba de avidéz.

ADAPTACIÓN DEL ELISA DE TITULACIÓN DE IgG COMO ENSAYO DE AVIDEZ

a) Muestras de suero

Una vez clasificadas las muestras de suero como agudas, crónicas o intermedias, se probaron por avidéz. De acuerdo a lo reportado en la literatura para este tipo de ensayos, las concentraciones de urea usadas son 6M y 8M; también se reportan cuatro diluciones seriadas de la muestra, las cuales en su mayoría inician con 1:25; para la concentración de antígeno no se encontraron reportes.^{68,69,79} Basándose en lo anterior, las condiciones seleccionadas para el primer ensayo fueron:

- Concentraciones de antígeno de 0.5, 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$
- Muestra de suero: cuatro diluciones seriadas partiendo de 1:50, ya que en el caso del presente estudio la cantidad de muestra era limitada.
- Concentración de urea de 6M, realizando sólo lavados.
- Conjugado anti - IgG humano 1:1000, dilución previamente estandarizada.

Con las primeras 25 muestras, los resultados de avidéz mostraron que las concentraciones de antígeno de 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$ permiten diferenciar entre etapa aguda y crónica ($P < 0.05$) no así la de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ($P = 0.86$) (figura 5). También se encontró alta correlación entre ambas concentraciones de antígeno (figura 6). Por otro lado, se encontraron los mejores resultados en las diluciones 1:100 y 1:200; la dilución inicial de 1:50 resultó demasiado concentrada, provocando fondo en los resultados.

Se establecieron los rangos de avidéz para cada etapa de infección, los cuales difieren de los reportados en la literatura (<0.15= caso en fase aguda, 0.15-0.29= caso intermedio o indeterminado y >0.3= caso en fase crónica):

- Avidéz ≤ 0.5 = caso en fase aguda.
- $0.5 < \text{Avidéz} \leq 0.65$ = caso intermedio o indeterminado.
- Avidéz > 0.65 = caso en fase crónica.

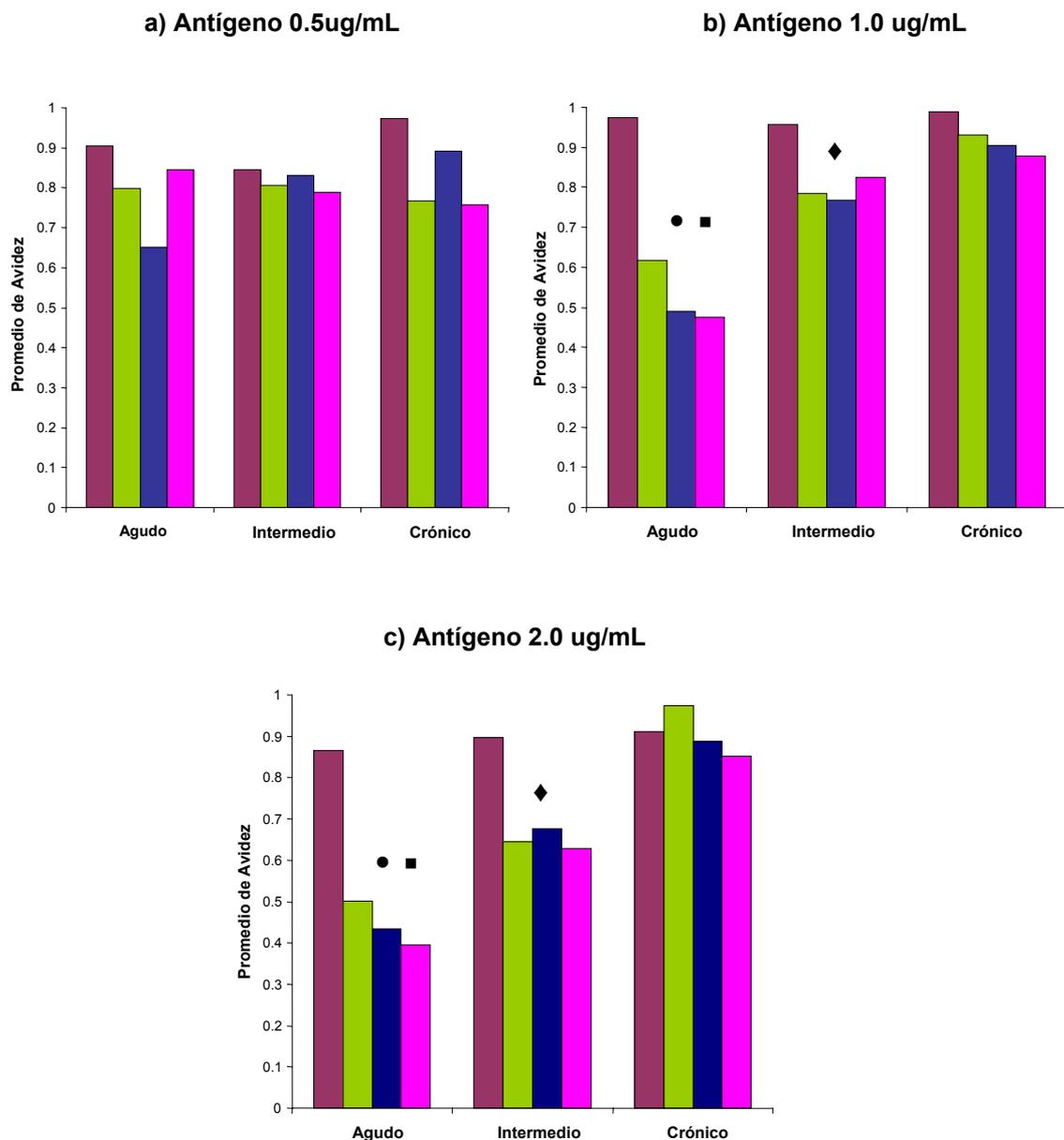


Figura 5. Gráficos que muestran los resultados de avidéz para las diferentes condiciones de tratamiento del primer ensayo. Color púrpura = dilución 1:50, Color verde = dilución 1:100, Color azul = dilución 1: 200 y Color rosa = dilución 1:400. • = $P < 0.05$ entre casos agudos y crónicos, ◻ = $P < 0.05$ entre casos agudos-intermedios, ♦ = $P < 0.05$ entre casos intermedios-crónicos.

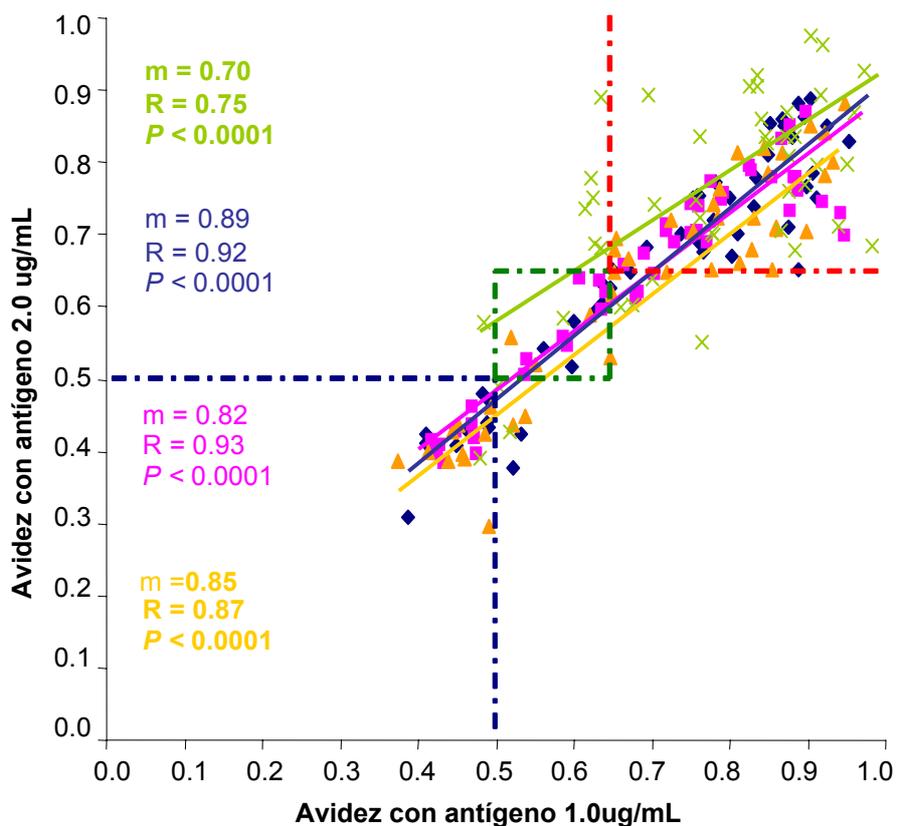


Figura 6. Correlación entre dos concentraciones de antígeno en la prueba de avididad para muestras de suero. Color verde= 1ª dilución (1: 100), color azul = 2ª dilución (1:200), color rosa = 3ª dilución (1:400) y color amarillo = 4ª dilución (1:800). Líneas punteadas azules = zona de casos agudos, Líneas punteadas verdes = zona de casos intermedios y Líneas punteadas rojas = zona de casos crónicos.

De los casos que se corroboraron en cada una de las etapas de infección por sus valores de avididad, se eligieron algunos sueros para ser usados como controles durante el siguiente ensayo. Este grupo contó con 4 muestras agudas, 3 intermedias y 4 crónicas. A estos sueros se les sometió al ensayo de avididad pero bajo condiciones más estrictas de urea: 6M incubada 30 min, 8M sólo para los lavados y 8M incubada 30 min), para disminuir el valor de avididad límite para considerar los casos agudos, esperando que los casos intermedios se definieran en alguno de los extremos y que los casos crónicos se mantuvieran con valores altos.

Los resultados de este ensayo mostraron que la correlación más alta fue nuevamente entre las dos condiciones de antígeno (1.0 y 2.0 ug/mL), pero a las diluciones 1:200 y 1:400 (no mostrado).

También se observó que los valores de avidéz para los casos agudos disminuyeron cuanto más se aumentó la concentración de urea y el tiempo de tratamiento, pero también disminuyeron los valores de avidéz para las muestras intermedias y las crónicas (figura 7). Sin embargo, a la concentración de antígeno de 2.0 ug/mL se observó una mejor separación de valores entre sueros agudos e intermedios-crónicos, siendo las mejores condiciones de urea la incubación con urea 6M durante 30 min o lavando con urea 8M (figura 7).

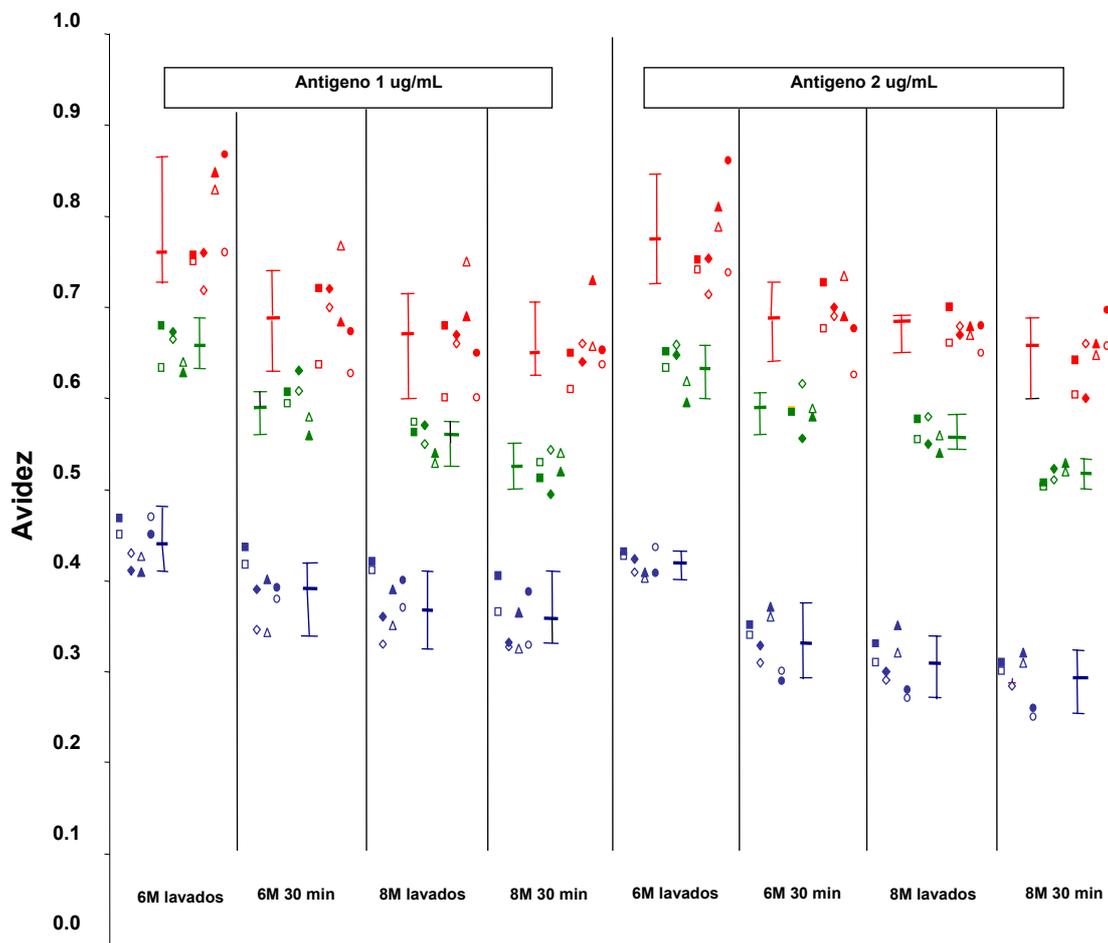


Figura 7. Resultados de avidéz de los controles donde se comparan diferentes tratamientos de los sueros tanto de antígeno como de urea. Azul = muestras agudas, Verde = muestras intermedias y Rojo = muestras crónicas. Figura rellena, dilución 1:200; figura vacía, dilución 1:400. Misma figura y mismo color = misma muestra. Línea gruesa = mediana, barras delgadas = percentil 5 y 95.

Para confirmar estos resultados, se calcularon las medianas de avidéz de las muestras de cada etapa de infección para las diferentes condiciones del ensayo, las cuales muestran que las diferencias entre las distintas condiciones no fueron relevantes ya que no rebasaron en ningún caso las centésimas de punto (cuadro 1).

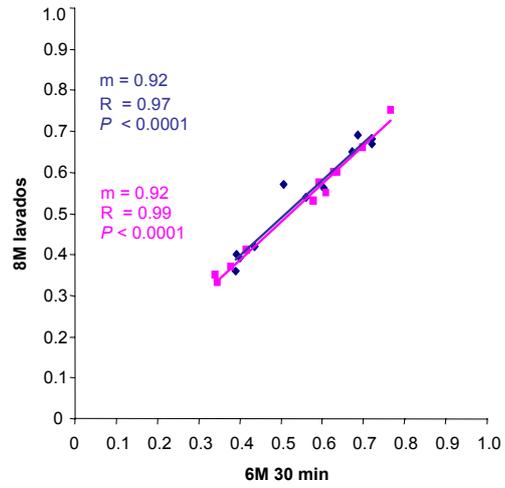
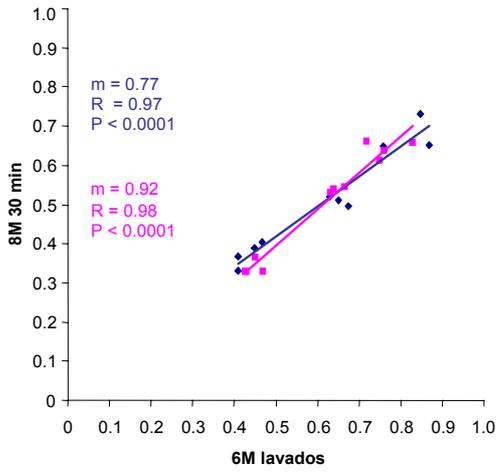
Cuadro 1. Comparación numérica entre valores de avidéz de las diferentes etapas de infección para los tratamientos aplicados.

	Ag 1 ug/mL				Ag 2 ug/mL				max dif a 1ug/mL	max dif a 2ug/mL	Diferencia 2-1 ug/mL
	6M lavados	6M 30min	8M lavados	8M 30min	6M lavados	6M 30min	8M lavados	8M 30min			
Agudos-Intermedios	0.21	0.21	0.18	0.17	0.22	0.25	0.25	0.23	0.21	0.25	0.040
Intermedios-Crónicos	0.13	0.09	0.11	0.13	0.14	0.10	0.11	0.13	0.13	0.14	0.002
Agudos-Crónicos	0.35	0.30	0.28	0.30	0.35	0.36	0.37	0.36	0.35	0.37	0.020

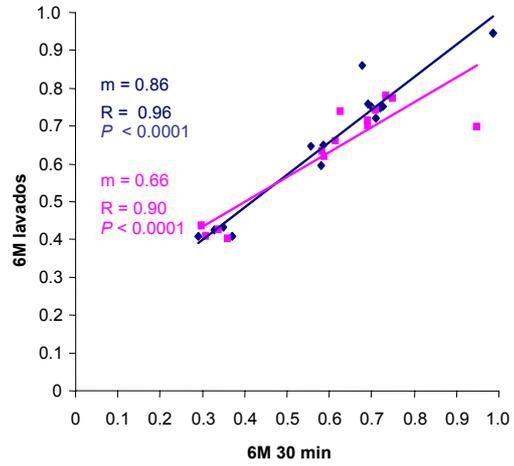
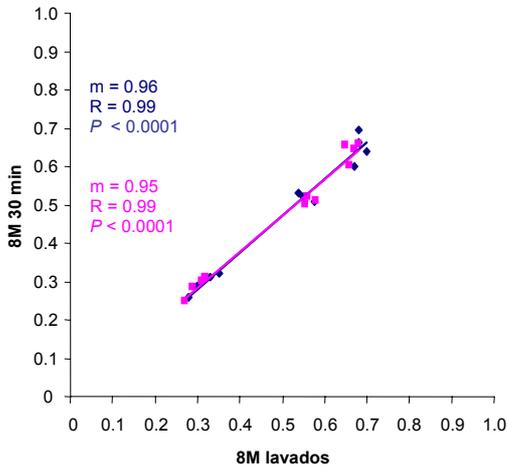
Posteriormente se probaron al azar el resto de las muestras del estudio pertenecientes a las diferentes etapas de infección, bajo todas o algunas de estas condiciones.

Se observaron altas correlaciones con significancia estadística ($R > 0.91$; $P < 0.0001$), tanto entre diferentes condiciones de urea para una misma concentración de antígeno, como entre diferentes concentraciones de antígeno para una misma condición de urea. Algunos ejemplos de estos resultados se muestran en la figura 8.

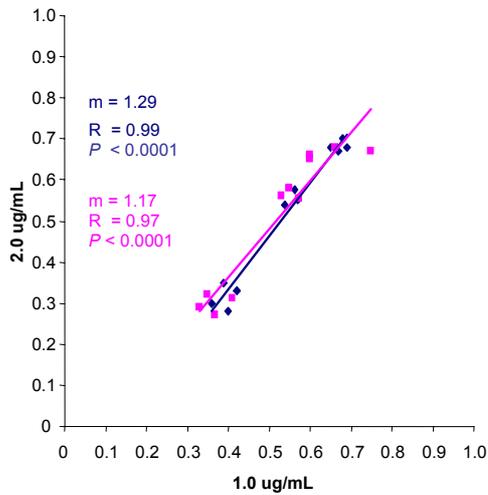
Antígeno 1.0 µg/mL



Antígeno 2.0 µg/mL



8M lavados.



6M incubada 30min.

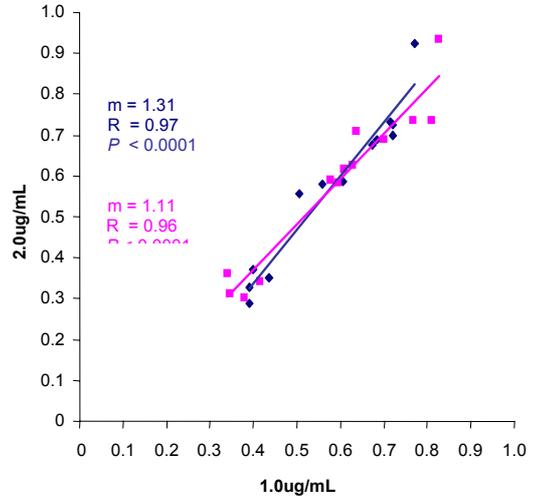


Figura 8. Gráficos de correlaciones del ensayo de avides entre condiciones de urea para la concentración de antígeno 2.0 ug/mL. Azul = 2ª dilución, Rosa = 3ª dilución.

Con el uso de diagramas de caja se observaron las tendencias de los valores de avidéz con respecto a las etapas de infección en las diferentes condiciones de tratamiento. Al aplicar el análisis estadístico correspondiente, las diferencias observadas entre los valores de avidéz de cada grupo de muestras, resultaron ser significativas (figuras 9 y 10). En la concentración de urea 6M a las dos condiciones aplicadas (incubada 30 min o sólo usada para lavar), las diferencias fueron mayores entre los grupos, para concentraciones de antígeno.

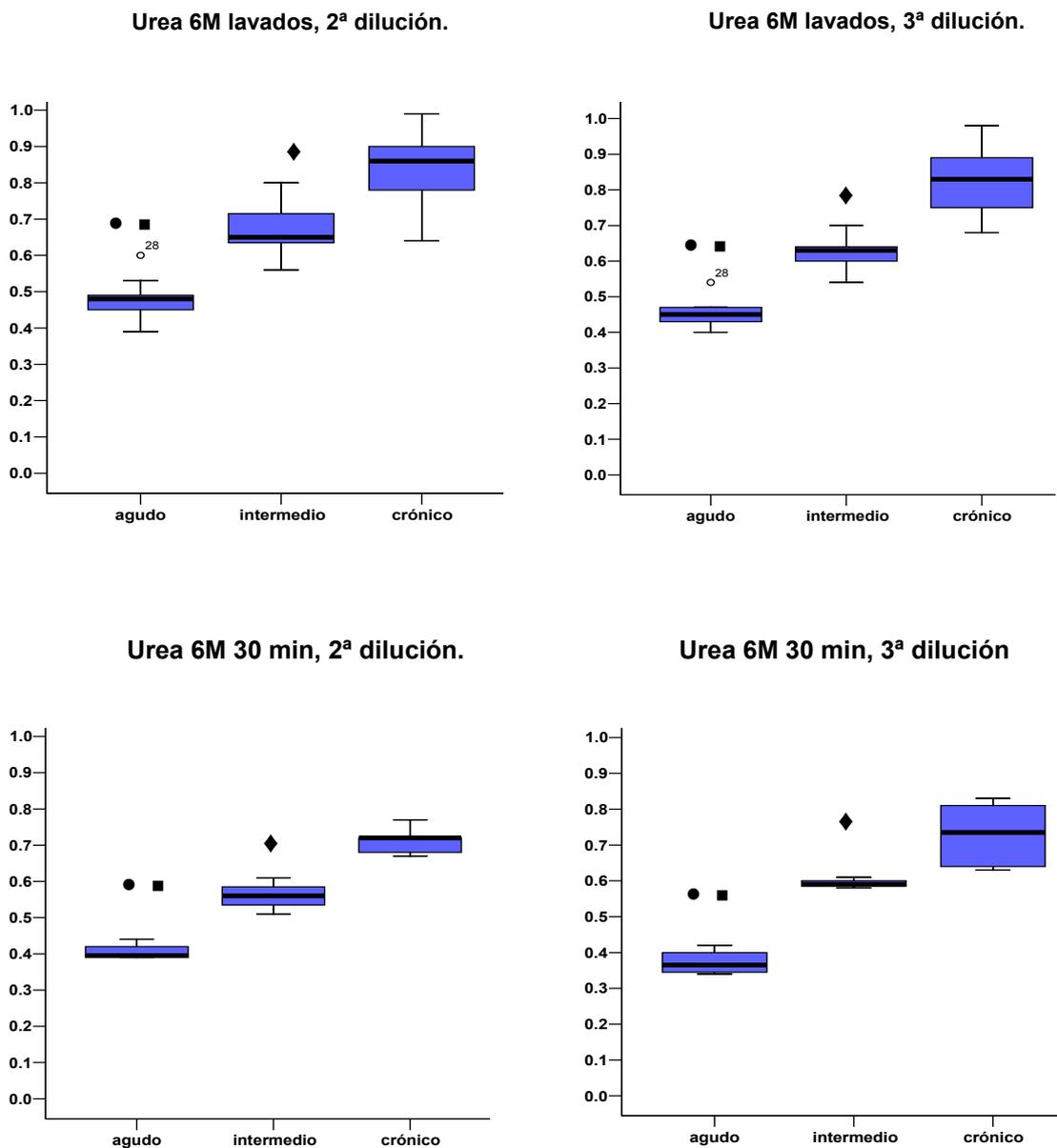
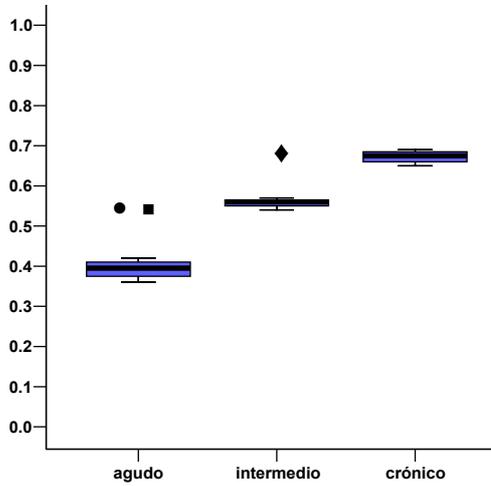
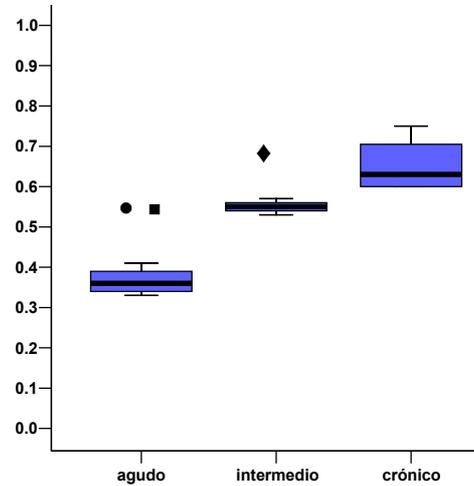


Figura 9 a. Diagramas que muestran la distribución que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para los diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 1.0 ug/mL. • = $P < 0.05$ entre casos agudos y crónicos, ◻ = $P < 0.05$ entre casos agudos-intermedios, ◊ = $P < 0.05$ entre casos intermedios-crónicos

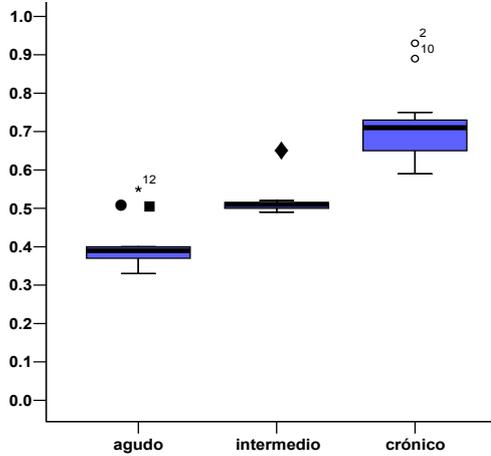
Urea 8M lavados, 2ª dilución.



Urea 8M lavados 3ª dilución.



Urea 8M 30 min, 2ª dilución.



Urea 8M 30 min, 3ª dilución.

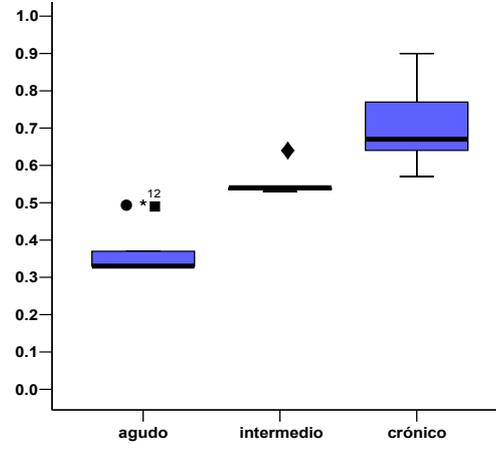
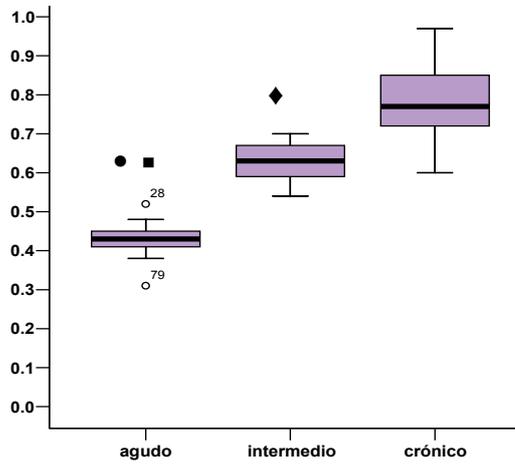
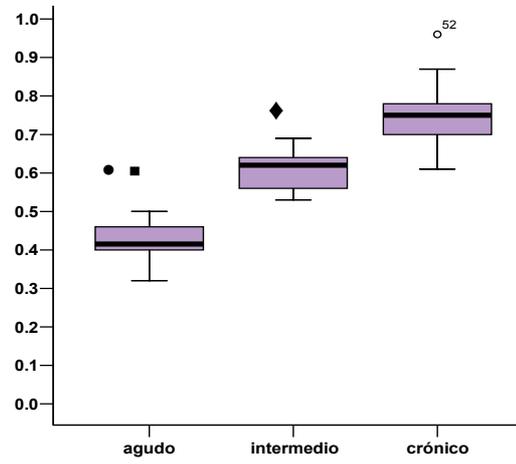


Figura 9 b. Diagramas que muestran la distribución que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para los diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 1.0 ug/mL. • = $P < 0.05$ entre casos agudos y crónicos, ■ = $P < 0.05$ entre casos agudos-intermedios, ♦ = $P < 0.05$ entre casos intermedios-crónicos

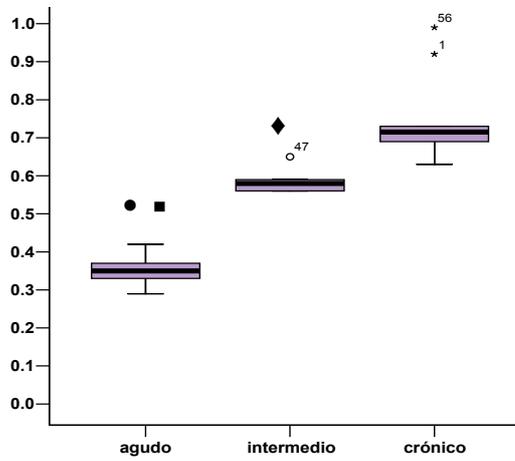
Urea 6M lavados, 2ª dilución.



Urea 6M lavados, 3ª dilución.



Urea 6M 30 min, 2ª dilución.



Urea 6M 30 min, 3ª dilución.

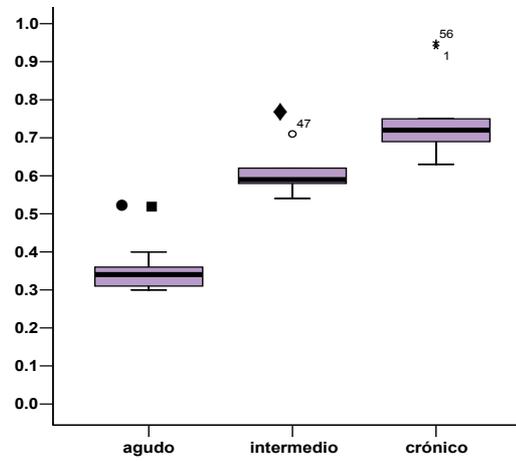
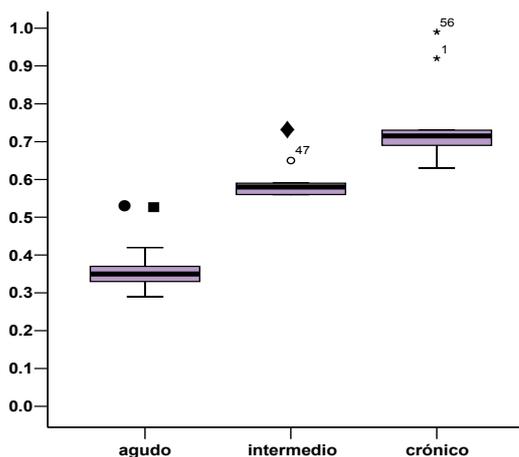
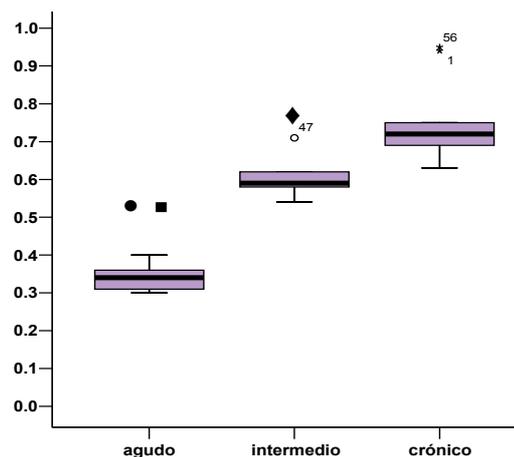


Fig 10 a. Diagramas que muestran las tendencias que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para los diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 2.0 ug/mL. • = P < 0.05 entre casos agudos-crónicos, * = P < 0.05 entre casos agudos-intermedios, ♦ = P < 0.05 entre casos intermedios-crónicos

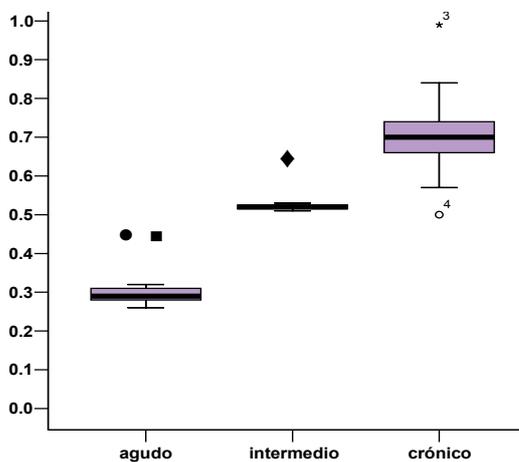
Urea 8M lavados, 2ª dilución.



Urea 8M lavados 3ª dilución.



Urea 8M 30 min, 2ª dilución.



Urea 8M 30 min, 3ª dilución.

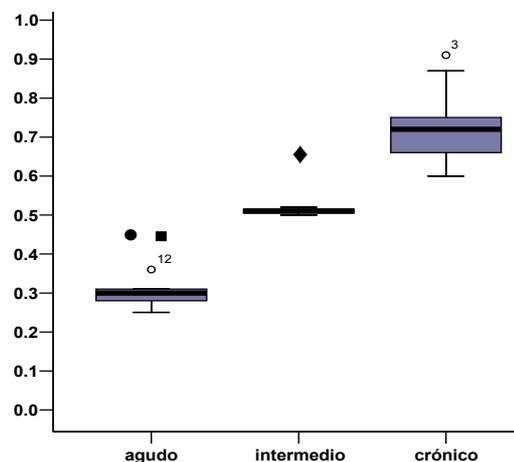


Fig 10 b. Diagramas que muestran las tendencias que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 2.0 ug/mL. • = P < 0.05 entre casos agudos-crónicos, ◻ = P < 0.05 entre casos agudos-intermedios, ◆ = P < 0.05 entre casos intermedios-crónicos

Finalmente se calcularon los rangos de valores de avidéz para las diferentes condiciones del ensayo (cuadro 2), que permitieron distinguir entre casos pertenecientes a diferentes etapas de infección (agudo, intermedio y crónico).

Cuadro 2. Rangos de valores de avidéz para todas las condiciones de tratamiento aplicadas al ensayo.

CASOS	Avidéz antígeno 1 ug/mL				Avidéz antígeno 2 ug/mL			
	6M lavados	6M 30 min.	8M lavados	8M 30 min	6M lavados	6M 30 min	8M lavados	8M 30 min
Agudos	< 0.50	< 0.45	0.45	< 0.40	<0.45	< 0.40	<0.35	< 0.30
Intermedios	0.51 - 0.70	0.46 -0.65	0.46 - 0.60	0.41 -0.55	0.46 - 0.65	0.41 -0.62	0.36 - 0.60	0.30 - 0.55
Crónicos	> 0.70	> 0.65	> 0.60	> 0.55	> 0.65	> 0.62	> 0.60	> 0.55

b) Muestras de sangre total embebida en papel filtro

Titulación para anticuerpos IgG

Al finalizar la primera parte del proyecto de tamiz prenatal se contó con un total de 80 pacientes que presentaron infección por *Toxoplasma gondii*, las cuales fueron positivas a IgM por el estuche comercial (Labsystem) y corroboradas por Western blot. De estas pacientes se contaba por lo menos con una muestra y de algunas con dos o más.

A todas se les realizó titulación de IgG por ELISA indirecto bajo las dos condiciones de antígeno descritas anteriormente.

Del total de las pacientes se encontraron 12 casos en los cuales se observaron aumentos en los títulos de IgG (Figs 11 y 12), ya sea en la misma toma, pero evaluada a diferentes concentraciones de antígeno, o entre tomas, y en algunos casos sucedieron ambas cosas.

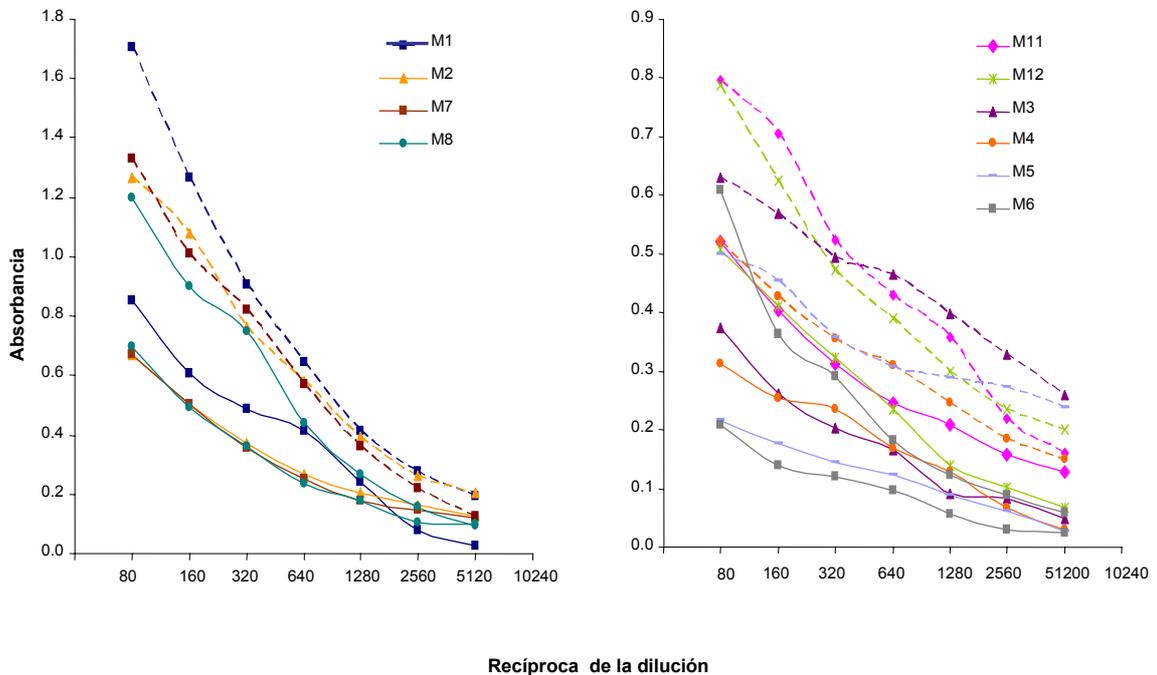


Figura 11. Ejemplos de resultados de la titulación de IgG por ELISA de una sola toma a diferentes concentraciones de antígeno. M= muestra. T= número de toma. Línea continua = concentración de antígeno 0.5 mg/mL, línea punteada = concentración de antígeno 2.0 mg/mL

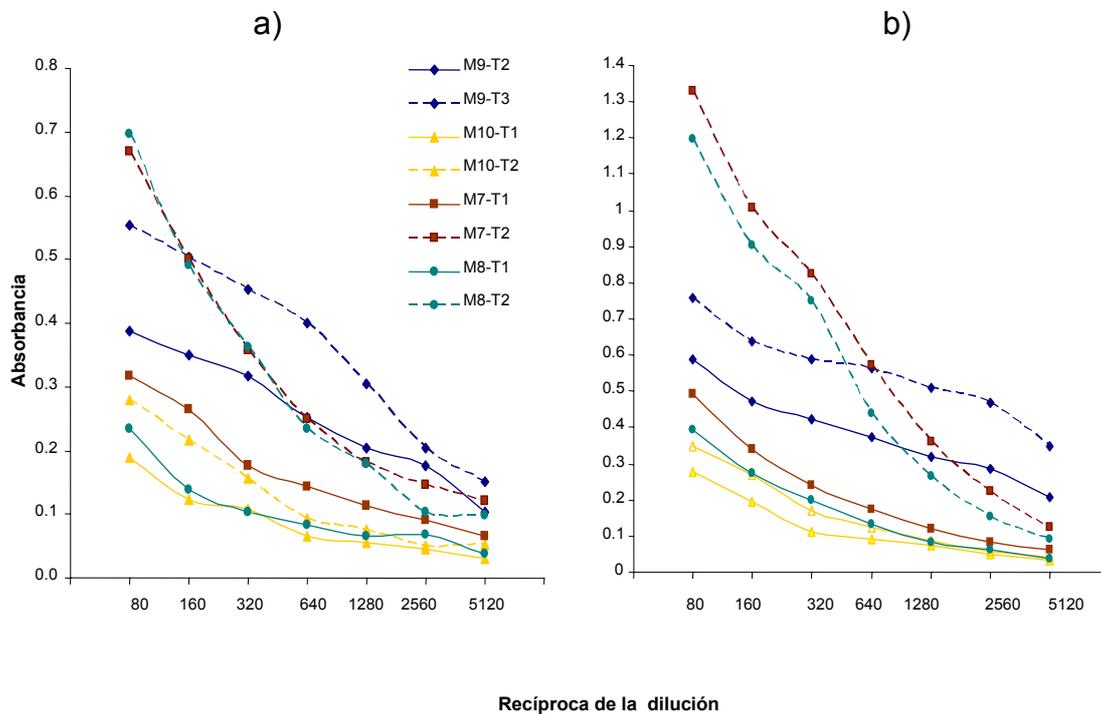


Figura 12. Resultados de la titulación de IgG por ELISA de dos tomas consecutivas de una misma paciente. a) Titulación con antígeno de concentración 0.5 µg/mL, b) Titulación con antígeno de concentración 2.0 µg/mL. M = muestra, T = número de toma.

Ensayo de avidéz

Para muestras de sangre completa embebida en papel filtro se encontraron reportes insuficientes en la literatura en cuanto al ensayo de avidéz de anticuerpos IgG se refiere;^{80,81} por lo tanto, para la adaptación del ELISA indirecto de IgG ya estandarizado no se contó con más punto de referencia que los resultados obtenidos para el ensayo en muestras de suero, de la presente tesis. Una vez clasificadas las muestras en alguna de las etapas de infección (aguda, intermedia o crónica) con base en los resultados de las pruebas presuntivas, se sometieron al ensayo de avidéz.

Las condiciones de los primeros ensayos fueron:

- Concentración de urea 6M aplicando sólo lavados.

- Concentraciones de antígeno 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$
- Muestra a cuatro diluciones seriadas, partiendo de 1 perforación (3mm de diámetro equivalente aproximadamente a $5\mu\text{L}$ de sangre) en 200 μL de PBS-Tween 0.3 %, que corresponde a una dilución aproximada de 1:80.

Bajo estas condiciones se probaron 18 muestras. Los resultados obtenidos mostraron que no debía eliminarse ninguna de las diluciones, ni tampoco aumentarlas ya que las usadas permitieron diferenciar entre muestras agudas, intermedias y crónicas. También se encontró alta correlación entre ambas concentraciones de antígeno (figura 13). Por otro lado, se encontraron mejores resultados a partir de la dilución 1: 80 (2ª dilución); la dilución inicial de 1:40 presentó una correlación baja entre concentraciones de antígeno, por lo que su valor se omitió en los resultados posteriores.

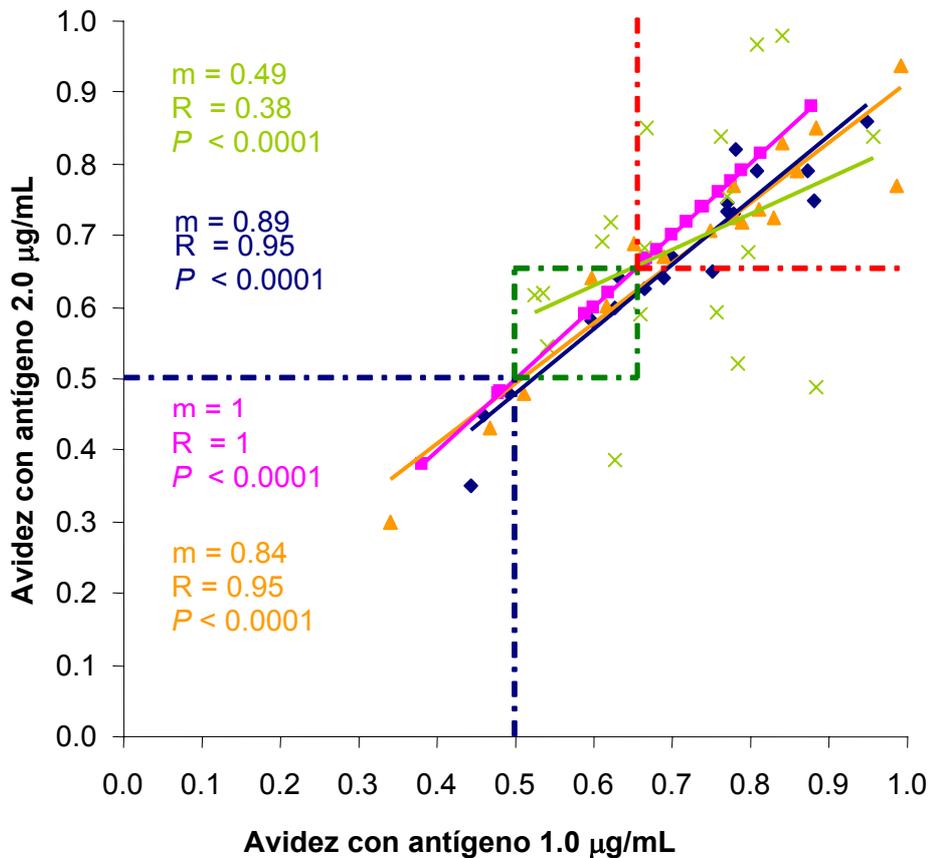


Figura 13. Resultados comparativos de avidéz para muestras de sangre embebida en papel filtro a dos concentraciones de antígeno. Verde= 1ª dilución, Azul = 2ª dilución, Rosa = 3ª dilución y Amarillo= 4ª dilución. Líneas punteadas azules = zona de casos agudos, Líneas punteadas verdes = zona de casos intermedios y Líneas punteadas rojas = zona de casos

De los resultados obtenidos, se eligió un grupo de muestras en las cuales coincidiera su clasificación con los resultados de avidéz para las dos concentraciones de antígeno, y estuvo constituido por 3 casos agudos, 3 intermedios y 3 crónicos. Estos controles se probaron nuevamente a las dos concentraciones de antígeno y con las mismas diluciones de muestra, pero con las siguientes condiciones de urea:

- Urea 6M solo lavados
- Urea 6M incubada 30 min.
- Urea 8M solo lavados
- Urea 8M incubada 30 min.

En la figura 14 se muestran los valores de avidéz de la 2^a y 3^a dilución ya que son las que presentaron, al igual que en muestras de suero, la mejor correlación entre las dos concentraciones de antígeno (figura 13, mostrada anteriormente).

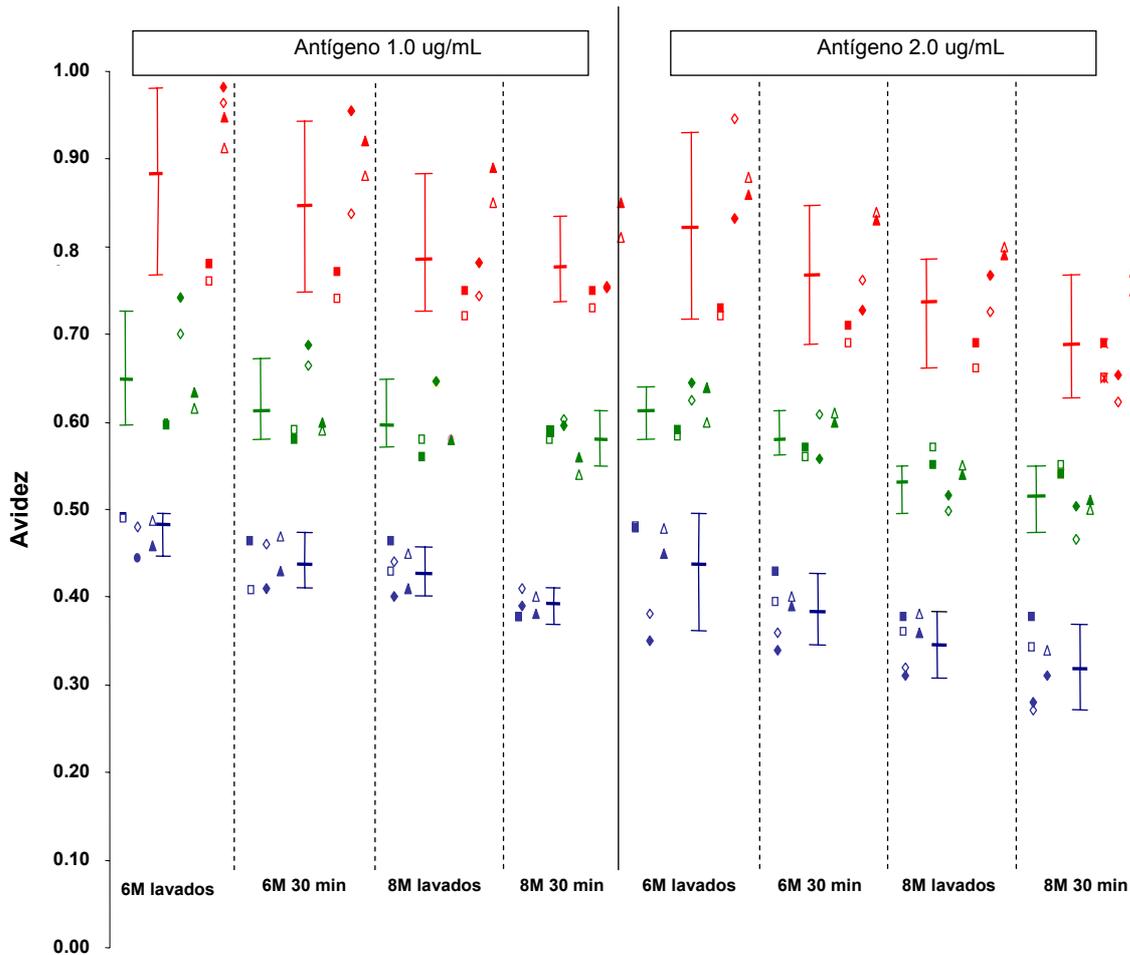


Figura 14. Resultados de avidez de los controles para muestras de sangre en papel filtro, comparando diferentes concentraciones de antígeno y tratamientos con urea. Azul = muestras agudas, Verde = muestras intermedias y Rojo = muestras crónicas. Figura completa= 2ª dilución , Figura vacía = 3ª dilución. Misma figura y mismo color = misma muestra. Línea gruesa = mediana, líneas delgadas = percentil 5 y 95.

Todos los controles conservaron su clasificación inicial; así mismo se notó que al aumentar la concentración de urea o el tiempo de tratamiento de ésta, los valores de avidez disminuyeron no sólo en el caso de las muestras agudas, sino también para los casos intermedios y crónicos. A pesar de esto, se observó buena separación entre los grupos de muestras de cada etapa de infección para la mayoría de las condiciones de tratamiento a las que se sometieron, resultando mejor la concentración de antígeno de 2.0 ug/mL y, dentro de ésta, los mejores tratamientos con urea fueron 6M incubada 30 minutos o sólo lavados con urea 8M.

Tomando en cuenta las medianas de cada grupo de muestras se obtuvieron las distancias numéricas existentes entre cada etapa de infección para todos los tratamientos con la finalidad de elegir las mejores condiciones para el ensayo (cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación numérica entre valores de avidéz de las diferentes etapas de infección para los tratamientos aplicados.

	Ag 1 ug/mL				Ag 2 ug/mL						
	6M lavados	6M 30 min	8M lavados	8M 30min	6M lavados	6M 30 min	8M lavados	8M 30min	max dif a 1ug	max dif a 2 ug	Dif 2-1ug/mL
Agudos-Intermedios	0.17	0.18	0.17	0.19	0.18	0.20	0.19	0.19	0.19	0.20	0.01
Intermedios-Crónicos	0.24	0.23	0.19	0.20	0.21	0.18	0.20	0.18	0.24	0.21	-0.03
Agudos-Crónicos	0.42	0.41	0.36	0.39	0.39	0.37	0.39	0.37	0.42	0.39	-0.02

Con estos datos se observó que la mejor concentración de antígeno fue la de 2.0 $\mu\text{g/mL}$, pues ofrece una mejor separación entre casos agudos e intermedios para la mayoría de las condiciones de urea, y de éstas las mejores fueron 6M incubada 30 minutos o sólo lavados con urea 8M, aunque las diferencias entre tratamientos no rebasan las centésimas de punto. Por lo tanto, en general resultaron buenas todas las condiciones del ensayo, para lo cual lo único que se tiene que establecer son los rangos de valores de avidéz para determinar cada caso dentro de alguna etapa de infección.

Debido a que el ensayo mostró buen comportamiento con los controles, se decidió probar las muestras restantes con una o todas las condiciones de tratamiento dependiendo de la cantidad de sangre en papel filtro con la que se contaba. Los resultados obtenidos se graficaron para obtener las correlaciones posibles entre las diferentes condiciones de tratamiento. Todas las correlaciones resultaron altas para las condiciones de tratamiento probadas ($R > 0.93$; $P < 0.0001$, datos no mostrados). En los gráficos se muestran algunos de estos ejemplos (figura 15).

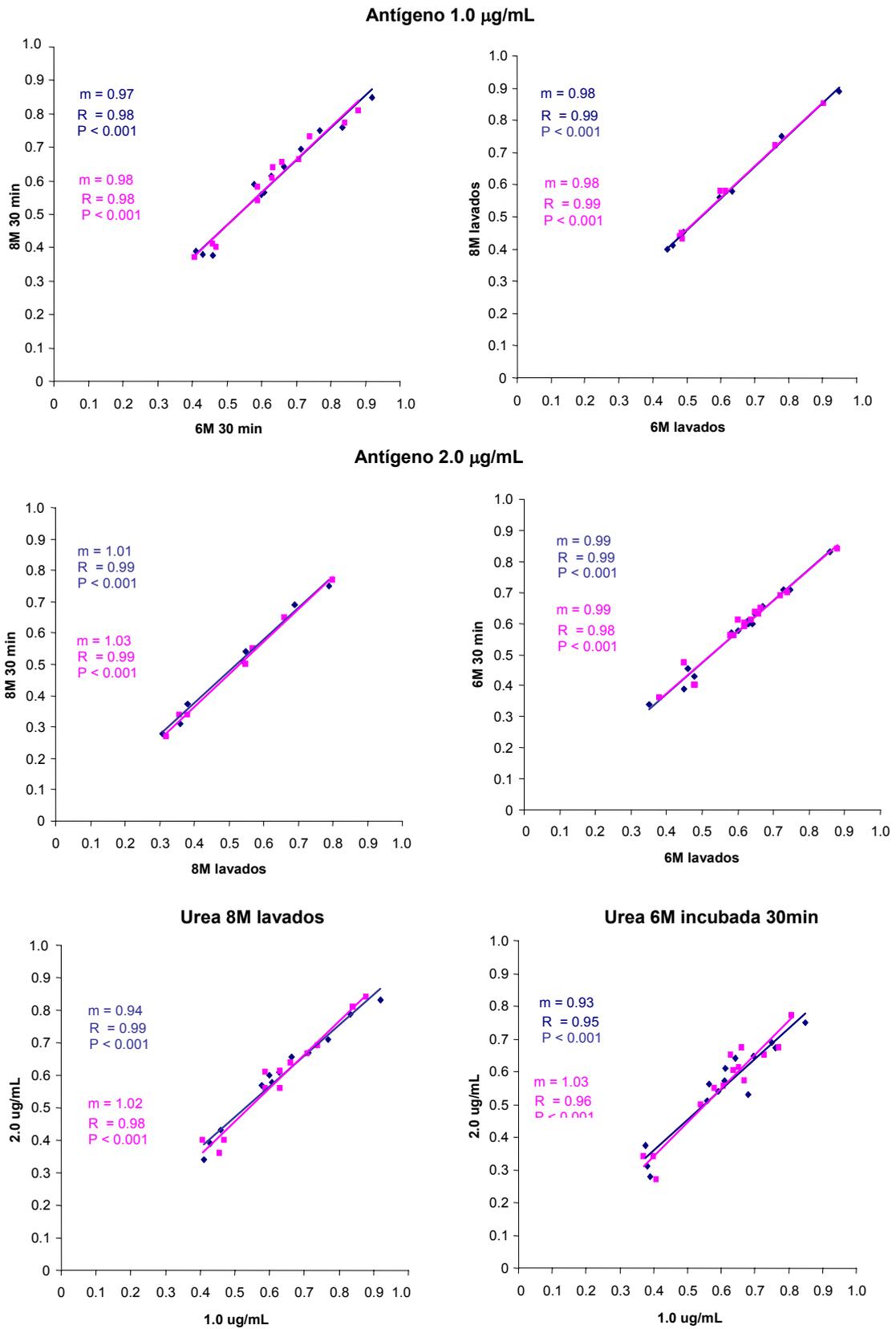


Figura 15. Gráficos de correlaciones del ensayo de avidéz entre diferentes condiciones. Azul = 2ª dilución, Rosa = 3ª dilución.

Con ayuda de los diagramas de caja se pudo observar el comportamiento del ensayo en sus diferentes variantes, con el total de las muestras probadas (figuras 16 y 17)

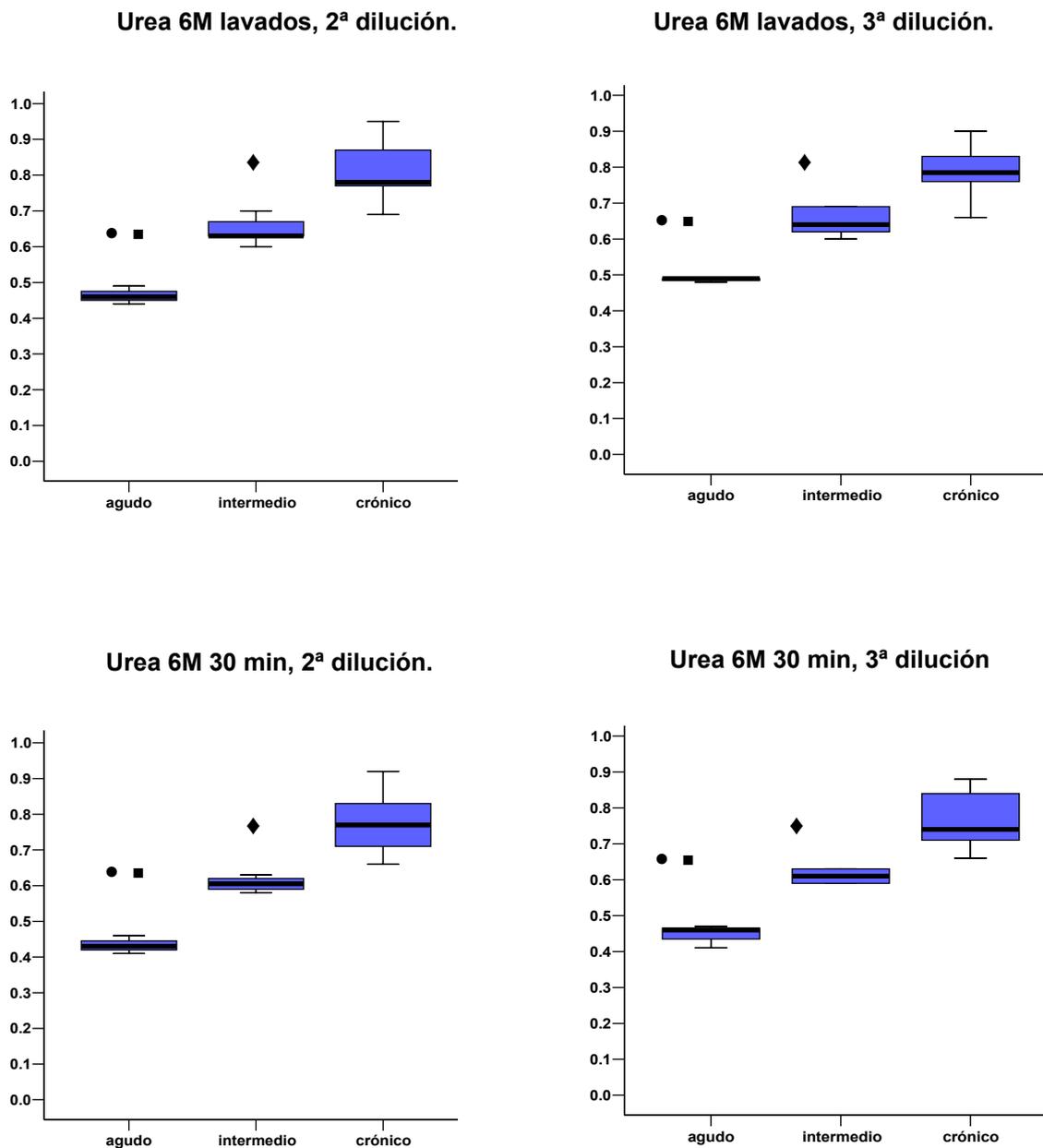


Figura 16 a. Diagramas que muestran las tendencias que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para los diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 1.0 ug/mL. • = $P < 0.05$ entre casos agudos-crónicos, ◻ = $P < 0.05$ entre casos agudos-intermedios, ♦ = $P < 0.05$ entre casos intermedios-crónicos

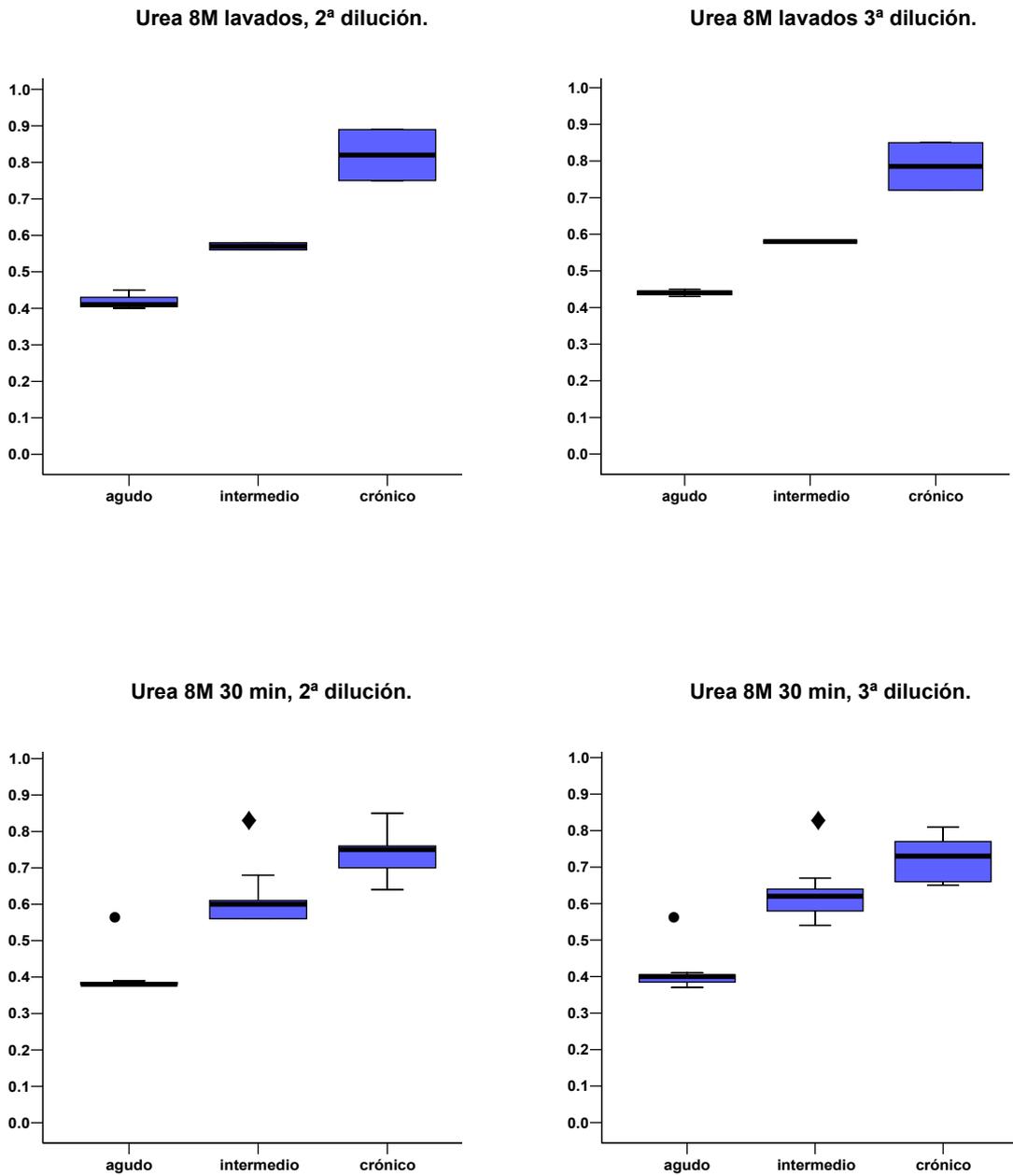
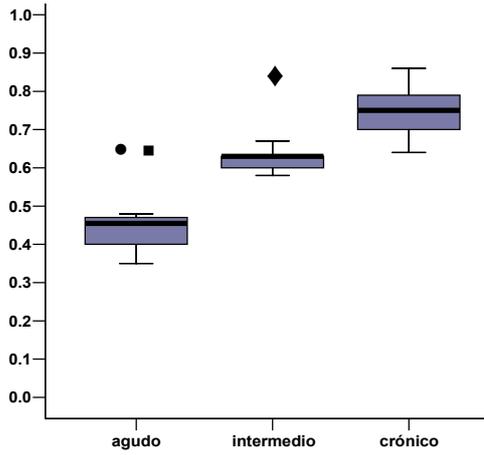
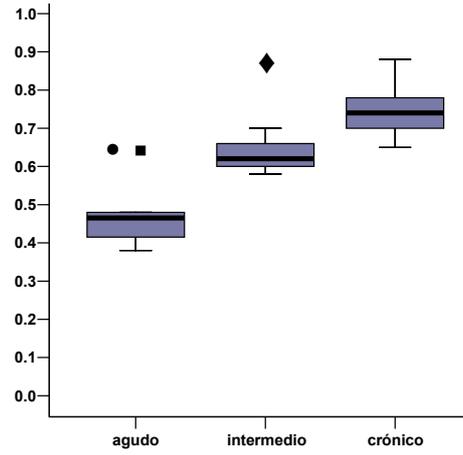


Figura 16 b. Diagramas que muestran las tendencias que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para los diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 1.0 ug/mL. • = $P < 0.05$ entre casos agudos-crónicos, ■ = $P < 0.05$ entre casos agudos-intermedios, ◆ = $P < 0.05$ entre casos intermedios-crónicos

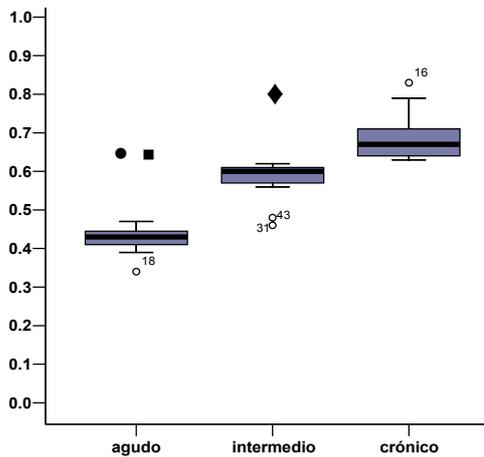
Urea 6M lavados, 2ª dilución.



Urea 6M lavados, 3ª dilución.



Urea 6M 30 min, 2ª dilución.



Urea 6M 30 min, 3ª dilución.

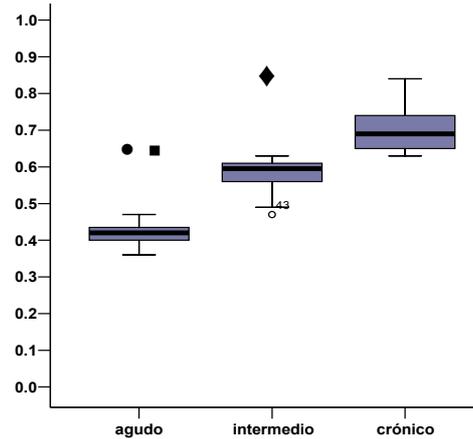
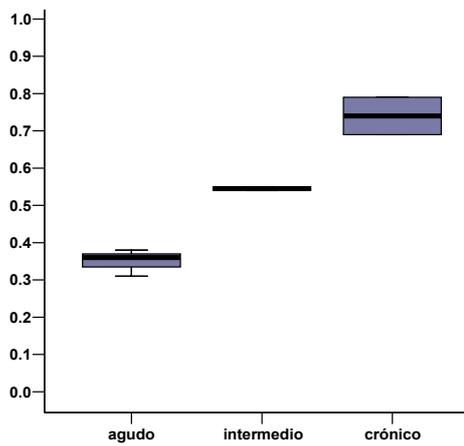
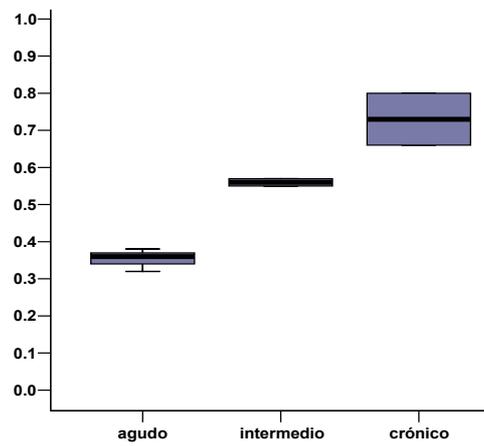


Figura 17a. Diagramas que muestran las tendencias que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para los diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 2.0 ug/mL. • = $P < 0.05$ entre casos agudos-crónicos, ■ = $P < 0.05$ entre casos agudos-intermedios, ◆ = $P < 0.05$ entre casos intermedios-crónicos

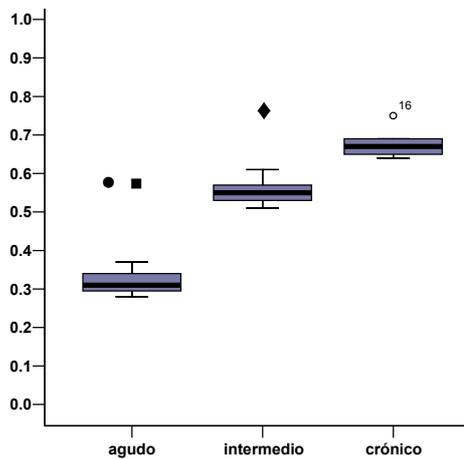
Urea 8M lavados, 2ª dilución.



Urea 8M lavados 3ª dilución.



Urea 8M 30 min, 2ª dilución.



Urea 8M 30 min, 3ª dilución.

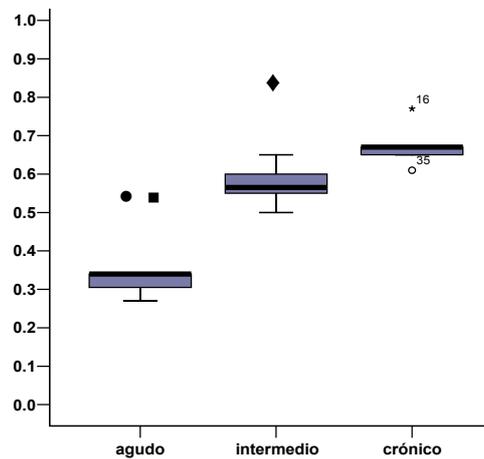


Figura 17 b. Diagramas que muestran las tendencias que siguen los valores de avidéz en muestras de suero para los diferentes tratamientos de urea usando antígeno a la concentración de 2.0 ug/mL. • = $P < 0.05$ entre casos agudos-crónicos, ■ = $P < 0.05$ entre casos agudos-intermedios, ◆ = $P < 0.05$ entre casos intermedios-crónicos

En todos los tratamientos, los datos mantienen una tendencia de valores de avidéz, la cual va aumentando con respecto a la etapa de infección. Las diferencias observadas de los valores de avidéz de las muestras dentro de cada grupo de infección resultaron en la mayoría de los casos significativas de acuerdo al análisis estadístico aplicado. Las diferencias fueron mayores (como sucedió usando suero) para la concentración de urea 6M en sus dos condiciones aplicadas (incubada 30 minutos y sólo lavados), tanto en la concentración de antígeno 1.0 µg/mL como en la de 2.0 µg/mL. Por lo tanto, se construyeron los rangos de avidéz dentro de los cuales se pudo considerar a un caso dentro de alguna de las etapas de infección (cuadro 4).

Cuadro 4. Rangos de valores de avidéz para todas las condiciones de tratamiento aplicadas al ensayo.

CASOS	Avidéz antígeno 1 ug/mL				Avidéz antígeno 2 ug/mL			
	6M lavados	6M 30 min.	8M lavados	8M 30 min	6M lavados	6M 30 min	8M lavados	8M 30 min
Agudos	< 0.50	< 0.47	0.45	< 0.40	<0.50	< 0.45	<0.40	< 0.35
Intermedios	0.51 - 0.75	0.48 -0.70	0.46 - 0.65	0.41 -0.60	0.51 - 0.65	0.46 -0.6	0.41 - 0.57	0.3 6-0.54
Crónicos	> 0.75	> 0.70	> 0.65	> 0.60	> 0.65	> 0.60	> 0.57	> 0.54

CORRELACION DE LA AVIDEZ EN MUESTRAS DE SUERO Y LA AVIDEZ EN MUESTRAS DE SANGRE TOTAL EMBEBIDA EN PAPEL FILTRO

Se contó con algunos casos en los cuales se tomó muestra de suero y de sangre total embebida en papel filtro, pertenecientes ambas a la misma fecha de toma. Estos casos se probaron a las condiciones del ensayo de avidéz que permitió la cantidad de muestra que se tuvo. De los resultados se obtuvieron las correlaciones posibles entre los valores de avidéz de la muestra en suero contra los de sangre total embebida en papel filtro para cada caso (figura 18).

Las correlaciones resultaron altas en todos los casos, esto fue corroborado con el análisis estadístico en el cual no se encontraron diferencias significativas entre las distribuciones de los valores de avidéz usando suero y aquellos usando sangre en papel filtro (cuadro 5).

ANTICUERPOS IgM Y SU RELACIÓN CON LA AVIDEZ

Del total de muestras que se probaron para este estudio, 37 fueron clasificadas en alguna de las etapas de infección (agudas, crónicas o indeterminadas) por sus niveles de anticuerpos IgM anti *Toxoplasma gondii*. Estas muestras fueron probadas para algunas de las condiciones del ensayo, y con los resultados se obtuvieron los porcentajes de muestras que resultaron verdaderas agudas, intermedias o crónicas dentro de cada grupo. El grupo clasificado como agudo contó con 8 muestras, el grupo clasificado como crónico con 29 muestras y el indeterminado con 19 muestras. Los porcentajes resultantes se muestran en la figura 19. No se observó correlación entre los niveles de IgM y los valores de avidéz (figura 20).

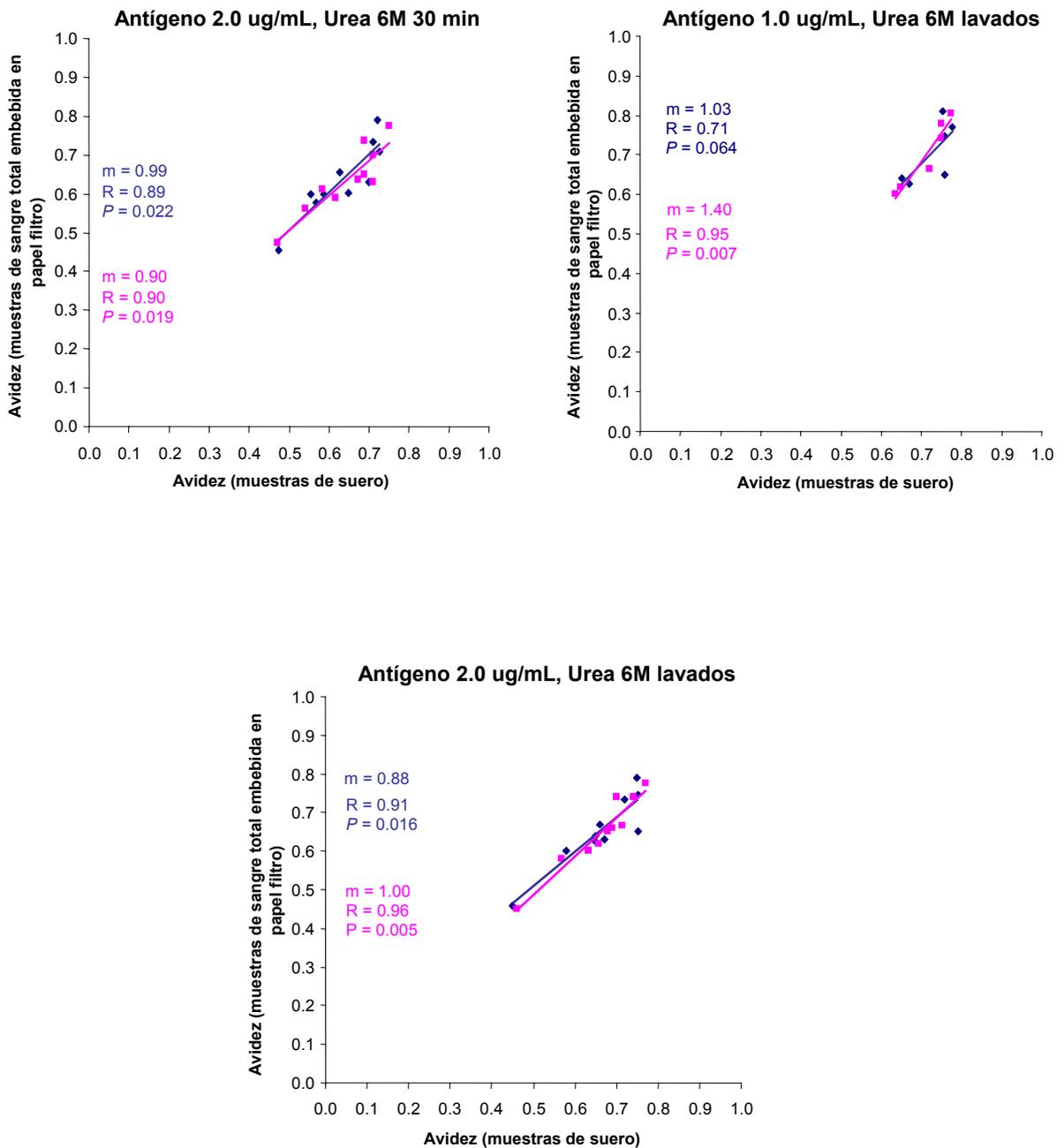


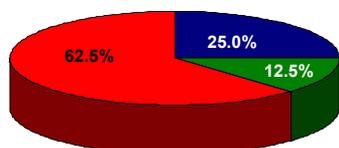
Figura 18. Gráficos que muestran ejemplos de las correlaciones obtenidas entre muestras de suero y sangre total embebida en papel filtro de un mismo caso. Color azul = 2ª dilución y Color rosa = 3ª dilución.

Cuadro 5. Comparación entre distribuciones de valores de avidéz entre muestras de suero y muestras de sangre embebida en papel filtro, usando diferentes concentraciones de antígeno y tratamientos con urea.

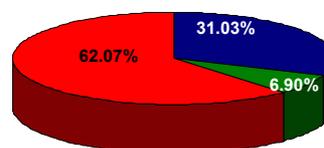
Concentración de antígeno*	1 µg/mL								2 µg/mL							
	6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´		6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´	
Tratamiento con urea																
Dilución**	2 ^a	3 ^a														
P***	0.818	0.818	0.629	0.857	1.000	1.000	0.857	0.857	0.631	0.579	0.573	0.315	0.400	0.400	1.000	0.857

- en µg/mL; **La 2^a y 3^a diluciones fueron 1:100 y 1:200 para suero y el equivalente a 1:80 y 1:160 para sangre en papel filtro; *** Exacta de Fisher

a) 10 UI/mL > IgM < 20 UI/mL



b) IgM > 20 UI/mL



c) IgM < 10 UI/mL

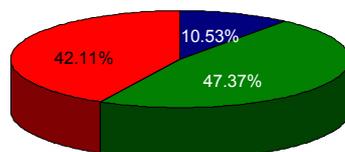


Figura 19. Gráficos de porcentajes resultantes para cada etapa de infección dentro de cada grupo clasificado de acuerdo a los niveles de anticuerpos IgM (UI/mL). Color azul = muestras en fase aguda, Color verde = muestras en fase intermedia y color rojo = muestras en fase crónica. De acuerdo al análisis estadístico por tablas de contingencia 3x3 la P = 0.39.

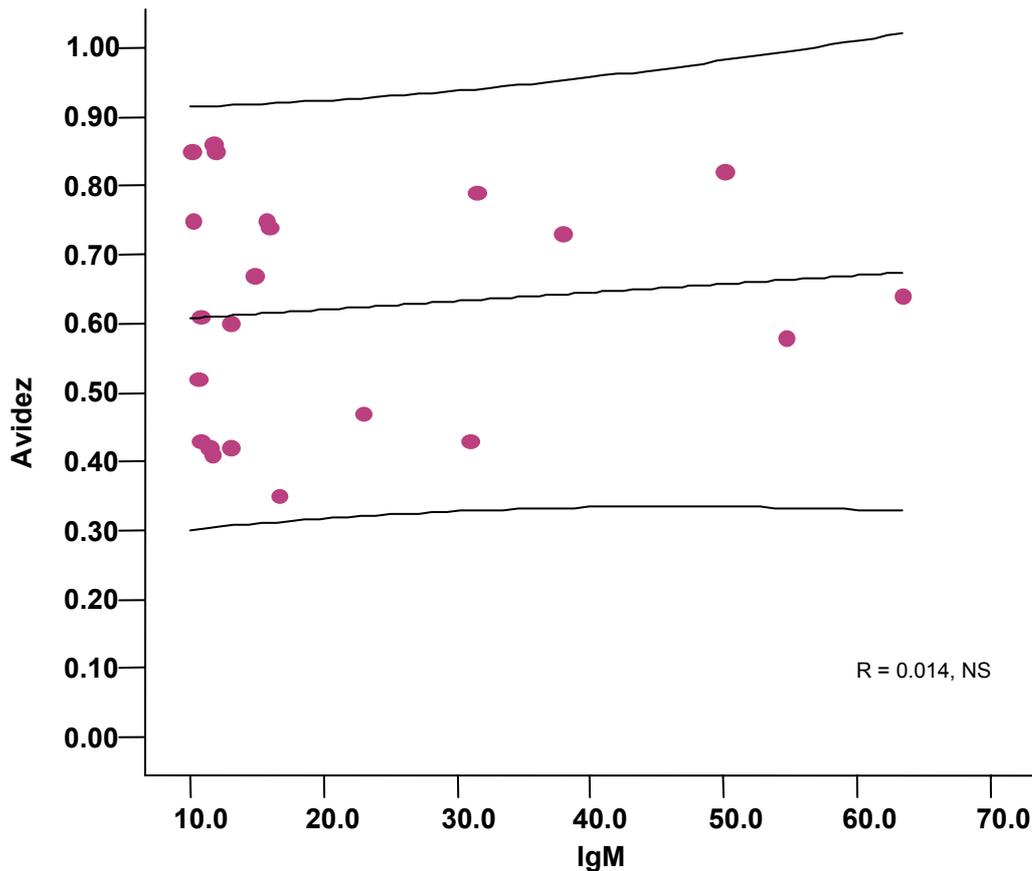
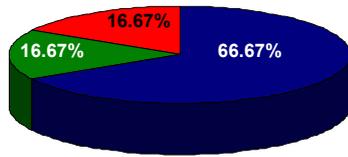


Figura 20. Gráfico de la tendencia que siguen los valores de avidéz con respecto a los niveles de presentes IgM en muestras

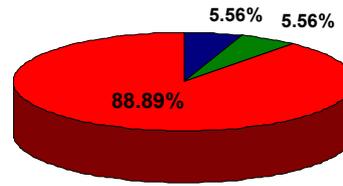
LA RESPUESTA AL EXTRACTO CRUDO Y A LA P30 COMO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES DE AVIDEZ.

Se clasificaron 38 muestras de acuerdo a su respuesta a un extracto crudo y a la proteína p30: 12 formaron el grupo clasificado como agudo (alta respuesta a P30 y baja al extracto crudo), 18 el grupo crónico (alta respuesta al extracto crudo y baja respuesta a P30) y 8 muestras el grupo indeterminado. Con los resultados se obtuvieron los porcentajes de muestras agudas, crónicas e intermedias resultantes de la prueba de avidéz (figura 21).

a) p30 alto, EC bajo



b) EC alto, p30 bajo



c) p30= EC, bajos

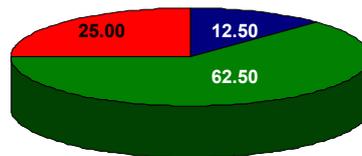


Figura 21. Gráficos de porcentajes resultantes para cada etapa de infección dentro de cada grupo clasificado de acuerdo a su respuesta a dos antígenos distintos, el extracto crudo y la p30. Color azul = muestras en fase aguda, Color verde = muestras en fase intermedia y color rojo = muestras en fase crónica.

Se observó que dentro del grupo clasificado como agudo, el 67% de las muestras se confirmaron como agudas, de la misma forma que en el grupo con alta respuesta al EC y baja a la p30, la mayoría de las muestras resultaron crónicas. En el grupo que se clasificó como indeterminado resultaron en su mayoría ser muestras en etapa indeterminada de acuerdo a los resultados de avidéz.

Por medio del uso de diagramas de caja pudimos observar la distribución de los valores avidéz del ensayo en los tres grupos clasificados de acuerdo a su respuesta al extracto crudo y la p30 (figura 22). Los resultados mostraron que los valores de avidéz de las muestras de cada clasificación se agrupan en ciertos rangos y el ensayo de avidéz permitió distinguir entre éstos, observándose relación entre los criterios de clasificación y la etapa de infección a la que pertenecen; esto fue corroborado con el análisis estadístico ($P < 0.0001$)(cuadros 6 al 8).

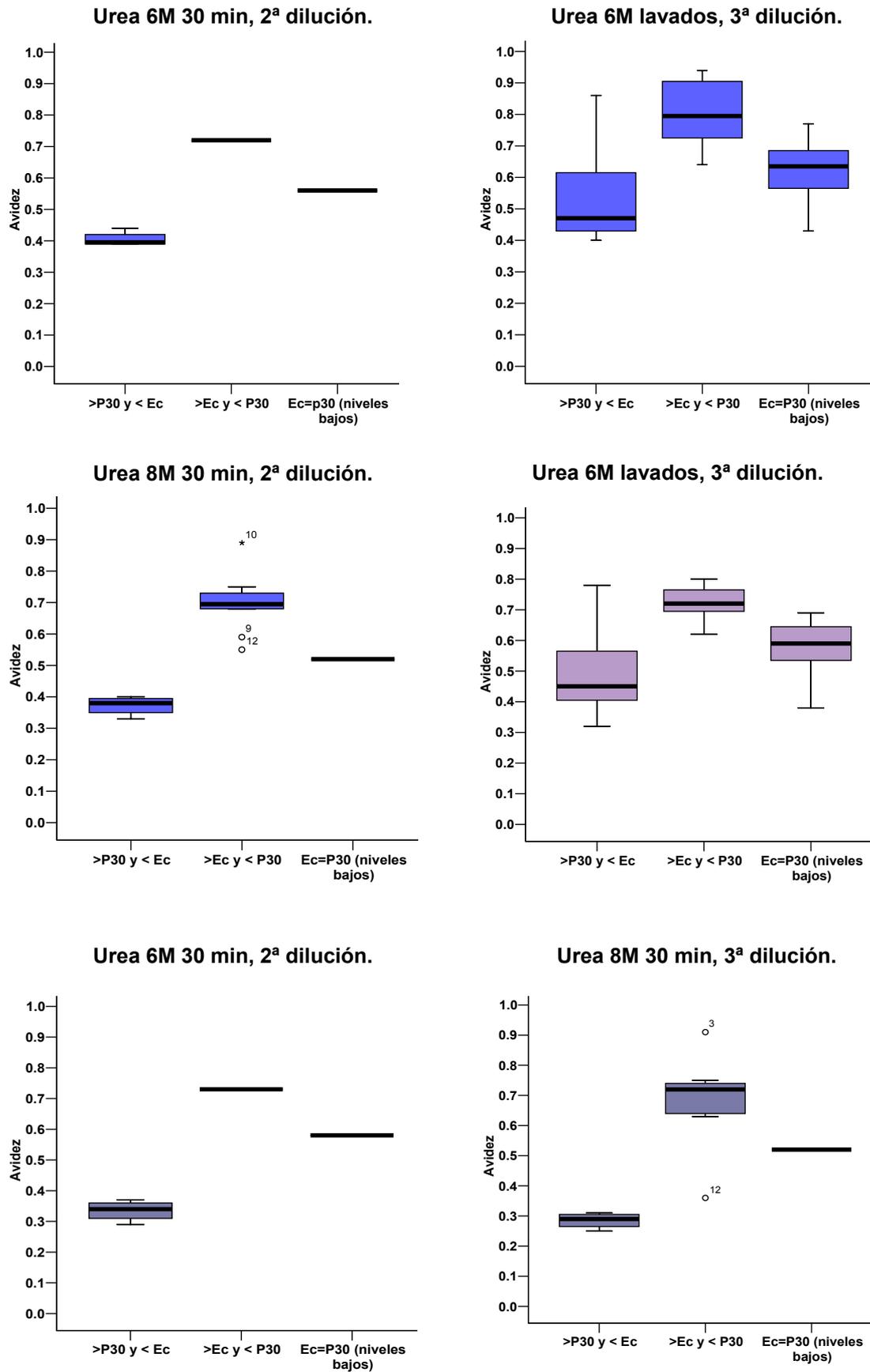


Figura 22. Diagramas que muestran algunos ejemplos de la distribución de los valores de avidéz de las muestras clasificadas por su respuesta al extracto crudo y P30, usando distintas condiciones de lavado con urea. Color azul = diferentes condiciones de urea usando antígeno a la concentración de 1.0 ug/mL, color Lila = diferentes condiciones de urea usando antígeno a la concentración de 2.0 ug/mL.

Cuadro 6. Comparación entre distribuciones de valores de avidéz entre muestras agudas y crónicas, usando diferentes concentraciones de antígeno y tratamientos con urea.

Concentración de antígeno*	1 µg/mL								2 µg/mL							
	6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´		6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´	
Dilución**	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.
<i>P</i> ***	0.004	0.0005	0.400	0.400	ND	ND	0.002	0.002	0.002	0.005	0.400	0.400	ND	ND	0.014	0.002

* en µg/mL; **La 2ª y 3ª diluciones fueron 1:100 y 1:200 para suero y el equivalente a 1:80 y 1:160 para sangre en papel filtro; *** Exacta de Fisher

Cuadro 7. Comparación entre distribuciones de valores de avidéz entre muestras agudas e intermedias, usando diferentes concentraciones de antígeno y tratamientos con urea.

Concentración de antígeno*	1 µg/mL								2 µg/mL							
	6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´		6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´	
Dilución**	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.	2ª	3a.
<i>P</i> ***	0.047	0.048	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.020	0.043	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400

* en µg/mL; **La 2ª y 3ª diluciones fueron 1:100 y 1:200 para suero y el equivalente a 1:80 y 1:160 para sangre en papel filtro; *** Exacta de Fisher

Cuadro 8. Comparación entre distribuciones de valores de avidéz entre muestras intermedias y crónicas, usando diferentes concentraciones de antígeno y tratamientos con urea.

Concentración de antígeno*	1 µg/mL								2 µg/mL							
	6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´		6 M lavados		6 M 30´		8 M lavados		8 M 30´	
Tratamiento con urea																
Dilución**	2 ^a	3 ^a														
<i>P</i> ***	0.047	0.048	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.020	0.043	0.400	0.400	0.400	0.400

* en µg/mL; **La 2^a y 3^a diluciones fueron 1:100 y 1:200 para suero y el equivalente a 1:80 y 1:160 para sangre en papel filtro; *** Exacta de Fisher

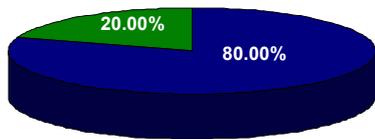
LA DIFERENCIA DE TÍTULOS Y SU RELACIÓN CON LA AVIDEZ.

Primero se tomaron en cuenta los casos tanto de suero como de sangre total embebida en papel filtro en los que se contó con más de una toma. Dentro del grupo clasificado como agudo (aumento de títulos > 2 veces) se encontraron 7 casos y dentro del grupo clasificado como crónico (aumento de títulos ≤ 2 veces) se tuvieron 17 casos.

Estas muestras se trabajaron bajo alguna de las condiciones del ensayo, y con los resultados se construyeron gráficos de porcentajes de verdaderos agudos, verdaderos crónicos e intermedios (figura 23)

Se pudo observar que dentro del grupo agudo la mayoría de los casos resultaron con una avidéz baja como se esperaba, así como en el grupo clasificado como crónico la mayoría de los casos resultaron con una avidéz de intermedia a crónica.

a) Diferencia de títulos > 2 veces.



b) Diferencia de títulos ≤ 2 veces.

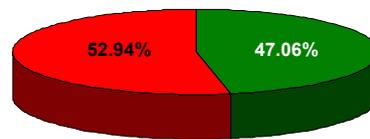


Figura 23. Gráficos de porcentajes resultantes para cada etapa de infección dentro de cada grupo clasificado. Color azul = muestras en fase aguda, Color verde = muestras en fase intermedia y color rojo = muestras en fase crónica. Esta relación entre la diferencia de títulos y la etapa de infección fue corroborada por el análisis estadístico ($P < 0.0001$)

Con ayuda de los diagramas de caja se observó el comportamiento del ensayo de avidéz, con las muestras clasificadas de acuerdo a la diferencia de títulos. Las diferencias entre los valores de avidéz de los grupos de muestras clasificados bajo estas condiciones fueron notables, ya que en la mayoría de los tratamientos se observó que siguen una tendencia a ser agudos cuanto mayor es el incremento de los títulos de IgG entre tomas y viceversa (figura 24). Los resultados globales del análisis estadístico se muestran en el cuadro 9.

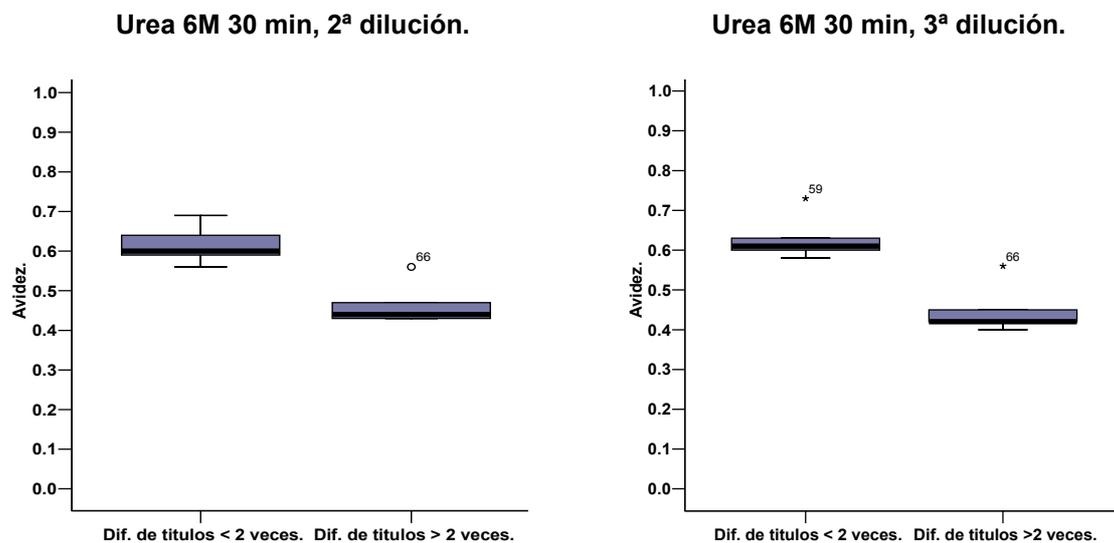


Figura 24. Diagramas que muestran ejemplos de la tendencia que siguen los valores de avidéz de las muestras clasificadas por su aumento de títulos de anticuerpos IgG. Antígeno usado a 2.0 ug/mL.

Cuadro 9. Comparación entre distribuciones de valores de avidéz entre muestras con aumento de títulos IgG ≤ 2 veces y muestras con aumentos > 2 veces, usando diferentes concentraciones de antígeno y tratamientos con urea.

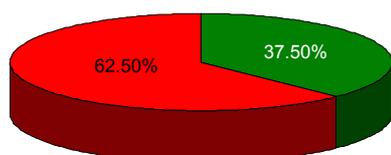
Concentración de antígeno*	1 $\mu\text{g/mL}$								2 $\mu\text{g/mL}$							
	6 M lavados		6 M 30'		8 M lavados		8 M 30'		6 M lavados		6 M 30'		8 M lavados		8 M 30'	
Dilución**	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a
<i>P</i> ***	0.166	0.167	0.285	0.285	0.3333	0.333	0.286	0.286	0.143	0.142	0.0007	0.0007	0.333	0.333	0.285	0.285

* en $\mu\text{g/mL}$; **La 2^a y 3^a diluciones fueron 1:100 y 1:200 para suero y el equivalente a 1:80 y 1:160 para sangre en papel filtro; *** Exacta de Fisher

En los casos en los que se determinó la diferencia de títulos de anticuerpos IgG, entre concentraciones de antígeno (0.5 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$) de una misma toma, tanto el grupo agudo como el crónico, se contó con 10 muestras cada uno.

Al igual que las muestras anteriores, éstas fueron probadas por algunas o todas las condiciones del ensayo y se obtuvieron los porcentajes de casos agudos, intermedios y crónicos resultantes de la prueba de avidéz. Con los valores de avidéz se construyeron gráficos de los porcentajes de muestras agudas, intermedias y crónicas resultantes en cada grupo, y se observó que la diferencia de absorbancia con el antígeno a 1 y a 2 $\mu\text{g/mL}$ no tiene relación alguna con los valores de avidéz (figura 25) ($P = 0.65$).

a) Diferencia de títulos > 2 veces.



b) Diferencia de títulos ≤ 2 veces.

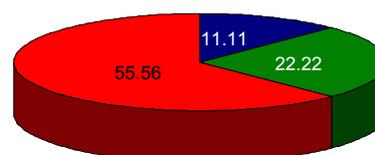


Figura 25. Gráficos de porcentajes resultantes para cada etapa de infección dentro de cada grupo clasificado. Color azul = muestras en fase aguda, Color verde = muestras en fase intermedia y color rojo = muestras en fase crónica.

DIAGNOSTICO MATERNO CON BASE EN EL RECIEN NACIDO, Y SU RELACIÓN CON AVIDEZ

Se clasificaron 15 muestras de mujeres en base al diagnóstico serológico de su bebé: 4 formaron el grupo clasificado como agudo (IgM ó IgA en el recién nacido), 5 el grupo intermedio (IgM ó IgA, e IgG en el recién nacido) y 6 el grupo crónico (sólo IgG en el recién nacido). Con los resultados se obtuvieron los porcentajes de muestras agudas, crónicas e intermedias resultantes de la prueba de avidéz (figura 26)

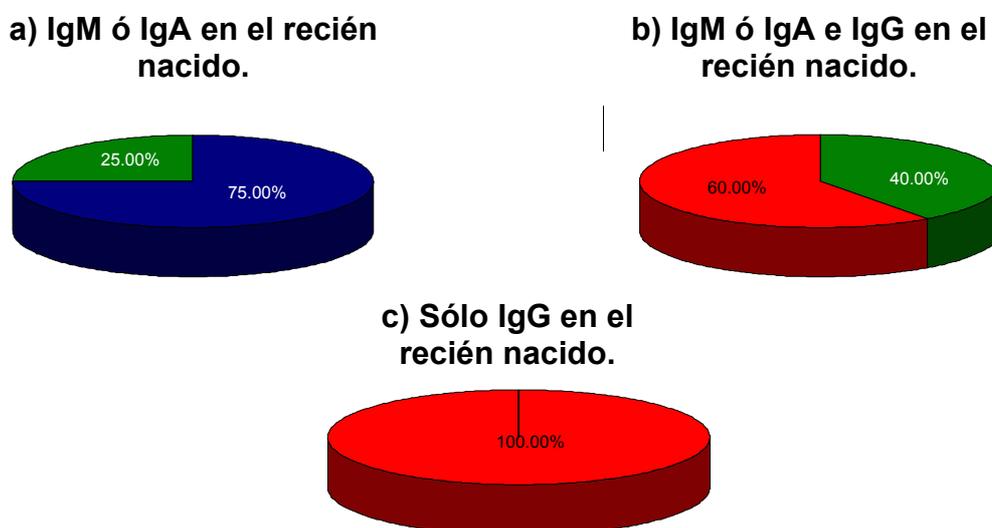
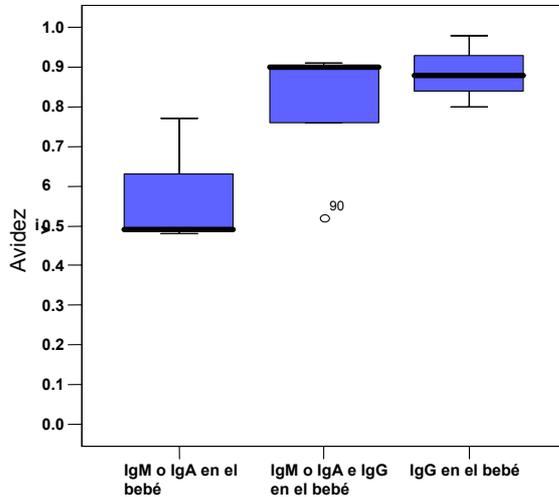


Figura 26 Gráficos de porcentajes resultantes para cada etapa de infección dentro de cada grupo clasificado. Color azul = muestras en fase aguda, Color verde = muestras en fase intermedia y color rojo = muestras en fase crónica.

Dentro del grupo clasificado como agudo, la mayoría de las muestras se confirmaron como agudas, de la misma forma en el grupo intermedio y crónico la mayoría de las muestras resultaron crónicas. Los resultados mostraron que los valores de avidéz de las muestras de cada clasificación se agrupan en ciertos rangos y el ensayo de avidéz permitió distinguir entre éstos (figura 27), siendo mayores las diferencias entre el grupo agudo y los otros dos (intermedio y crónico), que resultaron estadísticamente significativas (cuadro 10) ($P=0.03$).

Urea 6M lavados, 2ª dilución.



Urea 6M lavados, 3ª dilución.

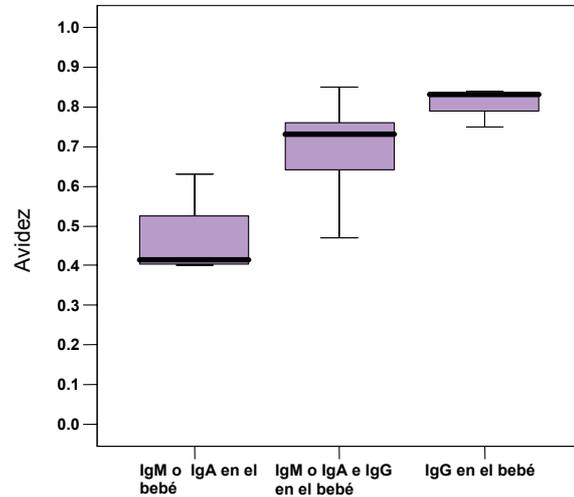


Figura 27. Diagramas que muestran las tendencias que siguen los valores de avidéz de las muestras de mamás clasificadas por el diagnóstico del recién nacido. Color azul = diferentes condiciones de urea usando antígeno a la concentración de 1.0 ug/mL. Color lila = diferentes condiciones de urea usando antígeno a la concentración de 2.0 ug/mL.

Cuadro 10. Comparación de distribuciones de valores de avidéz entre muestras maternas clasificadas por la presencia de anticuerpos en el recién nacido, usando diferentes concentraciones de antígeno y tratamientos con urea.

Grupos	Agudo - Intermedio				Agudo - Crónico			
	1 µg/mL		2 µg/mL		1 µg/mL		2 µg/mL	
Concentración de antígeno*	1 µg/mL		2 µg/mL		1 µg/mL		2 µg/mL	
Tratamiento con urea	6 M lavados		6 M lavados		6M lavados		6M lavados	
Dilución**	2a	3a	2a.	3a.	2a	3a.	2a.	3a.
P***	0.043	0.042	0.029	0.032	0.047	0.414	0.047	0.047

* en µg/mL; **La 2ª y 3ª diluciones fueron 1:100 y 1:200 para suero y el equivalente a 1:80 y 1:160 para sangre en papel filtro; *** Exacta de Fisher

CINETICA DE LA AVIDEZ DURANTE LA INFECCIÓN

Con los mismos casos en los que se contó con más de una toma, se pudieron construir gráficos del tiempo transcurrido entre las tomas con respecto a la avidéz resultante del ensayo (figura 28). Con estos gráficos se observó cómo los casos, a lo largo del tiempo cambiaron de etapa de infección entre sus tomas.

No se observó relación del tiempo transcurrido entre tomas y el avance de la infección, ya que el paso de una etapa de infección a otra en algunos casos se dio en pocos días, en comparación con otros en los que este cambió requirió más tiempo.

ANALISIS DE RESULTADOS

La infección por *Toxoplasma gondii* tiene una alta prevalencia en nuestro país, principalmente en estados con clima tropical, y representa un problema de salud pública considerable. En mujeres embarazadas con primoinfección, este parásito puede atravesar la placenta y producir infección congénita al feto en gestación, la cual causa principalmente daños a nivel del sistema nervioso central y ocular, que pueden ser de diferentes grados de severidad e irreversibles, dependiendo del trimestre del embarazo en el que se adquiriera la infección.^{21,22,26,35} Debido a esto, es importante contar con técnicas confiables que permitan identificar no sólo a los casos de infección, si no los que se encuentran en etapa aguda, ya que de esto depende el riesgo de transmisión y de daño al bebé y por tanto, la administración del tratamiento, el cual es muy severo para la mamá y el bebé.^{15,35}

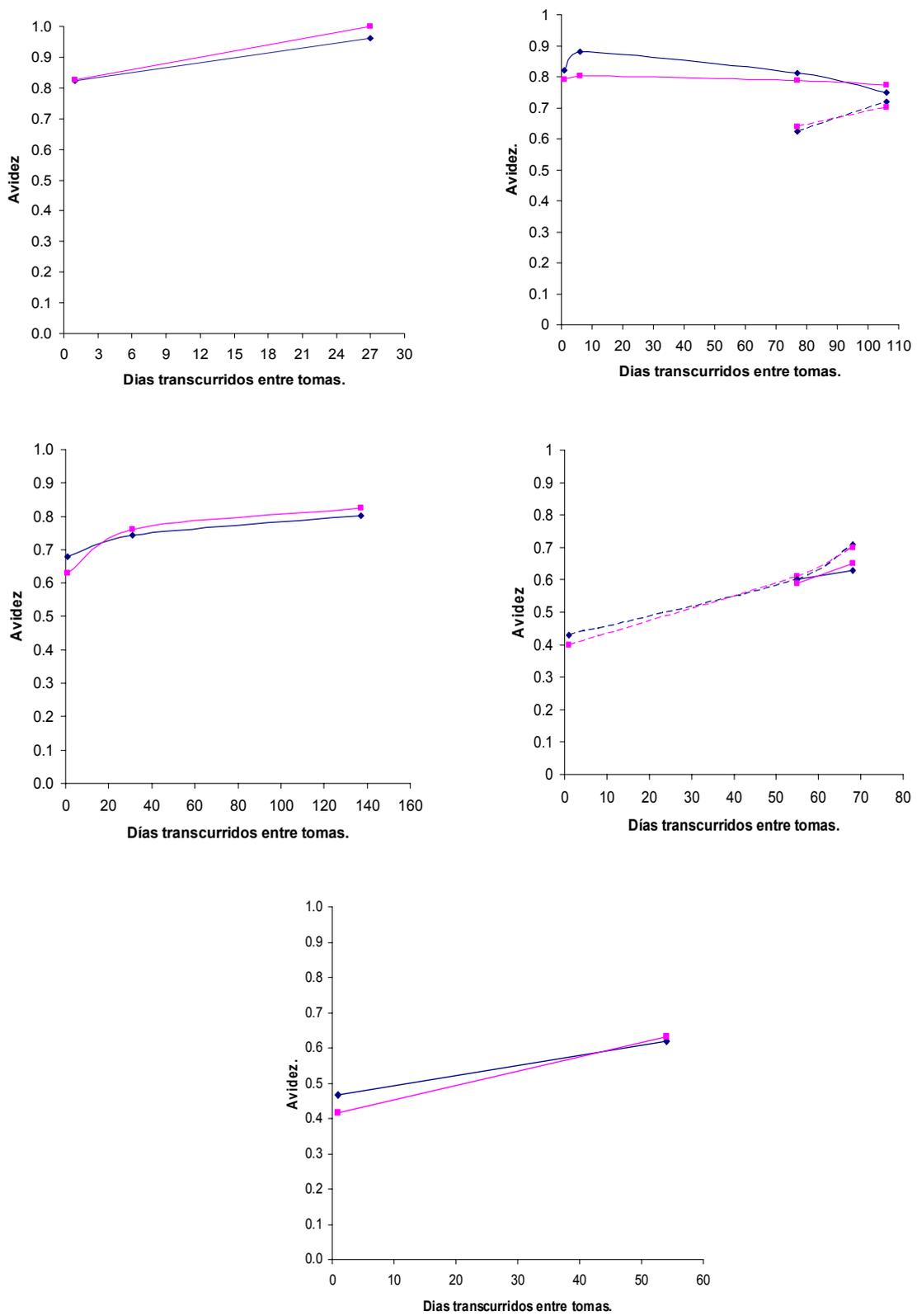


Figura 8. Gráficos de en los que se observa la cinética de infección de 5 casos. Línea continua = mamá, Línea punteada= recién nacido, Color azul = 2ª dilución, Color rosa= 3ª dilución.

Por lo anterior, en este trabajo se adaptó un ELISA indirecto de titulación para anticuerpos IgG a un ensayo de avidéz, en muestras de suero y sangre embebida en papel filtro, para ser implementado en la confirmación de casos agudos, intermedios y crónicos dentro grupos de riesgo. Los valores de avidéz obtenidos para la mayoría los tratamientos fueron más altos que los reportados en la literatura,^{50,82,83} ya que el antígeno usado en este estudio es diferente. Los antígenos reportados en la literatura son la proteína p30 pura (SAG1), que es un antígeno de superficie del taquizoito más abundante,⁵² o un extracto crudo centrifugado a bajas revoluciones, en el que se mantiene en su mayoría intacta la membrana del taquizoito, la cual contiene a los antígenos que son frecuentemente reconocidos por los anticuerpos de baja avidéz. Estos dos antígenos facilitan por lo tanto, la unión de estos anticuerpos cuando se encuentran presentes (infección aguda),^{67,69,70} a diferencia del usado en este trabajo en el cual además de los antígenos de superficie también se encuentran presentes antígenos internos del parásito que permiten mayor unión de los anticuerpos de alta avidéz que los de baja. Por lo tanto al realizar el ensayo, aunque en la muestra se encuentren en mayor proporción IgGs de baja avidéz, por afinidad las IgGs de alta avidéz compiten por los sitios de unión al antígeno, formando uniones más fuertes que no logra disociar la urea, dando como consecuencia una avidéz mayor. Sin embargo, la correlación encontrada entre el aumento de títulos en muestras seriadas y la avidéz de la primera muestra, indicó que, modificando el punto de corte, se pueden diferenciar casos agudos, indeterminados y crónicos con la prueba de avidéz estandarizada. Más aun, algunos casos en los que se tuvieron muestras seriadas, mostraron aumento de la avidéz, aunque no se observó que esto dependiera del tiempo transcurrido entre las tomas, si bien en general este cambio requirió de un mínimo de 15 días.

Al comparar los valores de avidéz de una muestra en suero y su correspondiente de sangre total embebida en papel filtro, la correlación fue alta, lo cual es de gran importancia ya que representa una gran ventaja para este tipo de ensayos, limitados anteriormente sólo a muestras de suero, pues permitirá el uso indistinto de estos dos tipos de muestra para la confirmación de la etapa de infección de un caso. La adaptación del ensayo de avidéz en muestras de sangre embebida en papel filtro, del cual no se encuentran

reportes suficientes,^{80,81} representa una importante contribución al diagnóstico oportuno de los casos en infección aguda, ya que las muestras tomadas a los dos grupos de la población en las que se pretende evitar la transmisión congénita de la infección, provienen tanto del tamiz prenatal como postnatal, y son en su mayoría de este tipo.

En la adaptación de los ELISAs de titulación para anticuerpos IgG tanto en muestras de suero como de sangre en papel filtro, se probaron diferentes concentraciones de antígeno de *T. gondii*, diluciones de muestra. Los resultados mostraron que la elección de las mejores condiciones del ensayo depende más bien de los recursos y del tiempo con el que se cuente para realizarlo, pues por lo menos dos diluciones de suero, dos concentraciones de antígeno y dos tratamientos con urea fueron útiles.

Posteriormente, se analizaron algunas pruebas presuntivas en su capacidad de predecir el riesgo de pertenecer a una de las etapas de infección, cuando se tiene solamente una muestra. El primer paso consistió en la clasificación de las muestras en grupos de riesgo (agudo, intermedio y crónico), que se estableció con base en los resultados de las pruebas presuntivas previamente estandarizadas y validadas, como la presencia de anticuerpos IgA, IgM e IgG, la diferencia de los títulos de anticuerpos IgG, y respuesta diferencial a la p30 y al extracto crudo obtenidos por ELISA y Western blot.

La diferencia de títulos entre diferentes concentraciones de antígeno en una misma muestra, no mostraron relación alguna con los valores de avidéz aunque estas diferencias fueran altas, lo cual desecha la posibilidad de al aumentar la concentración del antígeno y por tanto los sitios de unión para los anticuerpos, se facilita la unión de los de baja avidéz además de los de alta avidéz, ya que esto demuestra que el aumento en la absorbancia se debe en si al aumento de uniones antígeno-anticuerpo, pero estos últimos no necesariamente son de baja avidéz. Es posible que esta diferencia se logre usando el antígeno a concentraciones mucho más altas (5 o más $\mu\text{g/mL}$), cuando estén saturados los sitios de unión, lo cual puede ser probado en estudios posteriores.

En cuanto al criterio de clasificación de muestras basado en su respuesta a la proteína p30 y al extracto crudo como antígeno, el ensayo de avidéz también permitió distinguir entre grupos, y se observó que cada uno permaneció dentro

del rango específico de valores de avidéz esperado para su clasificación, siendo esta la otra forma de clasificación de muestras empleada que mostró una relación igualmente alta a la diferencia de títulos IgG, con los valores de avidéz. Estos resultados mostraron por lo tanto, que es confiable el empleo de este razonamiento para determinar el riesgo de un caso de pertenecer a alguna etapa de infección, pues cuando la respuesta para la P30 (antígeno generalmente reconocido por anticuerpos de baja avidéz)⁵³ era alta y baja para el extracto crudo (mezcla antigénica reconocida principalmente por anticuerpos de alta avidéz), las muestras resultaron con una avidéz baja. Esta situación resulto inversa para las condiciones contrarias de los dos antígenos y en el caso en el que esta respuesta se presentaba en niveles bajos para ambos antígenos, las muestras se encontraban en etapa de infección intermedia; esto podría indicar que los pacientes en ese momento tienen formados igual proporción de anticuerpos de alta como de baja avidéz. Un caso interesante fue el que tuvo valores altos para ambos antígenos, que presentó valores de avidéz alta, lo que sugiere que la respuesta a antígenos internos del parásito tiene valor diagnóstico (mayor por lo menos que la específica a p30), aunque esto debe ser corroborado conforme se encuentren más casos con esta respuesta.

Los niveles de anticuerpos IgM presentes en una muestra no resultaron indicativos de la etapa de la infección a la que pertenece el caso, ya que no existe relación alguna entre éstos y los valores de avidéz obtenidos en el ensayo. Por lo tanto los niveles altos de este anticuerpo no están asociados con infección aguda como se pensaba al inicio de este trabajo, ya que aunque estos son los primeros anticuerpos que se forman cuando se adquiere la infección^{26,42,47}, no necesariamente se presentan en grandes cantidades por que se encuentran en el pico máximo de su formación, ya que estos pudieron no disminuir a pesar del tiempo, hecho que es apoyado por reportes de casos en los que los niveles de IgM pueden perdurar en el organismo a lo largo de meses o años.²⁶

Finalmente, el uso del diagnóstico del recién nacido, resultó ser un método eficaz para determinar la etapa de infección en la que se encuentra la madre, pues se observó aunque en menor proporción que los dos criterios anteriores, una buena relación con los valores de avidéz. Por lo tanto, cuando el niño

presentó anticuerpos IgM, los que aunque por sí solos no mantiene relación con la infección aguda, al ser acompañados de la presencia de IgA que son los anticuerpos que se forman inmediatamente después de la IgM y en ausencia de IgG, fueron indicativos de que éste se encontraba en un etapa que se denomina hiperaguda y por tanto a la madre se le diagnosticó en fase aguda. Cuando a estas condiciones se adiciona la presencia de IgG en el recién nacido, la madre se encuentra en fase intermedia o crónica, pero cuando las dos primeras inmunoglobulinas desaparecen y solo hay presencia de IgG, la madre está en etapa crónica. Desafortunadamente, no se contaba con suficiente sueros de los recién nacidos para determinar la avidéz en los dos grupos positivos a IgG, por lo que no fue posible analizar la correlación de la avidéz entre las madres y sus hijos. Más aun, el número de muestras probadas fue pequeño, por lo que este aspecto amerita más análisis.

En resumen, esta tesis aporta información confiable sobre los parámetros que tienen una repercusión en la determinación de la fase aguda de una persona infectada por *Toxoplasma gondii*, como la respuesta diferencial a la proteína p30 y a un extracto interno del parásito, y aquellos que deben analizarse con más cuidado, como la respuesta diferencial a distintas concentraciones de antígenos o la respuesta específica del recién nacido infectado congénitamente. Además, se demostró la utilidad de la sangre en papel filtro como muestra de elección y las condiciones óptimas para realizar el ensayo.

CONCLUSIONES

- Los valores de avidéz correlacionaron con la diferencia de títulos de IgG específica, por lo que el ensayo adaptado en este estudio es útil para el diagnóstico oportuno de la fase de infección por *T. gondii* en una sola muestra.
- El ensayo de avidéz de anticuerpos IgG adaptado tanto para muestras de suero como de sangre embebida en papel filtro, funcionó en todas las condiciones de tratamiento aplicadas, diferenciando entre muestras pertenecientes a las tres diferentes etapas de la infección por *T. gondii*.
- La respuesta a la proteína P30 y al extracto crudo, son los dos criterios más confiables para establecer el riesgo de un caso de pertenecer a alguna de las etapas de infección por *T. gondii*.
- La presencia de anticuerpos IgM es el criterio menos recomendable para determinar la fase de infección de un paciente.

APENDICE

1. Solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6

- Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3).
- Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada.
- Ajustar el pH a 9.6.
- Aforar a 1000 mL.
- Mantener a 4°C.

2. Solución salina de fosfatos (NaCl 0.15M, fosfatos 0.01M, pH 7.2 [PBS])

- Medir 800 mL de agua destilada.
- Agregar 100 mL de *PB 10X y 8.75 g de NaCl.
- Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2.
- Aforar a 1000 mL con agua destilada.
- Guardar a 4°C.

***PB 10X.** 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio monobásico monohidratado) + 11.5 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico anhidro). Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar hasta disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

3. Amortiguador de lavado (PBS-tween 20, 3.0%)

- A un litro de PBS pH 7.2 (sol. 2) añadir 3 mL de Tween 20.
- Guardar a 4°C.

4. Solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 1% en PBS-tween20)

- Pesar 1 g de Albúmina Sérica Bóvina (BSA).

- Aforar a 100 mL de PBS-Tween (sol. 3).

5. Urea 6M y 8M

- Pesar 360 g de urea para el caso de 6M y 480 para 8M
- Disolver en 500mL de PBS-Tween 20 0.3 % (sol 3).
- Aforar a 1L con PBS-Tween 20 0.3 % (sol 3).

6. Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa

- Pesar 5 mg de orto-fenilendiamina (OPD).
- Añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M.
- Adicionar 4.5 μ L de H₂O₂ al 30%.

NOTA: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

7. Solución ácido sulfúrico 2N

- Tomar 98.08 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄).
- Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada.
- Aforar a 1000 mL.

REFERENCIAS

1. Frenkel JK. 2000. Biology of *Toxoplasma gondii*. En: Ambroise-Thomas P, Petersen E. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, Clinical Management and Control. Ed. Springer-Verlag. Dinamarca. 9-25.
2. Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev. **64**: 607-623.
3. Speer CA, Clark S, Dubey JP. 1998. Ultrastructure of the oocyst, sporocyst and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. **84**: 505-512.
4. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology development of tissue cyst. Clin. Microbiol. Rev. **11**:267-299.
5. Speer CA, Clark S and Dubey JP. 1998. Ultrastructure of the oocyst, sporocyst and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. **84**; **3**: 505-512.
6. Ambroise Thomas P, Petersen E. 2000. Congenital toxoplasmosis. Scientific Background, Clinical Management and Control. Springer-Verlag. Francia. 324 pp.
7. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Inter J Parasitol. **30**: 1217-1258.
8. Frenkel J, Dubey J, Miller NL. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stage identified as coccidian oocyst. Science. **167**: 893-896.
9. Frenkel J, Dubey JP. 1973. Effects of freezing in the viability of toxoplasma oocyst. J Parasitol. **59**: 587-588.

10. Dubey JP, Frenkel JK. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cyst. *J Protozool.* 23: 537-546).
11. Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano Lara AM, Galindo Virgen S, Magos C, Llausás A, Tapia Conyer R, Gutiérrez G, Sepúlveda J. 1991. Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. *Sal Púb Méx.* 34: 222-229.
12. Stuart-Walker T. 2000. *Microbiología.* Mc Graw Hill Interamericana. México. 532 pp.
13. Dubey JP. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 28: 1019-1024.
14. Correa D, Cañedo I, Hernández JL y Coballase E. 2001. *Toxoplasma gondii*: un parásito oportunista. En: Curso Internacional de Zoonosis Emergentes y Reemergentes. Bacterias, Parásitos, Virus, Hongos y Priones. Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (libro electrónico).
15. Galván Ramírez ML, Mondragón Flores R. 2001. *Toxoplasmosis humana.* Ediciones Cuellar. México. 196 pp.
16. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet.* **350**: 173-177.
17. Galván-Ramírez ML, Sánchez-Vargas G, Vielma-Sandoval M & Soto-Mancilla JL. 1999. Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. *Rev Soc Bras Med Trop.* **32**: 483-488.

18. Galván Ramírez ML, Soto JL, Velasco Castrejón O, Pérez M. R. 1995. Incidence of anti-Toxoplasma antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. Rev Soc Bras Med Trop. 28: 333-337.
19. Gross U, Lüder C. GK, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, Drczal D, Enders G. 2000. Comparative Immunoglobulin G Antibody Profiles between mother and Child (CGMC Test) for Early Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 38: 3619-3622.
20. Jenum PA & Petersen BS. 1998. Development of Specific Immunoglobulins G, M, and A Following Primary *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women. J Clin Microbiol. 36: 2907-2913.
21. Ferrandiz J, Mercier C, Wallon M, Picot S, Cesaron-Delauw MF, Peyron F. 2004. Limited value of assay using detection of immunoglobulin G antibodies to two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. Clin. and Diag. Laboratory immunology. p.1016-1016.
22. Wong SY, Remington JS. 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis. 18: 853-862.
23. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. BMJ. **321**: 142-147.
24. Sousa OE, Saenz RE, Frenkel JK. 1988. Toxoplasmosis in Panama: a 10 year study. Am J Trop Med Hyg. **38**: 315-322.
25. Gomez-Martin JE, Montoya-de-Londono MT, Castano-Osorio JC. 1997. A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindio,

- Colombia and application of mathematical models to estimate incidences using age-stratified data. *Am J Trop Med Hyg.* **57**: 180-186.
26. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Mentis A & Michalas S. 2002 Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn.* **22**: 1107-1111.
27. Roch E, Bravo-Becherelle MA. 1962. Incidencia de toxoplasmosis congénita en una muestra de 2186 nacidos vivos en la Ciudad de México. *Rev Salubridad Enf Trop.* **22**: 31-49.
28. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, Ortega-Velazquez V, Galván-Ramírez ML, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C, Correa D. 2005. Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **72**:142-144.
29. Aviles RQ & Esquivel RN. 1975. Serologic survey in a population of Yucatán, Motul. *Salud Publica Mex.* **17**: 365-369.
30. Roch E & Varela G. 1966. Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en México. Resultados obtenidos de 29,883 reacciones de Sabin y Feldman de 1953 a 1965. *Rev Invest Salud Pública de México.* **26**: 31-49.
31. Fatoohi AF, Cozon GJN, Wallon M, Kahi S, Gay-Andrieu F, Greenland T, Peyron F. 2003. Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infected hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **22**: 181-184.
32. Luft and Remington. 1992. AIDS commentary : toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Fid.* **15**:211-222.

33. Galván-Ramírez ML, Valdez-Alvarado V, Vargas-Gutiérrez G, Jiménez-González O, García-Cosío C, Vielma-Sandoval M. 1997. Prevalence of IgG and IgM anti-*Toxoplasma* antibodies in patients with HIV and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Rev Soc Bras Med Trop.* **30**: 465-467.
34. Pinon JM, Dumon H, Franck J, Petersen E, Lebech M, Zufferey J, Bessieres MH, Marty P, Holliman R, Johnson J, Luyasu V, Lecolier B, Guy E, Joynson DHM, Decoster A, Enders G, Pelloux H, Candolfi E. 2001. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal detection of Immunoglobulin G, M and A Antibodies. *J Clin Microbiol.* **39**: 2267-2271.
35. Boyer KM. 2000. Congenital toxoplasmosis: Current status of diagnosis, treatment, and prevention. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases.* **11**: 165-171.
36. Naessens A, Jenum PA, Pollak A, Decoster A, Lappalainen M, Villena I, Lebech M, Stray-Pedersen B, Hayde M, Pinon JM, Petersen E, Foulon W. 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation. *J Pediatr.* **135**: 714-719.
37. Lynfield R, Hsu HW, Guerina NG. 1999. Screening methods for congenital *Toxoplasma* and risk of disease. *The Lancet.* **353**: 1899-1900.
38. Bessieres MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, Courjault C, Séguéla JP. 2001. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal test. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* **94**: 37-45.

39. Jenum PA, Pedersen BS, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, Eng J. 1998. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. J Clin Microbiol. **36**: 2900-2906.
40. Derouin F, Mazon MC, Garin YJF. 1987. Comparative Study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol. **25**: 1597-1600.
41. Gangneux FR, Commere V, Tourte SC, Dupouy CJ. 1999. Performance of western blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **18**: 648-654.
42. Denkers EY, Gazzinelli RT. 1998. Regulation and Function of T- Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. Clin Microbiol Rev. **11**: 569-588.
43. Levine ND. 1973. Protozoan Parasites of Domestic Animals and Man. 2nd Ed Burgess Minneapolis MN.
44. Biagi F. 1971. Prevention of neonatal toxoplasmosis. Prensa Med Mex. **36**: 112-114.
45. Gangneux FR, Gavinet MF, Ancelle T, Raymond J, Schaefer CT, Camet JD. 1999. Value of Prenatal Diagnosis and Early Postnatal Diagnosis of congenital Toxoplasmosis: Retrospective study of 110 Cases. J Clin Microbiol. **37**: 2893-2898.
46. Remington JS, Krahenbuhl J. 1982. Immunology of *Toxoplasma gondii*. In immunology of human infection. Part II Nahmias and O' Reilly (ed) Philadelphia Plenum Publishing Corporation. 327-363.

47. Abbas AK, Lichtman AH, Pober SJ. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th edition. WB Saunders Company, Londres, Inglaterra. 553 pp.
48. Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F. 2004. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. Epidemiol. Infect 132: 541-548.
49. Marcolino PT, Silva DAO, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. 2000. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G Avidity by Western Blotting. Clin and Diagn. Immunology. P 384-389.
50. Bertozzi L, Suzuki L, Rossi C. 1999. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. trop. 41(3):175-177.
51. Foudrinier F, Villena I, Jaussaud R, Aubert D, Chemla C, Martinot F, Pinon JM. 2003. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. J. Clin. Microbiology. p 1681-1686.
52. Handman E, Goding JW, Remington JS. 1980. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J Immunol. **124**: 2578-2583.
53. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J Immunol. **141**: 3584-3591.

54. Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM. 2000. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. **38**: 1144-1150.
55. Suzuki Y, Ramírez R, Press C, Li S, Parmley S, Thulliez P, Remington JS. 2000. Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. J Clin Microbiol. **38**: 3967-3970.
56. Li S, Galvan G, Araujo FG, Suzuki Y, Remington JS, Parmley S. 2000. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. Clin Diagn Lab Immunol. **7**: 781-787.
57. Kimata Y, Tanabe K. 1987. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. J Cell Sci. **88**: 231-239. En: Galván-Ramírez ML, Mondragón-Flores R. 2001. Toxoplasmosis humana. Ediciones Cuellar. México. Pp. 58-59.
58. Dubey JP. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocyst for rats. 1996. J. Parasitol. **82**:951-956.
59. Jonson LL. 1994. Resistente to *Toxoplasma gondii* in mice infected as neonates or exposed in utero. Infec. and Immunity. **30**:75-3079.
60. Mandujano-Martínez A. 2004. En: Memorias del Curso de Inmunología y Biología Molecular de parásitos. Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
61. Robert-Gangneux F. 2001. Contribution of new techniques for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Clin Lab. **47**: 135-141.

62. Gillespie SH & Hawkey PM. 1995. Medical Parasitology. A practical approach. Oxford University Press. United States. 295 pp.
63. Rose NR & Friedman H. 1984. El laboratorio en Inmunología Clínica. Médica Panamericana. 2a. Edición. Argentina. 1215 pp.
64. Correa D, Mandujano A, Medina Y, Medina E, Mata O, Carpio JC, Zavala A, Ruiz A, Gavilondo J, Ayala M, Vázquez J, Bell H, Dueñas M, Tamplin M. 2000. Manual de técnicas modernas en inmunología. Teoría y Práctica. México. INDRE. 95 pp.
65. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels of nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci. 76: 4350-4354.
66. Correa-Beltrán MD, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Meza-Lucas A, Coballase-Urrutia E, Rico-Torres C, Medina-Escutia E, Mandujano-Martínez A, Medina-Flores Y, Hernández-Islas JL, Luna-Pastén H. 2004. Manual de Procedimientos de Laboratorio. En: Curso de Inmunología y Biología Molecular de parásitos. Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
67. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. 2004. Minireview. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J. Clinical Microbiology. P 941-945.
68. Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S. 2001. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. J Infect Diseases. 183: 1248-53.

69. Alvarado-Esquivel C, Sethi S, Janitschke K. 2002. Comparison of two commercially available avidity tests for *Toxoplasma*-specific IgG antibodies. *Archives of Medical Research*. 33:520-523.
70. Lappalainen M, Hedman K. 2004. Serodiagnosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanità*. 40(1):81-88.
71. Carrada Bravo T. 1983. Toxoplasmosis. A public health problem. Advances and perspectives. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 40: 353-362.
72. Laison R. Toxoplasmosis congénita. En: Roch E. 1965. Toxoplasmosis congénita. Estudios realizados en México. *Salud Pública de México*. 7: 509-512.
73. Bustos Bahena ML. Seroprevalencia de infección por *Toxoplasma gondii* y factores de riesgo asociados en mujeres embarazadas de la ciudad de Jojutla, Morelos". Tesis de Maestría Univ. de Morelos, 2004.
74. Georgievski-Hrisoho M, Germann D, Matier L. 1996. Diagnostic Implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J. of Clinical microbiology*. pp 1506-1511.
75. Paul M, Petersen E, Szczapa J. 2001. Prevalence of Congenital *Toxoplasma gondii* Infection among Newborns from the Poznan Region of Poland: Validation of a New Combined Enzyme Immunoassay for *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin A and Immunoglobulin M Antibodies. *J Clin Microbiol*. 39: 1912-1916.
76. Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu, Peyron F. 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA. *Eur J Pediatr*. 158: 645-649.

77. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 246-251.
78. Daniel. 4ª Edición. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.
79. Sager H, Gloor M, Tenter A. 2003. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol Res* 91: 171-174.
80. Sensini A. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 12: 504-512.
81. Buffolano W, Lappalainen M, Hedman L. 2004. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23:825-830.
82. Prince HE, Wilson M. 2001. Simplified assay for measuring *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity. *Clin. and Diag. Laboratory immunology.* p. 904-908.
83. Flori P, Tardy L, Natural H, Belleste B, Varlet MN, Hafid J, Raberin H, Sung R. Reability of immunoglobulin G antitoxoplasma avidity index of infants and pregnant women. 2004. *Clin Diagn Lab Immunol.* p 669-674.
84. Galván Ramírez ML, Guillén VC, Saavedra DR, Islas RA. 1998. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 31: 271-277.
85. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 B. *Nature.* 227: 680-685.

86. Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T, Coltorti E (1989) Deciphering western blot of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg* 3:282-290.