



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN ELISA INDIRECTO PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR *Toxoplasma gondii* EN MAMÍFEROS  
DOMÉSTICOS Y SU USO POSTERIOR EN ANIMALES SILVESTRES EN  
CAUTIVERIO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**LIZBETH XICOTÉNCATL GARCÍA**

Asesores:

MPA Heriberto Caballero Ortega  
Dra. María Dolores Correa Beltrán



México, D.F. 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Esta tesis fue realizada y financiada en el Laboratorio de Inmunología Experimental. Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación.

## DEDICATORIA

A la memoria de mi padre... ya no me pregunto porque te fuiste, sino agradezco a Dios el permitirme conocerte y que me hayas enseñado a seguir caminando por más niebla que tenga mi sendero, a levantarme si tropezara con alguna piedra y en vez de verlas como un obstáculo, formar con ellas nuevos caminos... sé que estas siempre conmigo.

A mi mamita linda, que agradezco a Dios por tenerla como madre, es una mujer ejemplar, cuando la veo ella me da fuerzas para seguir adelante, y quién siempre me dice que tenga mucha fe, te amo má.

A mi hermanita ranita, mi mejor amiga, por su gran apoyo incondicional, siempre con un abrazo y palabras de aliento cuando más lo necesito, gracias nena.

A mi hermano que en ocasiones parece lejano, pero tú siempre estás muy cerca de mis pensamientos y de mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la vida por la oportunidad que me ha regalado de estar en donde estoy y ser quien soy.

A mis padres por los grandes esfuerzos que hicieron para que yo pudiera estudiar.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México y a mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mi tutor Heriberto Caballero Ortega, gracias por todo su apoyo, dedicación y paciencia durante el desarrollo de este proyecto, además de compartir su experiencia, conocimiento y amistad. Gracias Heri.

A mi tutora María Dolores Correa Beltrán, gracias por aceptarme en su laboratorio, por todo el gran apoyo que siempre me ha brindado, por su ejemplo de mujer visionaria y emprendedora, y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Carlos Cedillo Pelaez por ser mi tutor académico desde que lo conocí, por siempre apoyarme, por escucharme, por compartir conmigo este primer logro, por ser un gran amigo.

A mi jurado MVZ Froylán Ibarra Velarde, MVZ Evangelina Romero Callejas, MVZ Rosa Elena Miranda, MVZ Basurto, MVZ Alberto Guadarrama, gracias por haberle dedicado tiempo para la lectura de este escrito y por todos sus valiosos comentarios, correcciones y observaciones.

Al todo el equipo de trabajo del Instituto Nacional de Pediatría gracias por su asesoría principalmente a Esther Segura Calderón por facilitarme las membranas para los western blot, Héctor Luna, José Luis Islas por resolverme siempre mis dudas y facilitarme reactivos cuando a mi se me terminaban. A Belinda Ortíz por el apoyo brindado, por la literatura que me facilito y por su

amistad. A mi vecina Claudia Rico por todas sus atenciones conmigo, por su apoyo y sobre todo por su amistad. A Alejandro Besné por facilitarme las imágenes de los ciclos de vida. A cada uno de los miembros de este laboratorio les agradezco su disposición, su ayuda y que siempre me hayan echado porras para seguir adelante con mi tesis.

A todos los médicos que me ayudaron y me abrieron las puertas para la recaudación de sueros para esta tesis, MVZ Joaquín Aguilar Bobadilla, MVZ Felipe Durán, MVZ Josue Nava, MVZ Marco A. Herradora, MVZ Roberto Martínez Rodríguez, MVZ Elizabeth Morales Salinas, MVZ Cristina Guerrero Molina, MVZ Ignacio C. Rangel Rodríguez, QFB María de los Ángeles Pintado MVZ Abigail Romero, MVZ Daniel García Silva.

A todos los animales de los cuales obtuve las muestras, sin ustedes no tendría ningún sentido nuestra profesión, no habría avances en la ciencia, no tendríamos de que alimentarnos, ni tendríamos a nadie en casa quien nos recibiera con esa fidelidad y cariño sin ninguna condición, como solo ellos saben hacerlo gracias.

A mis amigas Vicky, Elve, Alma, Aby, Carmen, Claus, Beli, Perla, que han estado conmigo, por su apoyo, por las sonrisas, y todos los momentos compartidos.

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE CUADROS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESÚMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Biología del parásito.....	3
Taxonomía.....	3
Estructura del taquizoíto.....	3
Estructura del merozoíto.....	4
Estructura del bradizoíto.....	4
Estructura del ooquiste.....	5
Ciclo biológico.....	7
Patogenia y mecanismos de transmisión.....	9
Transmisión horizontal.....	10
Transmisión vertical.....	10
Epidemiología.....	11
Toxoplasmosis a nivel mundial.....	13
Toxoplasmosis en México.....	13
Respuesta inmune contra <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
Inmunoglobulinas en diferentes especies domésticas.....	19
Métodos de diagnóstico.....	20
Inmunodiagnóstico.....	21
Inmunodiagnóstico con proteína A y proteína G.....	23
Validación de pruebas diagnósticas.....	25
Terapéutica.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
Objetivos específicos.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
Material biológico.....	32
Muestreo sanguíneo.....	32
Banco de sueros.....	32
Estandarización del ELISA.....	33
Titulación de conjugados específicos y de la mezcla PA-PG.....	33
Puntos de corte.....	35
Estandarización de western blot.....	36
RESULTADOS.....	38
Estandarización.....	38
Proteínas A y G.....	39
Titulación de sueros por especie.....	42
Western blot.....	48
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS.....	57
APÉNDICE.....	79

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Taquizoítos, quistes tisulares y ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	6
2. Ciclo sexual de <i>T. gondii</i> .....	8
3. Ciclo de asexual de <i>T. gondii</i> .....	9
4. Representación esquemática de la relación entre el momento de la primoinfección durante el embarazo y la tasa de transmisión/afección fetal.....	11
5. Cinética de la respuesta inmune humoral a la primoinfección de <i>T.gondii</i> .....	18
6. Titulación de cinco conjugados comerciales anti IgG específicos a diferentes diluciones.....	38
7. Titulación de proteína A de <i>Staphylococcus</i> y proteína G de <i>Streptococcus</i> .....	41
8. Ejemplo de titulación de cuatro sueros de caninos con conjugado mezcla de PA-PG y conjugado anti IgG de canino.....	43
9. Distribución de frecuencias con posible punto de corte para ELISA indirecto en cinco especies domésticas .....	46
10 Curvas ROC para obtener el punto de corte en cérvidos, felinos y ovinos con conjugado de mezcla PA-PG. ....	47
11. Testigos positivos y negativos de western blot.....	48
12. Western blot de cinco especies domésticas.....	49



## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
1. Susceptibilidad de algunas especies a la infección natural por <i>T. gondii</i> .....	11
2. Prevalencia de <i>T. gondii</i> en especies domésticas en diversas regiones del mundo.....	14
3. Estudios de prevalencia de <i>T. gondii</i> en México.....	15
4. Tesis registradas en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM relacionadas con <i>T. gondii</i> .....	16
5. Clases y subclases de inmunoglobulinas en animales domésticos.....	19
6. Concentración de inmunoglobulinas en suero de animales domésticos...	20
7. Técnicas de diagnóstico para la detección de <i>T. gondii</i> .....	21
8. Cuadro de contingencia para la evaluación de los parámetros de rendimiento de una prueba diagnóstica.....	26
9. Valores de Kappa propuestos por Conraths y Schares para la interpretación de la concordancia entre dos pruebas.....	27
10. Diluciones utilizadas para la titulación de los conjugados específicos....	34
11. Condiciones de estandarización del western blot en cinco especies domésticas.....	37
12. Diluciones seleccionadas de conjugados anti IgG de especies domésticas para emplearlos en ELISAs directos.....	39
13. Detección de inmunoglobulinas por las proteínas A y G.....	40
14. Condiciones de estandarización para el ELISA indirecto.....	44
15. Coeficiente de variación entre el conjugado específico y la mezcla PA-PG.....	45
16. Puntos de corte, sensibilidad y especificidad de ELISA indirecto con conjugado mezcla PA-PG.....	48
17. Resultados de validación de ELISA.....	50
18. Resumen de datos de validación de ELISA indirecto con el uso de mezcla de PA-PG como conjugado universal para mamíferos domésticos...	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA: Ensayo inmunoenzimático

Fc: Fracción constante de las inmunoglobulinas

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PA: Proteína A

PBS: Solución de fosfatos salina

PBS-T: Solución de fosfatos salina adicionada con 0.05% de Tween

PG: Proteína G

ROC: *Receiver operating characteristic curve* (Curvas ROC)

## RESÚMEN

XICOTÉNCATL GARCÍA LIZBETH. Estandarización y evaluación de un ELISA indirecto para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii* en mamíferos domésticos para su uso posterior en animales silvestres en cautiverio (Bajo la dirección de M en C Heriberto Caballero Ortega y Dra. María Dolores Correa Beltrán).

El objetivo de este proyecto fue estandarizar y evaluar un ELISA indirecto para diagnosticar la infección por *Toxoplasma gondii*, en mamíferos domésticos y su uso posterior en fauna silvestre en cautiverio. Se detectaron anticuerpos anti- *T. gondii* en sueros de 8 especies domésticas, utilizando la mezcla de la proteína A de *Staphylococcus aureus* con la proteína G de *Streptococcus pyogenes* acopladas a peroxidasa como conjugado universal. Los resultados fueron comparados con su conjugado específico, demostrando una adecuada correlación entre ellos. Posteriormente se determinaron y se validaron los puntos de corte. Para caninos, caprinos, equinos se calculó la media más tres desviaciones estándar de las muestras de baja absorbancia y los resultados se confirmaron por inmunoblot. Para cérvidos, felinos y ovinos, el punto de corte se obtuvo mediante curvas ROC. La validación de la prueba en bovinos y suinos no fue posible, ya que no se logró la captura de animales seronegativos. La estandarización de este ELISA es importante como prueba de tamizaje para la determinación de infección por *T. gondii* en una amplia variedad de animales domésticos y su uso posterior en animales de zoológico, además de ampliar el conocimiento de la toxoplasmosis en México, minimizando tiempo y costo.

## INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii* es un parásito cosmopolita intracelular obligado que infecta probablemente a todos los vertebrados homeotermos (mamíferos terrestres, marinos y aves), causando problemas clínicos y zootécnicos.<sup>1,2</sup> Tiene tres variantes genéticas predominantes, clasificadas de acuerdo a su virulencia y patogenicidad. Las cepas tipo I son las más virulentas en ratones, las tipo II son endémicas en la mayoría de los animales y las tipo III son aisladas principalmente de especies silvestres. Además se han descrito cepas recombinantes y atípicas. Algunos estudios recientes han demostrado la presencia de nuevos genotipos con características particulares en diversas partes del mundo.<sup>3</sup>

La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial y con gran impacto en salud pública. Aproximadamente uno de cada tres individuos alrededor del mundo está infectado, con intervalos de prevalencia entre 12 y 90%, la cual se va incrementando con la edad. Causa retraso mental, pérdida de la visión y problemas de abortos en mujeres gestantes, además de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeficientes.<sup>1,4</sup>

Este protozoario es uno de los más estudiados, originando hasta el año 2000 más de 15 000 artículos originales, 500 revisiones, capítulos y libros.<sup>5</sup> A la fecha, en bases de datos como NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) se encuentran aproximadamente 16,556 artículos y 1,846 revisiones al introducir la palabra toxoplasmosis.

## **Biología del parásito**

### **Taxonomía**

*Toxoplasma gondii* es un protozoo perteneciente al Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoa, Subclase Coccidiasina, Orden Eimeriorina, y Familia Toxoplasmatidae. Hasta el momento, es la única especie descrita para el género.<sup>1,6</sup> Los miembros de la familia Felidae (gatos domésticos y silvestres) son los huéspedes definitivos, pues en ellos se realiza su fase sexual. Los huéspedes intermediarios son todos los animales homeotermos incluyendo al ser humano, dentro de los cuales se lleva a cabo sólo la fase asexual del parásito, el cual tiene cuatro estadios: merozoítos, taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos, siendo estos tres últimos los infecciosos tanto para los huéspedes definitivos como para los intermediarios.<sup>1,7</sup>

### **Estructura del taquizoíto**

El término “taquizoíto” viene de la palabra griega “*tachos*” que significa *rápido*, fue propuesto por Frenkel por la característica de su rápida multiplicación en células de huéspedes intermediarios y en la fase no intestinal del huésped definitivo. Este nombre vino a sustituir al término “trofozoíto” usado anteriormente. El taquizoíto generalmente presenta forma de media luna y mide alrededor de  $2 \times 6 \mu\text{m}$ , semejante al tamaño de un glóbulo rojo (Fig. 1). Posee un complejo apical en su extremo anterior que es característico del Phylum Apicomplexa y está cubierto por un complejo membranoso. En su interior tiene diferentes estructuras y organelos como anillos apicales y polares, conoide, roptrias, micronemas, mitocondrias,

microtúbulos, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, ribosomas, gránulos densos y gránulos de amilopectina. El núcleo se encuentra en el centro de la célula y contiene grupos de cromatina y un nucleolo céntrico. Aunque los taquizoítos pueden tener movimientos por deslizamiento, flexión, ondulación y rotación no cuentan con medios de locomoción como cilios o flagelos.<sup>8,9</sup>

### **Estructura del merozoíto**

Al conjunto de merozoítos se le llama esquizonte. Esta fase sólo se puede encontrar en el ciclo sexual o enteroepitelial del huésped definitivo (felinos). En la multiplicación por medio de endodiogenia y endopoligenia existen cinco fases (A, B, C, D y E), por las cuales pasan los esquizontes hasta convertirse en micro y microgametos.<sup>10,11</sup>

### **Estructura del bradizoíto**

La palabra “bradizoíto” viene del griego *brady* que significa *lento*, propuesto también por Frenkel, por su comportamiento de replicación lenta. Antiguamente eran llamados cistozoítos. A diferencia del taquizoíto, en esta fase el núcleo se encuentra en la parte posterior del parásito. Presentan roptrias con contenido electrodenso, el cual varía de densidad de acuerdo a su longevidad y contienen abundantes gránulos de amilopectina que son débilmente positivos a la tinción de ácido periódico de Shift y variable a tinciones argirofílicas (plata). Los bradizoítos miden  $7.0 \times 1.5 \mu\text{m}$ , se encuentran dentro de una estructura denominada quiste tisular, el cual se aloja en diversos órganos y es más resistente a su destrucción por enzimas proteolíticas. Los quistes jóvenes suelen ser pequeños y miden

aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen sólo 2 bradizoítos. Sin embargo conforme van madurando pueden contener cientos o miles de parásitos (Fig. 1). Los quistes observados en encéfalo son de forma esférica y miden 60  $\mu\text{m}$ , mientras que los quistes intramusculares son más alargados llegando a medir hasta 100  $\mu\text{m}$ .<sup>12</sup>

### **Estructura del ooquiste**

El ooquiste esporulado mide de 11 a 13  $\mu\text{m}$  de diámetro, su pared está constituida por tres capas de diferente densidad, conteniendo dos esporoquistes elipsoidales que miden 8  $\times$  6  $\mu\text{m}$  y cada uno cuenta con cuatro esporozoítos (Fig. 1). Ultraestructuralmente los esporozoítos son similares a los taquizoítos excepto que presentan mayor cantidad de micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina.<sup>12</sup>

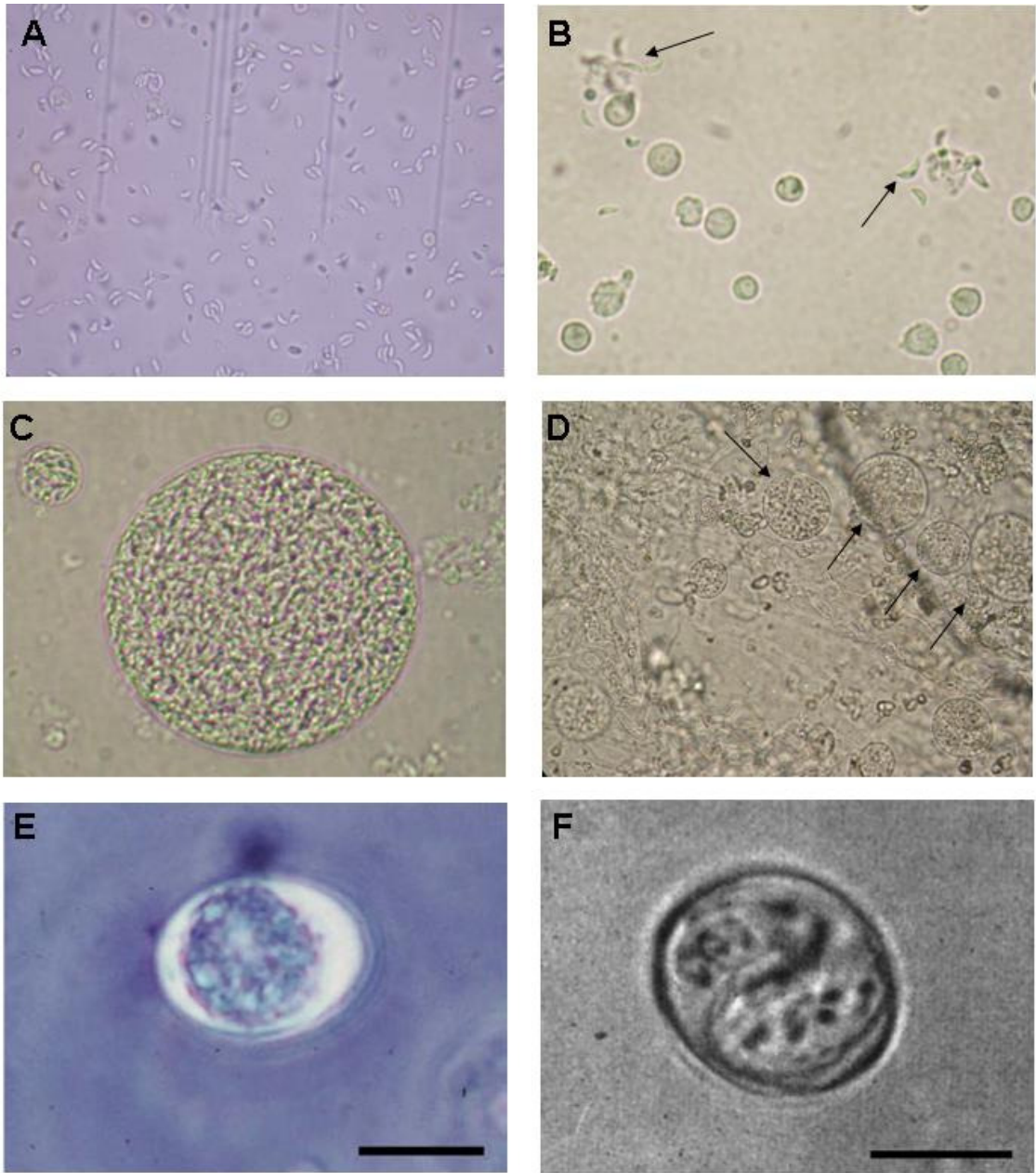


Fig.1. Taquizoítos, quistes tisulares y ooquistes de *Toxoplasma gondii*. A y B: lavado peritoneal de ratones inoculados con las cepas Me49 (A) y RH (B), observándose taquizoítos libres (flechas); observación directa, 400x. C y D: impronta de encéfalo de ratón inoculado con cepa asilada de un perro, apreciándose quistes tisulares (flechas), 400x. E y F: ooquiste no esporulado y ooquiste esporulado; la barra representa 5  $\mu$ m. Imágenes E y F.<sup>10</sup>



## **Ciclo biológico**

El ciclo de vida de *T. gondii* inicia cuando un gato doméstico o cualquier otro miembro de la familia Felidae, consume ooquistes contenidos en agua contaminada o quistes tisulares en tejidos de presas infectadas. Cualquiera de estos dos estadios llega a su aparato digestivo y por la acción de los jugos gástricos y de las enzimas proteolíticas del estómago e intestino delgado, se liberan los esporozoítos (en ooquistes) o los bradizoítos (en quistes tisulares) a la luz, invadiendo las células epiteliales del intestino. En este sitio se lleva a cabo la reproducción sexual del protozoario (gametogénesis, fecundación de los gametos y generación del ooblasto), lo que da origen a millones de ooquistes no esporulados, los cuales son liberados al ambiente con las heces. El período de eliminación de los ooquistes es de 1-3 semanas. Para que el ooquiste pueda ser infectivo tiene que esporular; este evento se lleva a cabo en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, las cuales son más favorables si son cálido-húmedas. Los ooquistes ya esporulados tienen la capacidad de permanecer viables e infectivos en el ambiente, desde meses hasta 1½ años.<sup>11-13</sup> El ciclo sexual de este parásito se puede completar en alrededor de 66 horas después de que el gato ingirió quistes tisulares (Fig. 2).

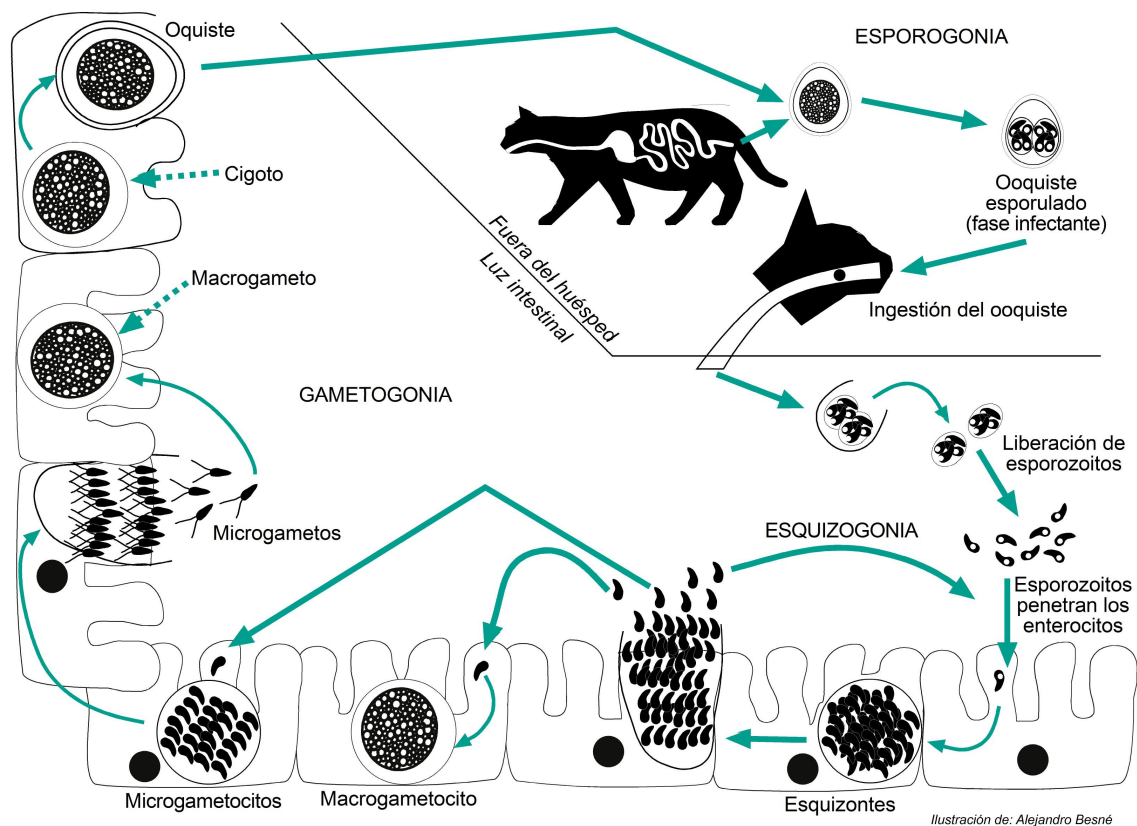


Fig. 2. Ciclo sexual de *T. gondii*. La esporogonia se repite hasta 5 veces, antes de que los esquizontes se vuelvan microgametos (masculinos) o macrogametos (femeninos). La esporogonia se desarrolla en 24 a 48 horas dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura.<sup>14</sup>

Cuando los huéspedes intermediarios consumen cualquiera de los estadios infecciosos de *T. gondii* y llegan a su mucosa intestinal, se diferencian en taquizoítos y se introducen en los enterocitos para replicarse asexualmente por endodiogenia, produciendo varias generaciones. Cada taquizoíto que infecta una célula puede generar hasta 32 copias. En ocasiones se logran observar rosetas de taquizoítos por la sincronía de la multiplicación. Si el huésped es un individuo inmunocompetente, generalmente controla la replicación del parásito, el cual se transformará en bradizoíto, enquistándose entre los tejidos y pudiendo persistir de

por vida en el huésped. Aunque los quistes tisulares tienen predilección por el sistema nervioso central, el ojo, el músculo cardíaco y el esquelético, también es posible encontrarlos en otros órganos como hígado, bazo, pulmón y riñón (Fig. 3).<sup>1,5,12,13,15</sup>

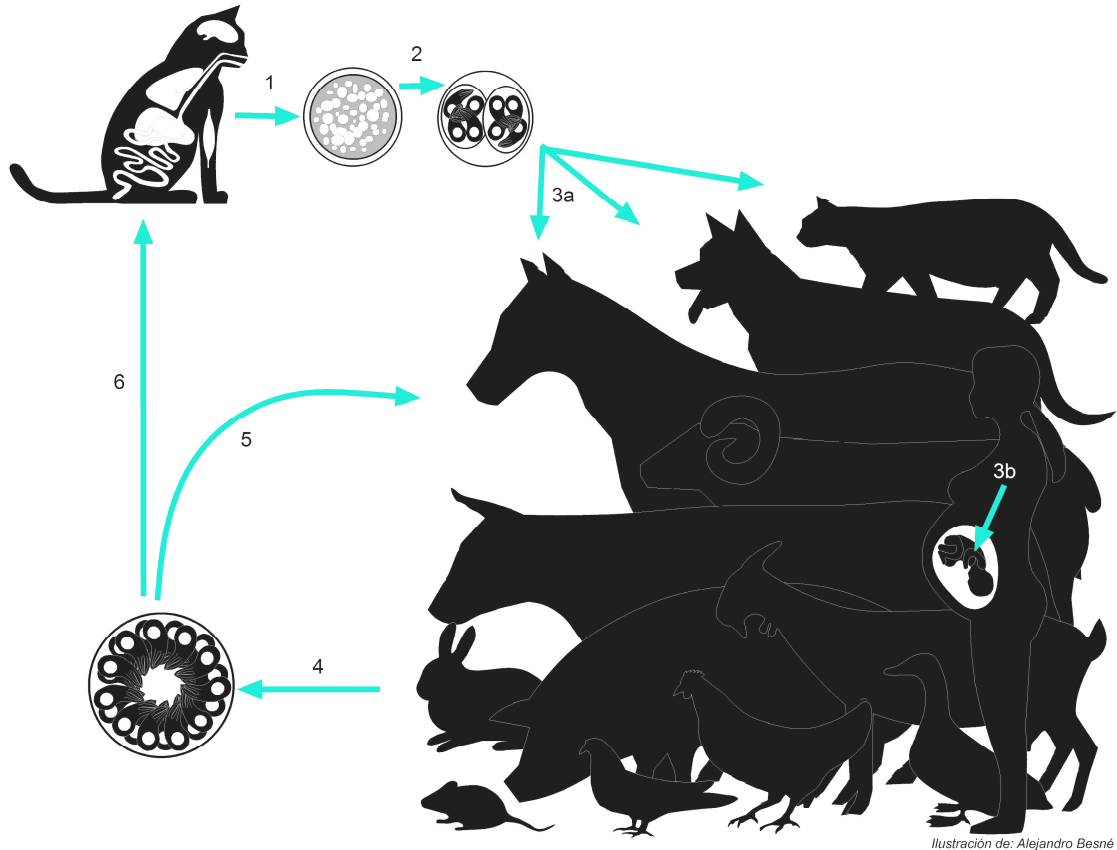


Fig.3. Ciclo de asexual de *T. gondii*. 1) Eliminación del ooquiste no esporulado, 2) Esporulación del ooquiste, 3a) Ingestión del ooquiste esporulado y comienzo de la reproducción sexual en felinos y asexual en otros mamíferos y aves, 3b) Transmisión congénita, 4) Formación de los quistes tisulares, 5 y 6) Ingestión del quiste tisular.<sup>14</sup>

## Patogenia y mecanismos de transmisión

La patogenia de la infección por *T. gondii* en humanos y en animales está directamente relacionada con la vía de transmisión, los sitios de multiplicación y la cepa del parásito. Dependiendo de estos factores, se presentarán las lesiones y la

signología clínica. La toxoplasmosis se puede transmitir horizontal (infección adquirida) o verticalmente (infección congénita).<sup>15,16</sup>

### **Transmisión horizontal**

Los huéspedes definitivos e intermediarios pueden infectarse mediante 3 rutas principales. 1) Por vía oral-fecal a través de las heces de gatos primo-infectados que contaminan el suelo, depósitos de agua para consumo humano, ríos, mares, pastos, forrajes, jardines, cultivos de frutas y vegetales con ooquistes esporulados; 2) a través del consumo de carne cruda o mal cocida contaminada con quistes tisulares y 3) mediante transplantes de diversos órganos.<sup>1,12,16,17</sup> Además se ha descrito la transmisión del parásito por consumo de leche cruda de borrega, cabra y vaca contaminada con taquizoítos.<sup>18</sup>

### **Transmisión vertical**

La toxoplasmosis es una de las zoonosis más estudiadas, debido al impacto que tiene en hembras gestantes y los daños que puede ocasionar a sus productos. Durante el primer trimestre de gestación en seres humanos, la transmisión al feto se presenta entre el 10 y 25% de los casos, provocando aborto espontáneo y muerte fetal. En el segundo trimestre de la gestación, el porcentaje de infección aumenta a 30-50%, produciendo lesiones severas como hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, hepatomegalia, ictericia y epilepsia. En el último tercio de la gestación, el riesgo de transmisión vertical es mayor al 60%; sin embargo, los fetos infectados generalmente nacen asintomáticos (Fig. 4).<sup>19-21</sup>

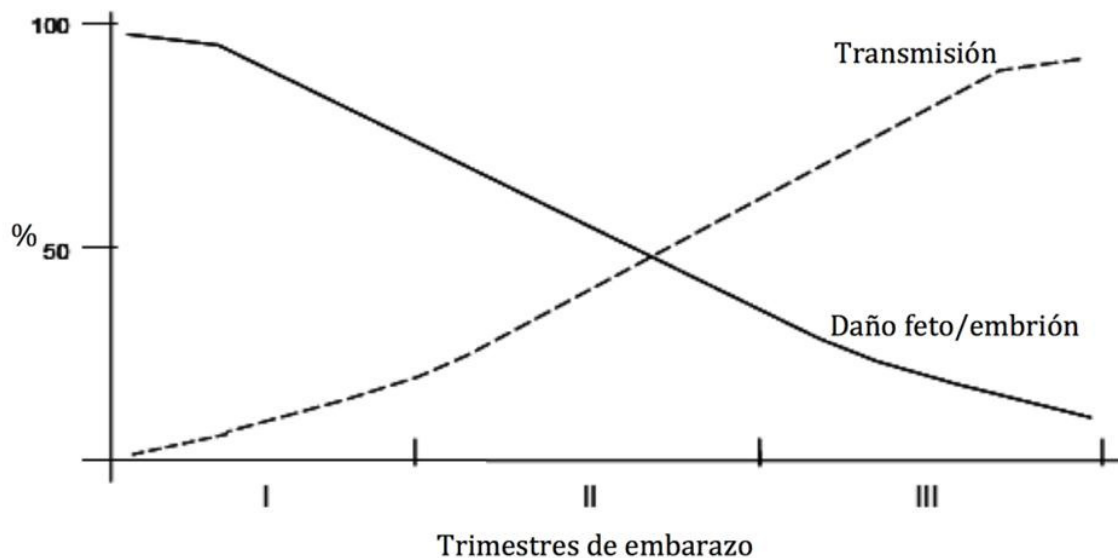


Fig. 4. Representación esquemática de la relación entre el momento de la primo-infección durante el embarazo y la tasa de transmisión / afección fetal.<sup>21</sup>

## Epidemiología

Existen factores que favorecen la infección y la presentación de signología clínica, como la susceptibilidad de cada especie (cuadro 1), el estado inmunológico del huésped, el tipo y virulencia de la cepa de *T. gondii* y la dosis infectante.<sup>16,22</sup>

Cuadro 1. Susceptibilidad de algunas especies a la presentación de toxoplasmosis<sup>22</sup>

ALTA	BAJA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marsupiales australianos (canguros y wallabies)</li> <li>• Primates del nuevo mundo</li> <li>• Lémures</li> <li>• Ovinos</li> <li>• Caprinos</li> <li>• Felinos pallas (cautiverio)</li> <li>• Canarios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primates del viejo mundo</li> <li>• Bovinos</li> <li>• Caninos y felinos domésticos</li> <li>• Equinos</li> <li>• Roedores (ratas)</li> </ul>

Los signos clínicos más frecuentes y generales en la mayoría de las especies son anorexia, depresión, fiebre, linfadenopatía, disnea, neumonía, diarrea, enteritis, cuadros hepáticos (ictericia, hepatomegalia y hepatitis), corioretinitis, queratoconjuntivitis, ceguera, desórdenes dermatológicos y cuadros neurológicos, principalmente encefalitis, provocando cambios de comportamiento, presentación e incremento de esterotipias, deficiencias propioceptivas, ataxia, temores y paresia, entre otros.<sup>23-33</sup>

Además, *T. gondii* puede causar trastornos reproductivos, reabsorción o muerte embrionaria temprana, momificación, muerte fetal, aborto o nacimientos de crías débiles. Las patologías reproductivas asociadas a la infección por este parásito han sido reportadas en diversas especies, principalmente en pequeños rumiantes donde hay un fuerte impacto económico por la presentación de abortos y nacimiento de crías débiles.<sup>34-38</sup> También se han reportado cuadros clínicos de toxoplasmosis asociados con enfermedades virales inmunosupresoras como peritonitis infecciosa felina, leucemia viral felina, inmunodeficiencia felina, moquillo canino, anemia hemolítica inmunomediada e individuos sometidos a terapia inmunodepresora para recepción de trasplantes.<sup>39-42</sup>

## **Toxoplasmosis a nivel mundial**

Debido a la poca especificidad por la especie de huésped, *T. gondii* produce una de las zoonosis más ampliamente distribuidas en el mundo, pues el 30% de los humanos están infectados por este parásito, aunque es menos frecuente en los polos y en las zonas frías y altas que en las zonas templadas, cálidas y bajas.<sup>12</sup> En el cuadro 2 se mencionan algunos reportes recientes de la prevalencia de *T. gondii* en especies domésticas de diversas partes del mundo.

## **Toxoplasmosis en México**

Con el fin de documentar la presencia de este parásito y su frecuencia aproximada, se han realizado algunos estudios piloto y otros de seroprevalencia de toxoplasmosis en donadores de sangre de Jalisco,<sup>43</sup> en mujeres embarazadas de Jojutla, Morelos y del Instituto Nacional de Perinatología del Distrito Federal (DF),<sup>44,45</sup> en recién nacidos del DF,<sup>46</sup> en gatos domésticos del DF y de Colima,<sup>47,48</sup> en conejos del DF, Estado de México y Puebla,<sup>49</sup> en borregos de Puebla y Colima,<sup>50,51</sup> y en venados cola blanca del noroeste de México.<sup>52</sup> Los resultados han demostrado que *T. gondii* es frecuente, pero tiene distribución variable, incluso en sub-regiones de un mismo estado. En el cuadro 3 se enlistan éstos y otros datos de prevalencia de *T. gondii* en especies domésticas y silvestres de México.

Cuadro 2. Prevalencia de *Toxoplasma gondii* en especies domésticas en diversas regiones del mundo

Especie	Región	Prueba	Prevalencia (%)	Referencia
Bovinos	Mazandaran, Irán	IFAT	0	53
	Malasia	IFAT	8.3	54
	Champagne, Francia	MAT	7.8	55
	Tanzania	LAT	3.6 – 16	56
Caprinos	Tailandia	LAT	27.9	57
	Mazandaran, Irán	IFAT	30	53
	Malasia	IFAT	35.5	54
	Brasil	PCR	7.84	58
	Minas Gerais, Brasil	ELISA e IFAT	43 y 46	59
	Punjab, Pakistán	LAT	19	60
Caninos	Sao Paulo, Brasil	ELISA	50.5	61
	Sao Paulo, Brasil	IFAT	33.1	62
	República Checa	ELISA IgM	2.4	63
		ELISA IgG	25.9	
	Bogota, Colombia	MAT	16.8	64
	Malasia	IFAT	9.6	54
	Alemania	ELISA e IFAT	32.65 y 29.8	65
	Mato Grosso, Brasil	IFAT	88.5	66
Equinos	Canadá	MAT	0.4	28
	Turquía	DT	20.6	67
	Suecia	DAT, ELISA	0.5	68
	Ankara, Turquía	DT	28	69
Felinos	Bélgica (Ghent)	MAT	70.2	70
	Colombia	MAT	35.8	71
	República Checa	IFA	44.1	63,72
	Río de Janeiro, Brasil	IHA	72	73
	Hungría	IFAT	47.6	74
	Corea	LAT	8.1	75
	California, USA	IFAT	60	76
	Pensilvania, USA	MAT	19.5	77
	Andalucía, España	MAT	50.2	78
	Ovinos	Sudáfrica	IFAT	5.6
República Checa		IFAT	4	72
España		MAT	40.4	80
Arabia Saudita		IFAT	52.2	81
Italia		IFAT	28.5	82
Punjab, India		ELISA	3.8	83
Egipto		MAT	43.7	84
Brasil		MAT	24.2	85
Río Grande, Brasil		IFAT	20.7	86
Suinos		Massachusetts	MAT	92.7
	Alemania	ELISA	18.5	88
	Argentina	MAT	37.8	89
	Paraná, Brasil	MAT	7.2	90
	Ontario, Canadá	ELISA	0.74	91
	Paraíba, Brasil	IFAT	36.2	92

DAT: aglutinación directa; DT: Dye-Test; ELISA: ensayo inmunoenzimático; IFAT: inmunofluorescencia indirecta; LAT: Prueba de aglutinación en latéx; MAT: aglutinación modificada; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.



Cuadro 3. Estudios de frecuencia/prevalencia de *T. gondii* en México

Especie	Lugar	n	Técnica	Prevalencia (%)	Referencia
Mapaches enanos ( <i>Procyon pygmaeus</i> )	Cozumel	300	IHA	11	93
Conejos domésticos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	México, DF	311	ELISA	26.9%	49
Gatos domésticos ( <i>Felis catus</i> )	Colima	80	ELISA	28.8	94
Caninos domésticos ( <i>Canis familiaris</i> )	Durango	101	IHA	51.5	95
Monos ardilla ( <i>Samiri sciureus</i> )	Guadalajara	25	Histopatología	100	30
Ovinos domésticos ( <i>Ovis aries</i> )	Colima	351	ELISA	29.1	50
	Puebla	103		77-84	51
Gatos domésticos ( <i>Felis catus</i> )	México, DF	169	ELISA y WB	21.8	48
Caninos domésticos		150		45.3	
Felinos domésticos		150		9.3	
Zarigüeyas	Durango	65	MAT	16.6	95
Ratas		249		0.8	
Ratones		127		3.1	
Ardillas		69		0	

IHA: Hemaglutinación indirecta; ELISA: ensayo inmunoenzimático; WB: western blot; MAT: Prueba de aglutinación modificada.

Además de los artículos arriba citados, se realizó una búsqueda de tesis de licenciatura y posgrado en la biblioteca de la FMVZ referentes a *T. gondii* (cuadro 4).

Cuadro 4. Tesis registradas en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM relacionadas con *T. gondii*

Especie	n	Técnica	Frecuencia (%)	Referencia
Urraca/pica caudata	67	Sabin y Feldman, inoculación experimental en ratones	2.98%	96
Cerdos	185	Inmunofluorescencia indirecta	92.9% 1:8 y 27.5% 1:64	97
Gatos	200	Coproparasitoscópico e inoculación de ratones	7%	98
Bovinos	1,237	Inmunofluorescencia	18.1%	99
Bovinos	100	Inmunofluorescencia indirecta	57%	100
Caprinos	150		32.66%	
Felinos silvestres	336	Coproparasitoscópico	0	101
Perros	300	Inmunofluorescencia indirecta	46.3%	102
Gatos	46	Coproparasitoscópico y ELISA	4.3% y 63%	103
Equinos	200	Inmunofluorescencia indirecta	50.5%	104
Felinos silvestres	20	Fijación de complemento	5%	105
Casos del depto. de patología 1980-1990	16,029	Inmunohistoquímica	0.062%	106
Wallabie de cuello rojo	12	Fijación del complemento	100%	107
Felinos silvestres	48	ELISA	58.33%	108
Seres humanos	201	Inmunofluorescencia	32.3%	109
Seres humanos	127	ELISA	15.74%	110
Mujeres	300	ELISA	13%	111
Mujeres	341	ELISA	26.98%	112
Gatos	112	ELISA IgG	21.8%	113
Fauna silvestre	25	PCR semianidada y reamplificaciones	48%	114

## **Respuesta Inmune contra *Toxoplasma gondii***

Una de las características inmunológicas de la infección por *T. gondii* es la fuerte y persistente respuesta inmune mediada por células, resultando en una protección del huésped a una reinfección en la mayoría de los casos.<sup>115</sup> Durante la fase aguda de la infección, los taquizoítos invaden prácticamente cualquier célula nucleada, multiplicándose exponencialmente hasta romper la célula afectada por acción mecánica. Durante este proceso, *T. gondii* interacciona con la respuesta innata, que es la primera barrera de protección mediada por células que se encuentran circulando en el torrente sanguíneo y linfático, como los neutrófilos y los macrófagos, llevando a cabo principalmente fagocitosis y las células NK (células asesinas naturales por sus siglas en inglés) provocando lisis celular. Asimismo, interacciona con células presentadoras de antígenos (CPAs), las cuales procesan componentes del taquizoíto y los presentan a través del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Si los antígenos son presentados por medio del MHC clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8+, los cuales proliferan y llevan a cabo el proceso de citotoxicidad, para finalmente inducir apoptosis de las células infectadas. Otras CPAs operan a través del MHC clase II, interactuando con linfocitos T CD4+, los cuales responden a la interleucina 12 (IL-12). Éstos desarrollan una respuesta tipo Th1 contra *T. gondii*, liberando citocinas como interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa e IL-15, que activan macrófagos y células NK, los cuales controlan la replicación de los taquizoítos, además de que son capaces de activar a más linfocitos T CD8+ y CD4+. Al inicio de la infección algunos linfocitos T CD4+ liberan IL-2 que activa a los linfocitos B

con receptores específicos y éstos se diferencian a células plasmáticas, para producir anticuerpos séricos dirigidos contra antígenos del parásito.<sup>116,117</sup>

La inmunidad humoral se dirige principalmente contra los taquizoítos. La producción de IgM aparece al final de la primera semana post-infección. La IgA se presenta poco después de la IgM, persistiendo durante 2 meses aproximadamente, aunque puede variar en pacientes adultos y recién nacidos con infección congénita. Algunas observaciones recientes indican que los anticuerpos IgM pueden durar por años, por lo que su presencia no siempre se asocia a la fase aguda de la infección. La IgG aparece de 2 a 3 semanas después de la primo infección, alcanzando sus niveles máximos a los 2 meses y persistiendo por meses e incluso por años (Fig. 5). Se considera la principal inmunoglobulina implicada en el control de la infección con *T. gondii*.<sup>116,117</sup>

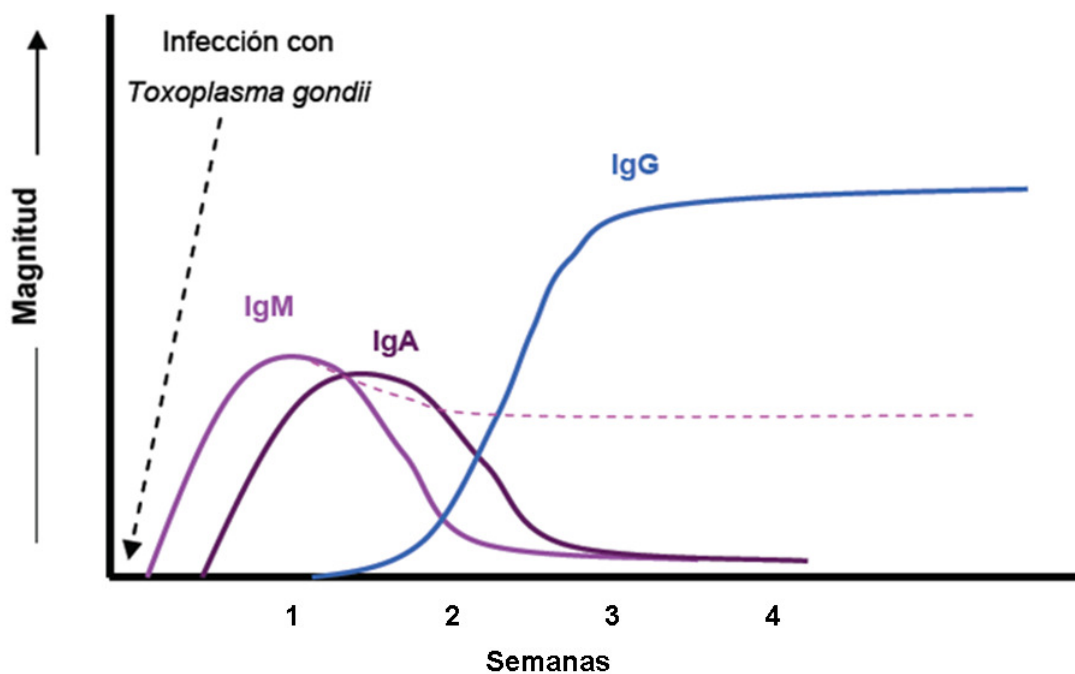


Fig. 5. Cinética de la respuesta inmune humoral a la primoinfección de *Toxoplasma gondii*.<sup>7</sup>

## Inmunoglobulinas en diferentes especies domésticas

La IgG es producida y secretada por las células plasmáticas del bazo, linfonodos y médula ósea. Todos los mamíferos tienen genes para producir las cuatro clases principales de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA e IgE (cuadro 5). Las características fundamentales de cada una de estas clases no difieren entre las especies. Sin embargo, durante la evolución ha sido frecuente que los genes duplicados puedan mutar y como resultado, los mamíferos producen subclases de inmunoglobulinas, especialmente de la IgG.<sup>116</sup>

Cuadro 5. Clases y subclases de inmunoglobulinas en animales domésticos <sup>116</sup>

Especie	IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
Borrego	G1, G2, G3	A1, A2	M	E	D
Caballo	G1, G2, G3, G4, G5, G6	A	M	E	D
Cerdo	G1, G2a, G2b, G3, G4	A	M	E	D
Gato	G1, G2, G3, (G4?)	(A2?)	M	(E1, E2?)	desconocido
Perro	G1, G2, G3, G4	A	M	(E1, E2?)	D
Vaca	G1, G2, G3	A	M	E	D

La concentración de cada clase de inmunoglobulinas varía de acuerdo con la especie, siendo los anticuerpos IgG's los de mayor abundancia en el suero de los seres humanos y las especies domésticas (cuadro 6).

Cuadro 6. Concentración de inmunoglobulinas (mg/dl) en suero de animales domésticos <sup>116</sup>

Especie	IgG	IgM	IgA	IgE
Borrego	1700-2000	150-250	10-50	desconocido
Caballo	1000-1500	100-200	60-350	8.4±9.09
Cerdo	1700-2900	100-500	50-500	desconocido
Gato	400-2000	30-150	30-150	desconocido
Perro	1000-2000	70-270	20-150	2.3-4.2
Vaca	1700-2700	250-400	10-50	desconocido

## Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *T. gondii* se puede realizar mediante una gran diversidad de técnicas, en las cuales se emplean diferentes muestras biológicas (sangre, suero, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, tejidos, entre otras); el resultado de dichas técnicas así como la signología clínica ayudan a establecer criterios para prevenir o tratar la enfermedad.

El diagnóstico específico de *T. gondii* se puede efectuar mediante técnicas directas como el xenodiagnóstico, el cultivo *in vitro*, la histopatología, la microscopía electrónica y los métodos moleculares. También se puede diagnosticar a través de técnicas indirectas como inmunofluorescencia directa o indirecta, prueba de Sabin-Feldman (o "Dye test"), hemaglutinación indirecta, aglutinación directa, fijación del complemento, western blot y ELISA. Los ensayos

inmunoenzimáticos son los que tienen la mayor sensibilidad y especificidad y se han usado con éxito tanto en seres humanos como en animales (cuadro 7).<sup>7,116</sup>

Cuadro 7. Técnicas de diagnóstico para la detección de *T. gondii*

Método	Diagnóstico	Técnica	Detección
<b>DIRECTOS</b>	Microscópico	Coproparasitoscópico Tinción:	Ooquistes, taquizoítos y quistes tisulares con bradizoítos
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Giemsa</li> <li>• Hematoxilina y eosina</li> </ul>	
	-----	Inmunohistoquímica Inmunofluorescencia	
	Ultraestructural	Microscopía electrónica	
-----	Aislamiento del parásito	Cultivo celular Bioensayos	
	Detección del genoma del parásito	PCR convencional PCR en tiempo real	DNA de <i>T. gondii</i>
<b>INDIRECTOS</b>	Detección de anticuerpos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sabin y Feldman (Dye test)</li> <li>• Prueba intradermoreacción a la toxoplasmina</li> <li>• Aglutinación directa e indirecta</li> <li>• Inmunofluorescencia directa e indirecta</li> <li>• Fijación del complemento</li> <li>• Hemaglutinación directa e indirecta</li> <li>• ELISA</li> <li>• DOT ELISA</li> <li>• Western blot</li> </ul>	Anticuerpos anti- <i>T. gondii</i> circulantes en fluidos corporales

## Inmunodiagnóstico

**ELISA indirecto.** El ensayo inmunoenzimático (ELISA por sus siglas en inglés) fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman. En este sistema, el antígeno se adhiere a una fase sólida (microplacas de poliestireno) y sobre ésta se incuban muestras de suero para la detección de anticuerpos específicos contra algún agente infeccioso. Para identificar la unión de los anticuerpos con el antígeno, se

utiliza un segundo anticuerpo conjugado a una enzima. El segundo anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al primero, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción, en la cual el sustrato se transforma en un producto de color. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -galactosidasa, debido a su estabilidad y a la reproducibilidad de resultados. 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 al oxidarse en la reacción enzimática desarrollan color. De éstos, la empleada con más frecuencia es la orto-fenilendiamina, que continúa en forma soluble después de ser oxidada.<sup>118</sup>

**Western blot.** La inmunoelectrotransferencia o Western blot fue descrita por Towbin y colaboradores en 1979. Esta metodología combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamina, en presencia o ausencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), con las reacciones inmunoenzimáticas en fase sólida. En el primer paso, las proteínas se separan de acuerdo a sus pesos moleculares, lo que permite su identificación. En seguida, son electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa o de nylon, en donde se unen a los grupos reactivos de éstas, quedando inmovilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón que se obtiene sobre la nitrocelulosa es una copia del patrón de separación obtenido en el gel. Posteriormente, se bloquean los sitios activos del papel que quedan libres, con alguna proteína que no interfiera con la unión del anticuerpo con su antígeno. La siguiente reacción que se efectúa corresponde a la primera interacción antígeno-anticuerpo, que se pone de manifiesto al agregar un segundo anticuerpo



acoplado a una enzima como la peroxidasa. En el ensayo enzimático se agrega el sustrato y un cromógeno como el 4-cloronaftol o la diaminobencidina que precipite *in situ* para hacer visible la reacción. Se puede identificar la clase de respuesta inmunológica del huésped (IgM, IgG, IgA, IgE), usando el conjugado correspondiente.<sup>118</sup>

### **Inmunodiagnóstico con proteína A y proteína G**

*Staphylococcus aureus* cepa Cowan y *Streptococcus spp* del Grupo C son bacterias que producen proteínas con capacidad específica para unir inmunoglobulinas de varias especies. La proteína A (PA) es un componente natural de la pared celular de *Staphylococcus aureus* y fue descrita por primera vez por Jensen (1958). Se utiliza como reactivo en una gran variedad de inmunoensayos, aprovechando su afinidad por la fracción constante (Fc) de diversas inmunoglobulinas. Tiene un peso molecular de 42 KDa y es uno de los principales y abundantes antígenos de superficie que utiliza la bacteria al momento de infectar a un organismo. La bacteria a través de la PA captura a los anticuerpos por su porción Fc, lo que le permite que toda su superficie se rodee de inmunoglobulinas, principalmente las de tipo gama, para inhibir la fagocitosis y evadir la respuesta inmune. Esta capacidad de adherir anticuerpos permite a la bacteria colonizar sitios de tropismo como epitelios de vasos sanguíneos, uniéndose a ellos y provocando mayor producción de fibrinógeno y factores como el de Von Willerbrand, al cual se une.<sup>119,120</sup>

La proteína G (PG) fue aislada inicialmente de *Streptococcus* del grupo A y más tarde fue caracterizada por Bjorek y Kronwall (1984). Tiene un peso molecular de

30 KDa con dos a tres sitios de unión para la porción Fc de las inmunoglobulinas gama.<sup>119</sup> Desde la década de los 80's se estudiaron los receptores de la PA y la PG para la porción Fc de las IgGs de perro, cobayo, borrego, vaca y rata y se observó que las proteínas tienen ciertas características de detección de inmunoglobulinas. La PA detecta con mayor afinidad las IgGs de perro y cobayo y la PG las de borrego y vaca, por lo que ellos determinaron que sería mejor hacer una quimera con ambas proteínas para unir sus características y potencializar su rango de reconocimiento de IgGs en varias especies. El resultado fue que la quimera reconocía las inmunoglobulinas de todas las especies probadas, a excepción de la IgG de rata.<sup>121</sup>

Ambas proteínas se han utilizado solas o en combinación como conjugados en ensayos inmunoenzimáticos indirectos, especialmente en el diagnóstico veterinario debido a la aplicabilidad multiespecie para detectar la infección con agentes patógenos como *Borrelia burgdorferi* en cérvidos, roedores domésticos y silvestres (PG),<sup>122,123</sup> *Borrelia garinii* (Enfermedad de Lyme) en perros para caza, muflones y venados (PA y PG),<sup>124</sup> *Brucella abortus* en bovinos (PA y PG),<sup>125,126</sup> *Brucella canis* en perros (PA y PG),<sup>127</sup> *Brucella melitensis* en borregos (PG),<sup>128</sup> *Brucella sp* en mamíferos marinos (PG),<sup>129,130</sup> osos polares -*Ursus maritimus*- (PA)<sup>131</sup> y en bovinos, caprinos, suinos y caninos (PA y PG),<sup>123</sup> Hantavirus en roedores (PA y PG),<sup>132</sup> *Mycobacterium bovis* en cerdos silvestres (PA y PG),<sup>133</sup> *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en lobos -*Chrysocyon brachyurus*- (PA)<sup>134</sup> y en focas marinas (PG),<sup>135</sup> *Toxoplasma gondii* en cerdos (PG),<sup>136</sup> animales silvestres en cautiverio (PA)<sup>137</sup> y *Pseudomona aeruginosa* en minks (PA y PG).<sup>138</sup>

## **Validación de pruebas diagnósticas**

Las pruebas diagnósticas tienen como objetivo diferenciar entre salud y enfermedad o discernir entre diversas categorías de estas dos entidades.<sup>139</sup> Una prueba diagnóstica en términos generales se caracteriza por tener dos componentes:

- 1) Una variable separadora que esta asociada con una enfermedad dada.
- 2) Un criterio de positividad usado para separar los pacientes “sanos” de los “infectados” o “enfermos” en la variable separadora.<sup>140</sup>

Las pruebas de diagnóstico deben ser de bajo costo, fáciles de realizar y de alta sensibilidad y especificidad, con lo cuál dicha prueba será útil para la detección de casos con enfermedad, es decir, que tengan un alto Valor Predictivo Positivo (VPP) y de igual manera que sea capaz de identificar a aquellos sujetos no enfermos, esto es que tengan un adecuado Valor Predictivo Negativo (VPN).

La sensibilidad en una prueba se define como la proporción de sujetos que tienen enfermedad y en quienes la prueba diagnóstica resulta positiva, en tanto que la especificidad se conoce como la proporción de sujetos sin enfermedad en quienes la prueba resulta negativa.<sup>141</sup>

Como los datos de sensibilidad y especificidad son cualitativos, ya que indican presencia o ausencia confirmada de enfermedad y resultado positivo o negativo de una prueba diagnóstica, se utilizan los cuadros de doble entrada (matriz de decisión) para su presentación numérica.

Cuadro 8. Cuadro de contingencia para la evaluación de los parámetros de rendimiento de una prueba diagnóstica <sup>142</sup>

Prueba a validar	Prueba de referencia		
	Positivo	Negativo	Totales
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Totales	A+C	B+D	N

Las fórmulas para calcular los parámetros que nos permiten evaluar una prueba están basadas en el cuadro anterior y son las siguientes:

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{Verdaderos positivos (A)}}{\text{Verdaderos positivos (A) + Falsos negativos (C)}}$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{Verdaderos negativos (D)}}{\text{Verdaderos negativos (D) + Falsos positivos (B)}}$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP)} = \frac{\text{Verdaderos positivos (A)}}{\text{Total de positivos (A+B)}} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN)} = \frac{\text{Verdaderos negativos (D)}}{\text{Total de negativos (C+D)}} \times 100$$

Un valor estadístico que nos permite evaluar la concordancia entre dos pruebas es el coeficiente *kappa*, el cual se obtiene dividiendo la proporción de la concordancia observada (PO) entre la proporción de concordancia esperada (PE).

$$PO = \frac{A+D}{n}$$

$$PE = \frac{(A+B)}{n} \times \frac{(A+C)}{n} + \frac{(C+D)}{n} \times \frac{(B+D)}{n}$$

$$\text{Kappa} = \frac{PO - PE}{1 - PE}$$

Como se observa en el cuadro 9, su valor puede variar desde -1 (sin concordancia) hasta 1 (excelente concordancia).<sup>142</sup>

Cuadro 9. Valores de Kappa propuestos por Conraths y Schares para la interpretación de la concordancia entre dos pruebas

Rango	Concordancia
-1 a 0	No concordancia
0 a 0.20	Leve
0.21 a 0.40	Regular
0.41 a 0.60	Moderada
0.61 a 0.80	Sustancial
>0.81	Casi perfecta

Mientras que la sensibilidad y la especificidad son características de la prueba diagnóstica, los valores de predicción dependen no sólo de las características de dicha prueba, sino también de la prevalencia de la enfermedad (definida como  $A+C / A+B+C+D$ ); ésta tiene un efecto directo sobre el VPP e inverso sobre el VPN.

Otro de los aspectos que es interesante analizar para una prueba que proporciona valores numéricos, es el punto de la serie de dichos valores que se debe considerar como el límite para el establecimiento de positividad o negatividad, o sea el punto de corte. Uno de los métodos que permite determinar este límite entre una muestra negativa y una positiva es la curva ROC (Receiver Operating Characteristic curve, por sus siglas en inglés), la cual es una representación gráfica de diversos valores de sensibilidad y de especificidad.<sup>143</sup> El mejor punto de

corte se elige con base en los puntos de la curva en que se tiene la mayor sensibilidad y especificidad y corresponden a los puntos del cuadrante superior izquierdo.

Con el simple cambio de criterio de positividad se cambia la probabilidad de considerar como “enfermo” a un paciente que cumpla dicho criterio, si se desplaza el criterio de positividad hacia los valores más bajos, se incluye a una mayor proporción del total de enfermos, pero también se aumenta el número de no enfermos con resultados falsos positivos. En cambio, si se desplaza el criterio de positividad hacia los valores más altos, se excluye a una mayor proporción de los verdaderamente sanos pero, al mismo tiempo, se aumenta la proporción de enfermos que en realidad son sanos, es decir, falsos negativos. Entonces se puede modificar el punto de corte para obtener el mejor valor de sensibilidad, de especificidad o de algún valor predictivo, decisión que depende del uso que se le quiera dar a la prueba.<sup>143,144</sup>

## **Terapéutica**

Actualmente la posibilidad de erradicación de la toxoplasmosis en un huésped infectado se considera nula, ya que es un parásito intracelular obligado y rápidamente se enquistado, lo que impide que los antiparasitarios alcancen su blanco. Los fármacos más utilizados interfieren con enzimas del metabolismo de los precursores de los ácidos nucleicos, como la di-hidro-folato reductasa. La pirimetamina es el compuesto de primera elección, ya que es la más eficaz para inhibir la replicación de los taquizoítos. Este medicamento se administra junto con sulfadiazina y ácido fólico para reducir los efectos negativos sobre la

hematopoyesis. En seres humanos con infección congénita se sugiere dar el tratamiento durante un año y dar seguimiento de por vida. También se utilizan los macrólidos como la clindamicina o la espiramicina, pero tienen una eficacia menor. Sin duda, ésta es una de las áreas de investigación y desarrollo más urgentes de esta enfermedad.<sup>15</sup>

## JUSTIFICACIÓN

Si bien existen algunos estudios de la prevalencia de *T. gondii* en animales domésticos y silvestres en México, es escasa la información que documente la magnitud de esta enfermedad asociada a factores de riesgo, su distribución por regiones y por especies. La estandarización de una técnica de diagnóstico para la detección de *T. gondii* en la mayoría de mamíferos sin importar si son domésticos o silvestres, permitirá ampliar el conocimiento de la toxoplasmosis en México, minimizando tiempo y costo.

El ELISA tiene alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la infección por *T. gondii*. Para realizarlo se utiliza un conjugado específico para cada mamífero doméstico o silvestre, pero no se cuenta con una amplia gama de conjugados comerciales específicos principalmente de especies silvestres, lo que limita el diagnóstico presuntivo. La proteína A (PA) de *Staphylococcus aureus* reconoce la IgG de mamíferos excepto la de ratas, cabras y borregos, mientras que la proteína G (PG) de *Streptococcus pyogenes*, reconoce la IgG de mamíferos y pollos exceptuado la de gatos. Si se mezclan las dos proteínas conjugadas a peroxidasa, se podrán utilizar como un conjugado universal en un ELISA indirecto para reconocer anticuerpos anti-*T. gondii* en la mayoría de los mamíferos y establecer un diagnóstico en cualquier especie.

## HIPÓTESIS

El uso de una mezcla de proteína A de *Staphylococcus aureus* con proteína G de *Streptococcus pyogenes* conjugadas a peroxidasa en un ELISA indirecto, detectará anticuerpos contra *T. gondii* en mamíferos domésticos.



## **OBJETIVO GENERAL**

Estandarizar un ELISA indirecto para el diagnóstico de infección por *T. gondii* en mamíferos domésticos con la mezcla PA-PG como conjugado universal para su uso posterior en animales silvestres en cautiverio.

### **Definición de variables**

Independiente: conjugado a utilizar (específico o mezcla PA-PG). Nominal

Dependientes: A) Absorbancia. Numérica continua  
B) Resultado de la prueba (dicotómica).

### **Tipo de estudio**

Observacional, prospectivo, transversal

### **Objetivos específicos**

1. Detectar la afinidad de las proteínas A y G a las IgGs de las diferentes especies incluidas en el estudio.
2. Determinar la correlación entre los conjugados específicos y la mezcla de proteína A y G en un ELISA indirecto.
3. Estandarizar un western blot con la mezcla de proteína A y G como conjugado para validar el ELISA indirecto.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

La adquisición de los sueros se llevó a cabo mediante los siguientes métodos:

- Muestreo sanguíneo (caninos, caprinos, equinos, suinos)
- Banco de sueros (bovinos, cérvidos, felinos, ovinos)

Las muestras se obtuvieron de diversos ranchos particulares y de algunos centros de producción y enseñanza quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### **Muestreo sanguíneo**

La toma de muestra sanguínea se llevó a cabo mediante punción de la vena yugular o de la vena cefálica en grandes y pequeñas especies respectivamente. Se obtuvieron 5 ml de sangre y se depositaron en tubos sin anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a  $2,000 \times g$  y el suero se fraccionó y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Banco de sueros**

Los sueros obtenidos a través de bancos debían cumplir con un volumen mínimo de 1 ml y no debían haber sido descongelados más de tres veces.

Se obtuvieron 44 sueros de caprinos, 80 de roedores (40 de ratas y 40 de ratones) y 21 de suinos, mientras que de bovinos, caninos, equinos, felinos y ovinos se obtuvieron 45 muestras de cada especie.

## **Estandarización del ELISA**

### **Titulación de los conjugados específicos y de la mezcla PA-PG**

Para llevar a cabo la titulación de los conjugados específicos comerciales anti-IgG (Sigma Aldrich), se estandarizó un ELISA directo. Los pozos de las placas para este inmunoensayo se sensibilizaron con 100  $\mu$ l de suero diluido 1:100 en amortiguador de carbonatos (15 mM), pH 9.6 y se incubaron a 4°C toda la noche. Los pozos se lavaron 5 veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS) adicionado con 0.05% de Tween 20 (-T) y posteriormente los sitios inespecíficos de unión se bloquearon con 200  $\mu$ l de leche descremada al 5%. Se llevaron a cabo diluciones de los conjugados específicos por debajo y por arriba de las recomendaciones del fabricante (cuadro 10) y se incubaron durante 2 h a 37°C. La detección de anticuerpos IgG totales fue revelada con 100  $\mu$ l por pozo de una solución de sustrato/cromógeno (5 ml de citrato de sodio 0.1M y 5 ml de ácido cítrico 0.1M más 5 mg de Ortofenilendiamina, adicionada con 4  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30%). Después de 10-20 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1N. Los valores de absorbancia se obtuvieron mediante un lector de ELISA (Turner Biosystems 9300-010) a 490 nm de longitud de onda y se capturaron a través del programa Modulus™ Microplate Reader.

Cuadro 10. Diluciones utilizadas para la titulación de los conjugados específicos

Conjugado	Diluciones				
	Anti IgG				
Bovino	1:5,000	1:10,000	<b>1:20,000</b>	<b>1:30,000</b>	1:40,000
Canino	1:2,500	1:5,000	<b>1:10,000</b>	1:20,000	1:30,000
Caprino	1:5,000	1:10,000	1:20,000	<b>1:40,000</b>	1:80,000
Equino	1:2,500	1:5,000	<b>1:10,000</b>	1:20,000	1:30,000
Suino	1:20,000	1:30,000	<b>1:40,000</b>	<b>1:50,000</b>	1:60,000

\*Los números en **negritas** indican las diluciones recomendadas por el fabricante.

Para estandarizar la dilución de las proteínas A y G unidas a peroxidasa, solas y en combinación que funcionaron como conjugado, se realizaron diluciones de 1:5,000, 1:10,000, 1:20,000, 1:30,000, 1:40,000 y 1:60,000 y se realizaron ELISAs directos bajo las mismas condiciones que para los conjugados específicos. Una vez que se determinaron las diluciones óptimas de los conjugados específicos, así como de la mezcla PA-PG y para demostrar la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* en las muestras de las diferentes especies estudiadas, se estandarizó la dilución de los sueros por especie mediante un ELISA indirecto. Para ello las placas de poliestireno se incubaron con un extracto crudo de taquizoítos de *T. gondii* descrito previamente,<sup>49</sup> a una concentración de 2 µg/ml del antígeno, diluido en amortiguador de carbonatos 15 mM, pH 9.6 a 4°C toda la noche. Se realizaron 5 lavados con PBS-T y se bloquearon los sitios inespecíficos de unión como se describió previamente. Se realizaron diluciones dobles seriadas de 4 sueros de cada especie a partir de 1:50 y hasta 1:1600, se agregaron 100 µl de la dilución en cada pozo y se incubaron durante 2 h a 37°C. Se adicionaron 100 µl de la dilución previamente

estandarizada del conjugado específico o de la mezcla PA-PG y el complejo antígeno-anticuerpo anti-*T. gondii* se reveló con la solución sustrato/cromógeno descrita previamente.

Una vez establecidas las condiciones óptimas del ELISA indirecto para cada especie, se probaron simultáneamente todos los sueros obtenidos de cada una de ellas con el conjugado específico por una parte y por otra con la mezcla PA-PG. Los valores de absorbancia obtenidos con el conjugado específico se compararon con aquellos obtenidos con el conjugado PA-PG por regresión lineal.

### **Puntos de corte**

Después de estandarizar la dilución óptima de la mezcla PA-PG y de probar los sueros de cada especie con este conjugado universal, se procedió a calcular los puntos de corte para cada especie. Para aquellas especies donde ya se tenían sueros negativos y positivos (cérvidos, felinos y ovinos) confirmados por más de una técnica, el punto de corte se estableció mediante curvas ROC. En las especies donde no se tenían testigos negativos ni positivos validados (bovinos, caninos, caprinos, equinos y suinos), se establecieron dos poblaciones de muestras (una de baja y otra de alta absorbancia) mediante gráficos de distribución de frecuencias. Con ellos, se estableció un punto de corte inicial, calculando la media de las muestras de baja absorbancia más 3 desviaciones estándar. Además, se determinó que ésta población tuviera distribución normal, a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Programa SPSS, versión 10.0). El punto de corte calculado en cada especie, se confirmó con un segundo inmunoensayo (Western blot).

## **Estandarización de western blot**

Esta técnica fue adaptada para bovinos, caninos, caprinos, equinos y suinos a partir de inmunoblots previamente estandarizados para humanos, ovinos y cérvidos.<sup>46,51,52</sup> Brevemente, las proteínas de diez millones de taquizoítos se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 11% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 2% diluida en PBS-T durante 1 h a 37°C. Se cortaron tiras de nitrocelulosa y se incubaron con diluciones dobles seriadas (1:50 a 1:400) de sueros en PBS-T durante 1 hr a 37°C y después toda la noche a 4°C. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron con la mezcla de PA-PG conjugadas a peroxidasa durante 2 h a 37°C. Para revelar las proteínas inmunodetectadas se usaron 60 mg de 4-cloro-1-naftol diluido en 5 ml de metanol más 5 ml de PBS y 100 µl de peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con agua destilada. En el cuadro 11 están resumidas las condiciones de estandarización para cada especie. Para obtener testigos negativos y positivos de bovinos, caninos, caprinos, equinos y suinos, se probaron sueros de baja y de alta absorbancia de cada una de estas especies. Enseguida, se probaron sueros que estuvieran alrededor del punto de corte estimado por ELISA hasta encontrar sueros que presentaran menos de tres bandas diagnósticas o no tuvieran inmunoreactividad, los cuales fueron considerados como negativos.

Cuadro 11. Condiciones de estandarización del western blot en cinco especies domésticas

<b>Especie</b>	<b>Suero</b>	<b>Conjugado PA-PG</b>
Bovinos	1:50	1:500
Caninos	1:50	1:2,000
Caprinos	1:100	1:2,000
Equinos	1:50	1:500
Suinos	1:25	1:400

La concentración de antígeno utilizada fue 20 millones de taquizoítos por gel

## RESULTADOS

### Estandarización

Se llevó a cabo la titulación de cinco conjugados comerciales anti-IgG específicos en inmunoensayos directos (Fig. 6). Con base en la definición de título, es decir, la dilución suficiente de conjugado que dé una absorbancia mínima de 1.0 a 450 nm, después de 30 minutos de la conversión del sustrato a 25°C,<sup>145</sup> se eligieron las diluciones señaladas en el cuadro 12, para emplearlas en los ensayos directos.

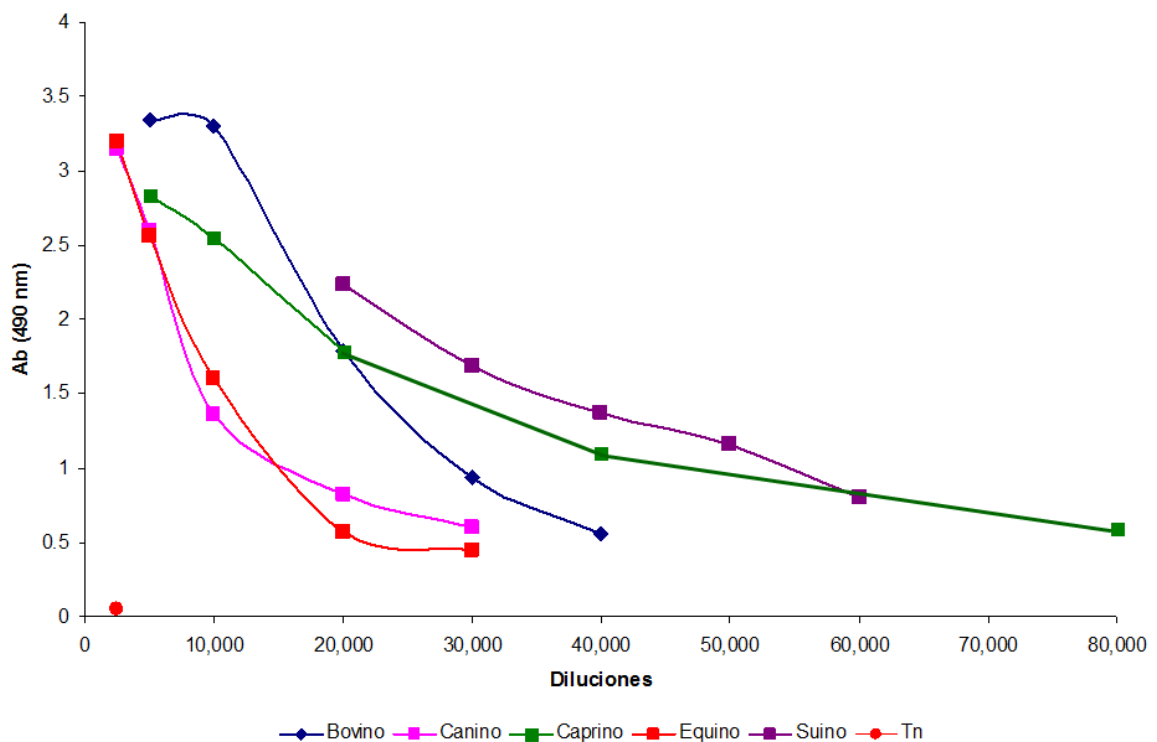


Fig. 6. Titulación de 5 conjugados comerciales anti IgG específicos a diferentes diluciones. Tn: (Testigo negativo)



Cuadro 12. Diluciones seleccionadas de conjugados anti IgG de especies domésticas para emplearlos en ELISAs directos

Conjugado anti IgG	Dilución	Absorbancia
Bovino	1:20,000	1.8
Canino	1:10,000	1.4
Caprino	1:20,000	1.7
Equino	1:10,000	1.6
Suino	1:30,000	1.7

## Proteína A y G

La PA de *Staphylococcus aureus* y la PG de *Streptococcus pyogenes* se utilizaron como conjugado universal en ocho especies para detectar anticuerpos anti-*T. gondii*. Las inmunoglobulinas de borregos, cerdos, caballos, y perros fueron reconocidas por ambas proteínas, mientras que las de los bovinos, caprinos y cérvidos sólo fueron reconocidos por la PG y las de felinos sólo por la PA. Las inmunoglobulinas de las ratas y de los ratones no fueron detectadas por ninguna de ellas, por lo cual no se pudo continuar con la estandarización del ELISA en estas especies (cuadro 13). En la figura 7 se muestra la titulación de las PA y PG en las diferentes especies estudiadas.

Cuadro 13. Detección de inmunoglobulinas por las proteínas A y G

<b>Especie</b>	<b>Proteína A</b>	<b>Proteína G</b>
Bovino	–	+
Canino	+	+
Caprino	–	+
Cérvido	–	+
Equino	+	+
Felino	+	–
Ovino	+	+
Roedor (Rata)	–	–
Roedor (Ratón)	–	–
Suino	+	+

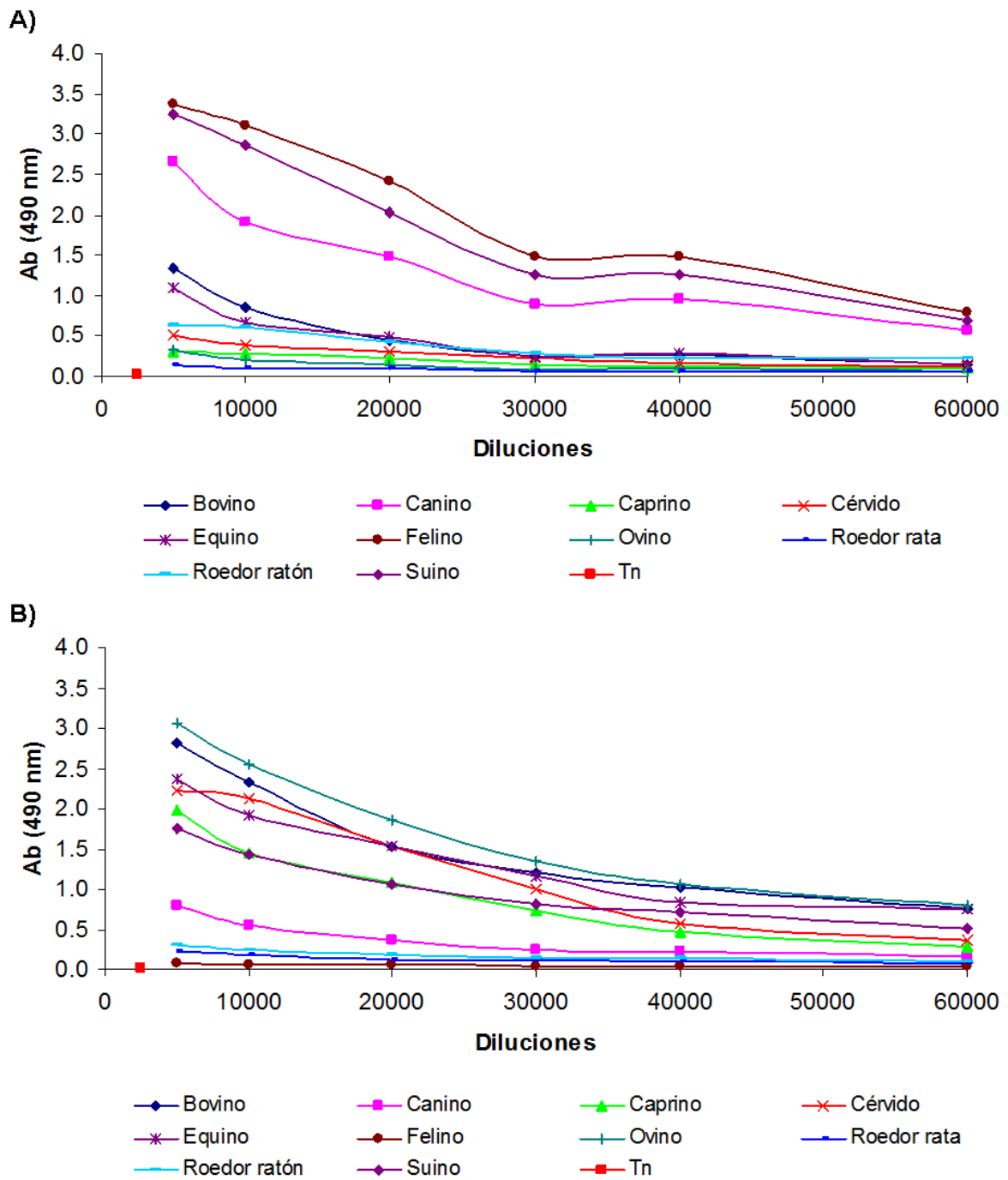


Fig. 7. Titulación de PA (A) y de PG (B). Tn (Testigo negativo)

Debido a que los anticuerpos de la mayoría de las especies fueron reconocidos por una o ambas proteínas a la dilución 1:10,000 de la mezcla PA-PG, dicha dilución fue la que se empleó en los ensayos indirectos.

### **Titulación de sueros por especie**

Las diluciones de suero de cada especie se determinaron mediante ELISAs indirectos, empleando las diluciones de conjugado específico y mezcla de PA-PG previamente estandarizadas (Fig. 8). En el cuadro 14 están resumidas las condiciones con las que se llevaron a cabo los ensayos indirectos en 8 especies animales.

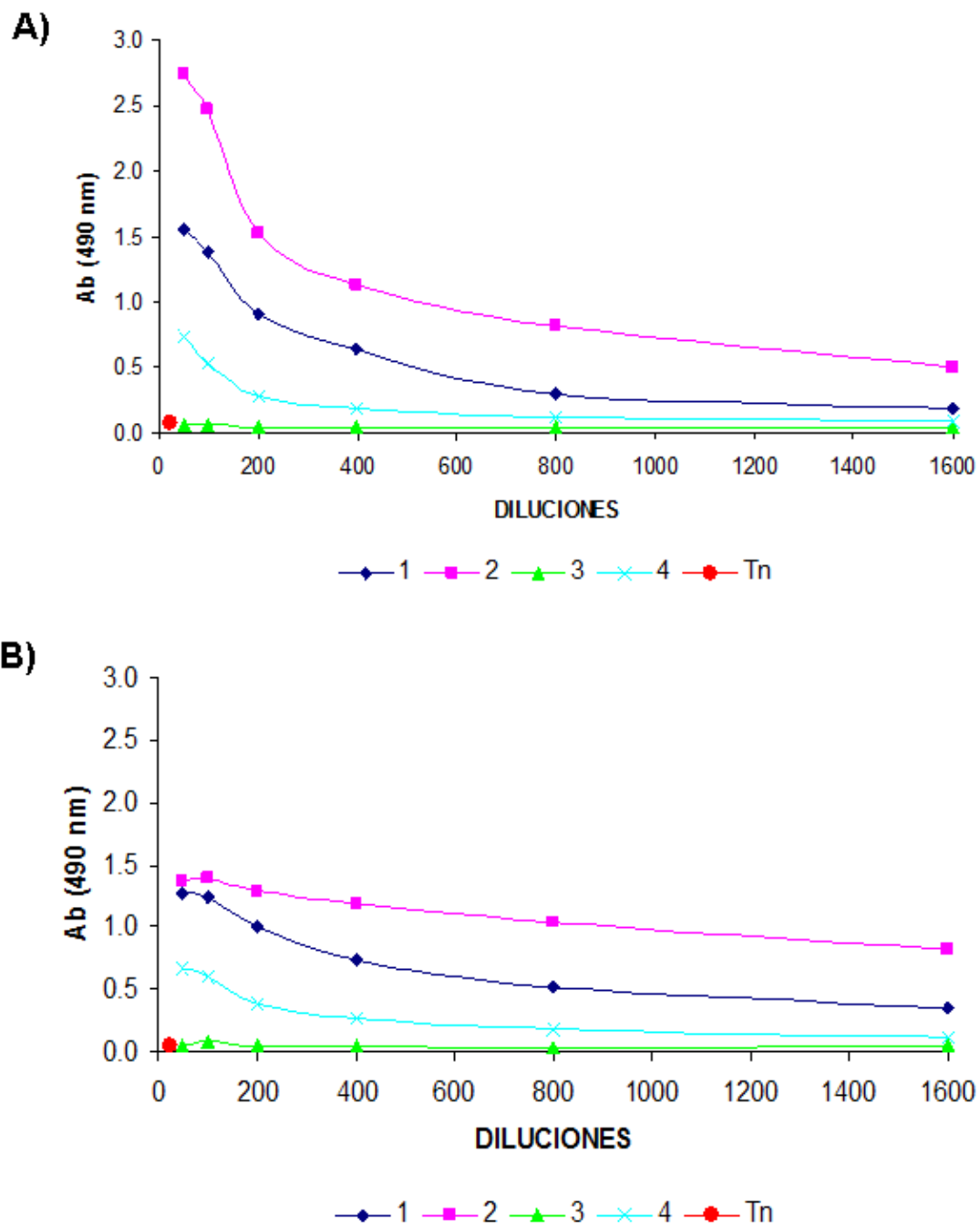


Fig. 8. Ejemplo de titulación de 4 sueros de caninos con conjugado mezcla de PA-PG 1:10,000 (A) y conjugado anti-IgG de canino 1:5,000 (B). Tn (Testigo negativo)

Cuadro 14. Condiciones de estandarización para ELISA indirecto

<b>Especie</b>	<b>Suero</b>	<b>Conjugado específico</b>	<b>Conjugado PA-PG</b>
Bovinos	1:400	1: 30,000	1:10,000
Caninos	1:400	1:2,500	1:10,000
Caprinos	1:400	1:10,000	1:10,000
Cérvidos	1:500	1:5,000	1:10,000
Equinos	1:400	1:5,000	1:10,000
Felinos	1:200	1:1,000	1:10,000
Ovinos	1:1,000	1:5,000	1:10,000
Suinos	1:200	1:20,000	1:10,000

La concentración del extracto crudo de *T. gondii*, cepa RH (antígeno) utilizada en todas las especies estudiadas fue de 2 µg /ml.

En seguida, se probaron simultáneamente todos los sueros obtenidos de cada especie con el conjugado específico y con la mezcla PA-PG y se determinó el coeficiente de variación. En todas las especies estudiadas, la correlación fue mayor al 87%, excepto para los sueros de equinos, la cual fue del 77% (Cuadro 15).

Con los resultados obtenidos con los sueros de bovinos, caninos, caprinos, equinos y suinos por ELISA con la mezcla PA-PG (ELISA PA-PG), se realizaron gráficos de distribución de frecuencias para inferir el posible punto de corte, calculando la media de los sueros de baja absorbancia más tres desviaciones estándar. En estas cinco especies se determinó la normalidad de la distribución de

los sueros de baja absorbancia por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $P > 0.05$ ) (Fig. 9).

Cuadro 15. Correlación lineal entre el conjugado específico y la mezcla PA-PG

<b>Especie</b>	<b>n</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Origen</b>	<b>Correlación</b>
Bovinos	45	0.75	0.10	0.92
Caninos	45	0.88	0.19	0.91
Caprinos	44	0.75	0.01	0.99
Cérvidos	45	0.54	0.28	0.89
Equinos	45	0.79	0.28	0.77
Felinos	45	0.54	0.19	0.87
Ovinos	45	1.11	0.33	0.94
Suinos	21	0.59	0.06	0.97

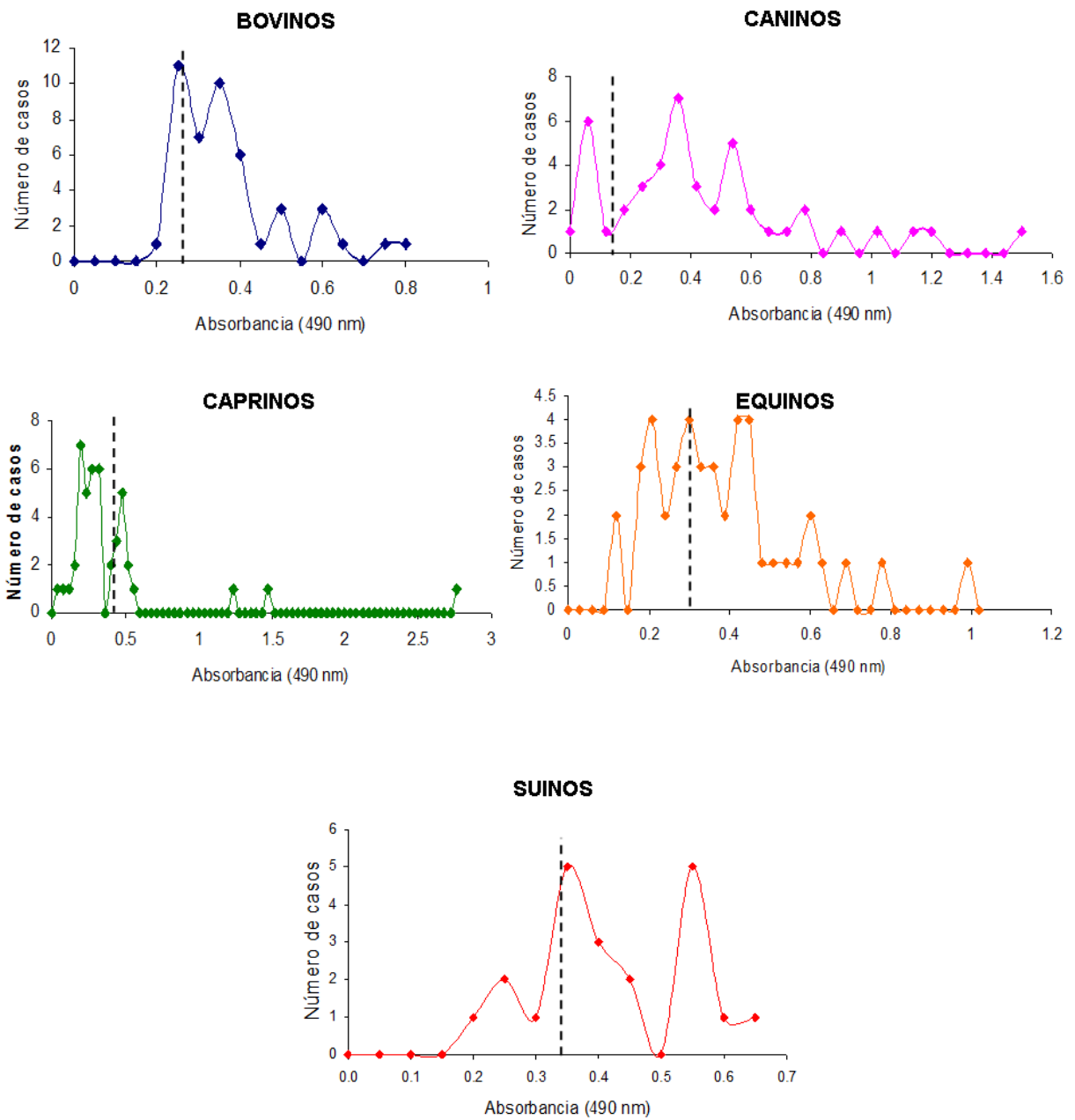


Fig. 9. Distribución de frecuencias para cinco especies domésticas, señalando el posible punto de corte para ELISA PA-PG (línea discontinua)



Debido a que en cérvidos, felinos y ovinos ya se contaban con testigos negativos y positivos confirmados por más de una técnica, los puntos de corte se calcularon a través de curvas ROC y fueron de 0.28 para venados y borregos y de 0.36 o 0.43 para gatos, dependiendo de la sensibilidad y especificidad deseadas (Fig.10, Cuadro 16).

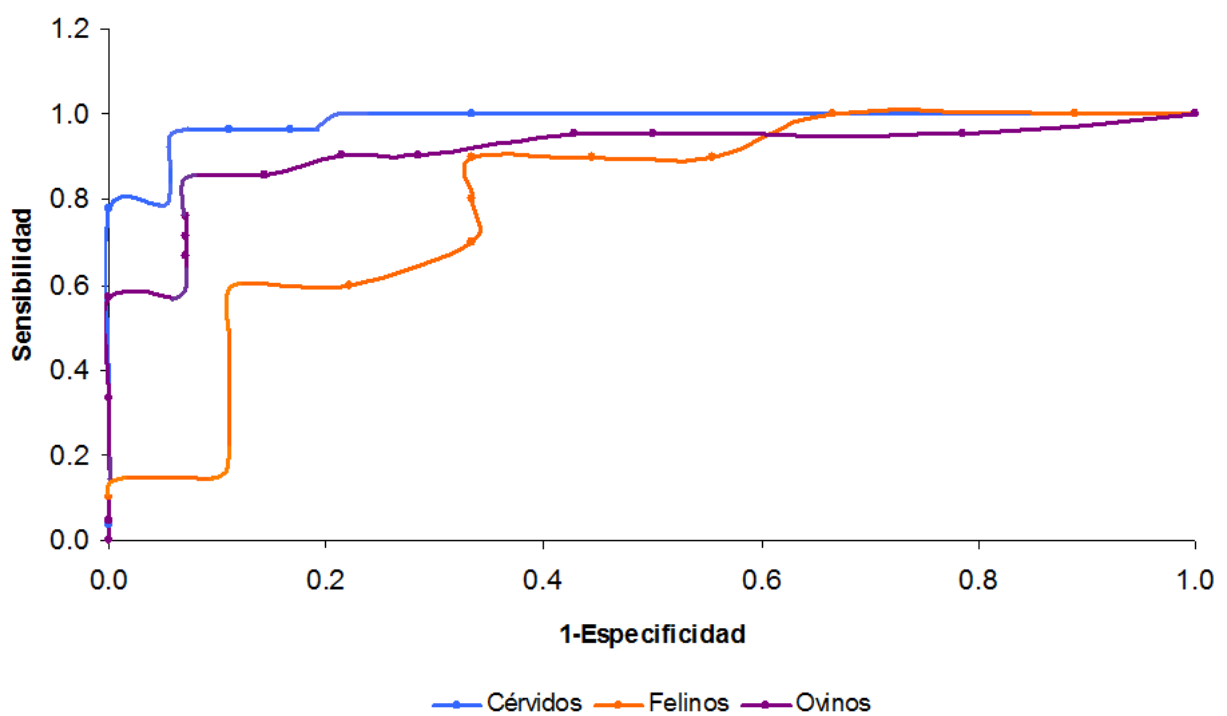


Fig.10. Curvas ROC para obtener el punto de corte en cérvidos, felinos y ovinos con conjugado PA-PG

Cuadro 16. Puntos de corte, sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto con conjugado PA-PG

Especie	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad
	(Ab)	(%)	(%)
Cérvidos	0.28	96	94
Felinos	0.36	67	90
	0.43	89	60
Ovinos	0.28	86	93

### Western blot

Una vez que se obtuvieron sueros negativos y positivos de bovinos, caninos, caprinos, equinos y suinos (Fig. 11), se probaron varios sueros de estas especies para obtener el punto de corte definitivo para cada una de ellas (Fig. 12). Para el caso de caninos, caprinos y equino el punto de corte fue de 0.26, 0.29 y 0.32, respectivamente. Al no encontrar sueros sin reacción en bovinos y suinos, el punto de corte se estimó por debajo de 0.17 y 0.20 respectivamente.

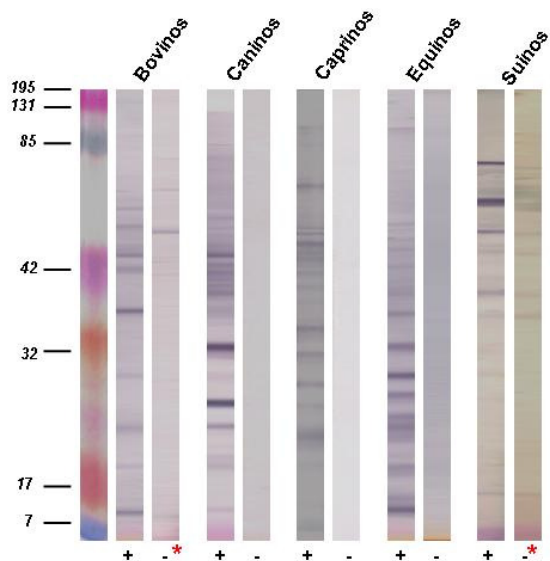


Fig.11. Testigos positivos y negativos de caninos, caprinos y equinos. \* Sueros de bovino y de suino de más baja absorbancia

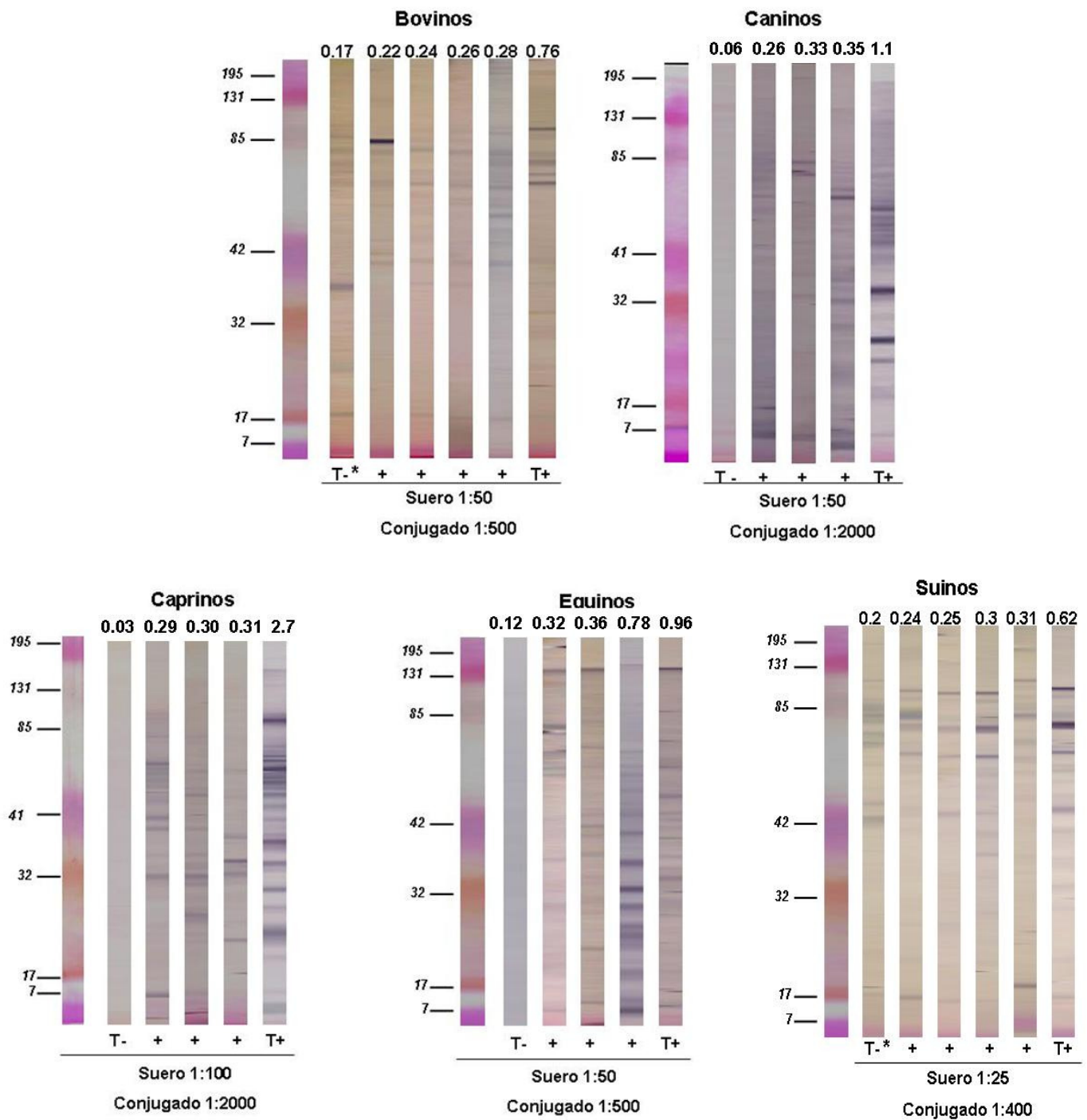


Fig.12. Western blot de cinco especies domésticas. Los valores encima de cada tira son las absorbancias de las mismas muestras en ELISA

Una vez que se tuvieron los resultados del ELISA PA-PG y del western blot, se realizaron los cálculos para la validación del ELISA PA-PG para caninos, caprinos y equinos (cuadro 17).

Cuadro 17. Resultados de validación del ELISA AG

<b>Especies</b>	<b>Caninos</b>	<b>Caprinos</b>	<b>Equinos</b>
Número de muestras	18	22	14
Concordancia observada	0.89	0.59	0.86
Kappa	0.73	0.18	0.69
Sensibilidad (%)	100	27	89
Especificidad (%)	67	91	80
Valor Predictivo Positivo	0.86	0.75	0.89
Valor Predictivo Negativo	1.00	0.56	0.80

No se logró validar el ELISA PA-PG para los bovinos y los suinos, ya que no se encontraron muestras negativas mediante western blot. Los resultados finales de los todos los puntos de puntos de corte, se resumen en el cuadro 18.

Cuadro 18. Resumen de la validación del ELISA PA-PG como conjugado universal para mamíferos domésticos

<b>Especies</b>	<b>Método</b>	<b>Punto de corte (Ab)</b>	<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>
Bovinos	Df + WB	<0.17	—	—
Caninos	Df + WB	0.23	100	67
Caprinos	Df + WB	0.29	27	91
Cérvidos	Curvas ROC	0.28	96	94
Equinos	Df + WB	0.31	89	80
Felinos	Curvas ROC	0.36	67	90
		0.43	89	60
Ovinos	Curvas ROC	0.28	86	93
Suinos	Df + WB	<0.30	—	—

Ab: Absorbancia; Df: Distribución de frecuencias; WB: Western blot

## DISCUSIÓN

Si bien se han realizado estudios sobre la frecuencia de la toxoplasmosis en seres humanos y animales domésticos de México, los métodos de detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en fauna silvestre son limitados. Esto se debe principalmente a que sólo existen comercialmente conjugados específicos para animales domésticos. Prueba de ello es el reporte de Sedlák y Bártová en 2006,<sup>146</sup> quienes utilizaron conjugados de especies domésticas para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* en más de 100 especies de 14 familias de animales silvestres de un zoológico. Por ello, el objetivo de este estudio fue estandarizar y validar un ELISA indirecto para diagnosticar la infección por *T. gondii* en mamíferos domésticos para usarlo posteriormente en mamíferos silvestres en cautiverio, empleando la mezcla de proteína A de *Staphylococcus aureus* con la proteína G de *Streptococcus pyogenes* como conjugado universal.

Algunos estudios previos han demostrado que el ELISA es un método de diagnóstico que tiene mayor sensibilidad y especificidad que otros ensayos serológicos en diversas especies, además de su fácil automatización.<sup>147,148</sup> Estas bondades han sido aprovechadas y utilizadas para el diagnóstico de diferentes infecciones bacterianas, virales y parasitarias. En este estudio, las inmunoglobulinas totales de bovinos, caninos, caprinos, cérvidos, equinos, felinos, ovinos y suinos fueron detectadas con la PA, la PG o la mezcla de ambas como conjugado, lo cual coincide con trabajos previos en los que han utilizado como conjugado secundario para diagnosticar diversas enfermedades en seres humanos y animales como brucelosis, borreliosis, hantaviriosis, neosporosis y

toxoplasmosis, entre otras.<sup>119,122,132,149</sup> Por otra parte, no se logró el reconocimiento de las inmunoglobulinas de ratas con ninguna de las dos proteínas, lo cual ya había sido reportado previamente.<sup>150</sup> Finalmente, tampoco se logró el reconocimiento de las inmunoglobulinas de ratones por ninguna de las proteínas utilizadas como conjugado; este resultado difiere con lo reportado en otros trabajos, donde si encontraron afinidad de los anticuerpos murinos por la PA principalmente.<sup>150</sup> Es posible que las inmunoglobulinas de ratones de la cepa Balb/c tengan alguna característica sutil que impide su reconocimiento bajo las condiciones probadas. Entonces, es probable que modificando algunos pasos del ensayo, como diluciones o tiempos de incubación, se pueda lograr la detección de las inmunoglobulinas de ratones.

En este trabajo se logró estandarizar la prueba en seis de las ocho especies incluidas, pues en bovinos y suinos no fue posible validar la técnica, debido a que de los 45 y 21 animales que se muestrearon respectivamente, no se obtuvieron animales negativos a *T. gondii*. Llama la atención la frecuencia tan alta de anticuerpos anti-*T. gondii* en estas especies, lo cual indica que los animales muestreados estaban expuestos a factores de riesgo conocidos como son la presencia de fauna nociva en los corrales de los cerdos (gatos ferales principalmente) y pastura contaminada con ooquistes suministrada a los bovinos. Además esta documentado en diversas especies que el incremento en la edad de los animales, incluyendo seres humanos, es un factor de riesgo para infectarse con *T. gondii* y todos los individuos muestreados fueron adultos. Cabe mencionar que la mayoría de los sueros seleccionados de los bovinos eran negativos a *Neospora caninum*, parásito estrechamente relacionado con *T. gondii*, con lo cual

se puede descartar una posible reacción cruzada. Por otra parte, se ha reportado que los cerdos junto con borregos y cabras, son especies altamente susceptibles a la infección por *T. gondii*,<sup>5</sup> por lo cual será necesario calcular un tamaño de muestra adecuado para detectar bovinos y suinos seronegativos y validar el ELISA en estas especies.

Hasta el momento, son pocos los trabajos reportados en la literatura que hayan empleado la PA, la PG o la mezcla de ellas como conjugado de un ELISA para detectar anticuerpos anti-*T. gondii*.<sup>138</sup> identificaron aves, primates, carnívoros y herbívoros silvestres de China infectados con este protozooario utilizando la PA como anticuerpo secundario, mientras que Mineo et al., (2001)<sup>149</sup> la emplearon en perros de Brasil. Ambos trabajos demostraron que la PA es útil para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii*. Recientemente Zhang et al., (2010)<sup>148</sup> emplearon con éxito una quimera de PA-PG para detectar la infección por este parásito en cerdos, cabras, perros y gatos mediante un ELISA indirecto, utilizando una proteína recombinante de los micronemas (MIC3) como antígeno. Para validar su técnica, compararon sus resultados con los obtenidos a través de un kit comercial y aglutinación modificada. En este estudio logramos identificar animales seropositivos a *T. gondii*, empleando la mezcla PA-PG como conjugado universal pero utilizando un extracto crudo de la cepa RH de este microorganismo. De las especies incluidas en este proyecto, en cérvidos, felinos y ovinos la prueba fue validada mediante curvas ROC. La sensibilidad y especificidad obtenidas permiten proponer al ELISA PA-PG como una prueba de diagnóstico verdadero en la mayoría de los animales incluidos de estas 3 especies.



La validación de la prueba en las otras tres especies (canina, caprina y equina) se realizó mediante western blot, el cual ha sido empleado con éxito para buscar respuesta inmune en individuos infectados natural o experimentalmente.<sup>151,152</sup> La técnica utilizada en este trabajo fue adaptada a partir de western blots previamente estandarizados por nuestro grupo de trabajo en seres humanos, borregos y venados.<sup>46,50,52</sup> Previamente, Mineo et al. (2001)<sup>149</sup> identificaron sueros de caninos seropositivos a *T. gondii* mediante, empleando la PA como anticuerpo secundario.

Aunque la técnica se logró estandarizar en las tres especies mencionadas, la sensibilidad lograda con los caprinos fue baja (0.27), es decir, la prueba logra detectar individuos positivos que tienen la enfermedad, pero con una alta cantidad de casos donde la prueba resulta negativa cuando el individuo está infectado. Es probable que la sensibilidad del ensayo en esta especie se pueda incrementar si se prueban concentraciones del antígeno diferentes a la empleada (2 µg/ml), además de reconsiderar las diluciones del suero y del conjugado. Probablemente la sensibilidad podría ser incrementada en cuanto se logren capturar un mayor número de muestras negativas y se re-evalúe la prueba.

Realizando una búsqueda bibliográfica en bases de datos como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y Ebsco (<http://www.ebsco.com>) no se encontraron trabajos que validen un ELISA (que emplee la mezcla PA-PG como conjugado universal) con western blot. En este estudio se observaron patrones heterogéneos de reconocimiento antigénico de *T. gondii* por las inmunoglobulinas de los animales probados, desde 20 y hasta 130 kDa, tanto intra como inter

especie, lo cual puede indicar variabilidad en la respuesta inmune del huésped (atribuible al tipo de alimentación, a la presencia de alguna enfermedad inmunosupresora o si cursa con una infección aguda o crónica) o que los animales han sido infectados con diferentes genotipos del parásito.

## **CONCLUSIONES**

Se logró estandarizar un ELISA indirecto para diagnóstico de infección por *T. gondii* en mamíferos domésticos (caninos, caprinos, cérvidos, equinos, felinos y ovinos) con el uso de un conjugado universal, constituido por una mezcla de proteína A de *Staphylococcus aureus* con proteína G *Streptococcus pyogenes* a una dilución única (1:10,000) y su validación con western blot. Estos resultados son la base para comenzar a trabajar con mamíferos silvestres en cautiverio.

## **PERSPECTIVAS**

Se re-estandarizará el inmunoensayo para bovinos y suinos. Además esta técnica se usará en mamíferos silvestres en cautiverio para calcular la prevalencia de la infección por *T. gondii*.

## APÉNDICE

### 1. Solución Amortiguadora de carbonatos, 15 mM, pH 9.6

- 1.59 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) más 1.26 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ).
- 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 10 mM, NaCl 0.15M, pH 7.2 (PBS)

- Medir 800 ml de agua bidestilada
- Agregar 100 ml de PB 10 x y 8.75 g de NaCl
- Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2
- Aforar a 1000 ml con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

### 3. PB10x

- 2.62g de Fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) + 11.5 g de Fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- Disolver en 200 ml de agua bidestilada
- Aforar a 1000 ml con agua bidestilada

### 4. Amortiguador de lavado (PBS-Tween 20, 0.05%)

- En 1000 ml de PBS pH 7.2 (solución 2)

- Añadir 500 µl de tween 20
- Guardar a 4°C

5. *Solución de bloqueo (leche descremada al 5%)*

- Pesar 5 gr de leche descremada en polvo
- Disolver en 100 ml de PBS-Tween (solución 4)
- Guardar a -20°C

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

- Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina
- Añadir 5 ml de ácido cítrico 0.1M y 5 ml de citrato de sodio 0.1M
- Adicionar 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %

Nota: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso (máximo 30 minutos).

7. *Solución de ácido sulfúrico 1N*

- Tomar 98.08 ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Añadir cuidadosamente a 850 ml de agua destilada y aforar a 1000 ml

8. *Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%*

- Pesar 29.2 g de acrilamida\* (99.9% pureza) más 0.8 g de N´N-bis-metilen-acrilamida.
- Disolver en agua bidestilada y aforar a 100 ml
- Filtrar con papel Whatman 1
- Guardar en frasco color ámbar a 4°C

\*Nota: Manejar con cuidado este reactivo porque es neurotóxico.

*9. Amortiguador del gel separador: Tris-Base 2M, pH 8.8*

- Disolver 18.15 g de Tris-base (Hidroximetil aminometano o Trizma-base 50 ml de agua bidestilada
- Ajustar el pH con HCl 6N hasta un pH de 8.8
- Aforar a 100 ml con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

*10. Lauril sulfato de sodio (duodecil sulfato de sodio) SDS 10%*

- Pesar 10 g de SDS
- Aforar a 100 ml con agua bidestilada

*11. Persulfato de amonio al 10%*

- Pesar 1 g de persulfato de amonio
- Disolver en 10 ml de agua bidestilada

Nota: Se prepara al momento de usarse

*12. Amortiguador de gel concentrador: Tris-HCl 2M pH 6.8*

- Pesar 30 g de Tris-base en 30 ml de agua bidestilada
- Ajustar el pH con HCl 5-10N gota a gota hasta un pH de 6.8
- Aforar a 100 ml con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

*13. Amortiguador tris-glicina (para electroforesis)\**

- Medir 200 ml de Tris-glicina 5X\*
- Aforar a 1000 ml con agua destilada
- Guardar a 4°C

\*Tris-glicina 5X: 15.0 g de Tris-base + 72.0 g de glicina + 5.0 g de SDS en 1000 ml de agua bidestilada.

Nota: Este amortiguador se puede usar 2 o 3 veces en la cámara inferior.

Después de cada uso se filtra con papel Whatman No. 1

#### *14. Amortiguador de muestra*

- Medir 5 ml de SDS 10%
- Añadir 37 mg de EDTA, 5 ml de glicerol, 1.25 ml de Tris-HCl 2M pH 6.8 y unos granitos de azul de bromofenol o tironina
- Aforar a 50 ml con agua bidestilada
- Dividir en fracciones de 1 ml y congelar

#### *15. Amortiguador de transferencia*

- (Tris 0.025M, glicina 0.192M, pH 8.3 metanol 20 % v/v)
- Medir 12.5 ml de Trizma-base 2M y agregar 14.49 g de glicina
- Añadir 200 ml de metanol
- Aforar a 1000 ml con agua bidestilada
- Guardar a 4° C

Nota: No ajustar el pH. El amortiguador oscila entre pH 8.1 y 8.4, dependiendo de la calidad del Tris, la glicina y el metanol. El metanol debe ser de grado analítico, de lo contrario contiene contaminantes metálicos que interfieren con las láminas de los electrodos. Este amortiguador se puede usar 3 veces, después de cada uso se filtra con papel Whatman 1.

## REFERENCIAS

1. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews* 2005; 6(1): 41-61.
2. Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104(2): 364-369.
3. Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell' Istituto Superiore Di Sanita* 2004; 40: 57-63.
4. Hegab SM, Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clinical and Experimental Medicine* 2003; 3: 84-105.
5. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1217-1258.
6. Tender JI, Dubey JP. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2008; 55(6): 467–475.
7. Correa D, Coballase UE, Cañedo SI, Rico TC. Toxoplasmosis. En: Flisser A, Pérez TR, editores. *Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de textos mexicanos. México, DF, 2006: 355-367.*
8. Ferguson DJP. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International Journal for Parasitology* 2004; 34: 347–360.
9. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(2): 267–299.

10. Ferguson DJP. Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii*: Small science, large characters. *International Journal for Parasitology* 2009; 39: 871–875.
11. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *International Journal for Parasitology* 2005; 35(2): 193–206.
12. Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of animals and man*. EUA: CRC Press, Inc, 1988.
13. Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. Survival of nonsporulate *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Veterinary Parasitology* 2002; 103: 309–313.
14. Bésne-Mérida A. Caracterización genética de *T. gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) de distintas regiones de México (tesis de maestría). México DF: UNAM, 2010.
15. Correa D, Caballero-Ortega H, Hernández-Islas JL, Becerra-Torres E, Olmedo-Hernández M, Cañedo-Solares I, et al. Toxoplasmosis. En: Froylán Ibarra Velarde, Yolanda Vera Montenegro y Yazmín Alcalá Canto, editores. *Parasitología Veterinaria, Vol. 1 Protozoarios*. México: Castdel; 2009: 123-130.
16. Krauss H, Weber A. *Zoonoses Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*. 3<sup>nd</sup> ed. Canadá: ASMPres, 2003.
17. Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores



- in the united states: risk assessment to consumers. *Journal of Parasitology* 2005; 91(5): 1082-1093.
18. Powell CC, Brewer M, Lappin MR. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Veterinary Parasitology* 2001; 102 (1-2): 29–33.
  19. Galván-Ramírez ML, Mondragón RF. *Toxoplasmosis humana*. Guadalajara, México: Ediciones Cuellar, 2001: 105-109.
  20. Rico Torres CP. Estandarización y validación a nivel laboratorio de una prueba de PCR para la detección directa de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas (Tesis de licenciatura). DF México: UNAM, 2005.
  21. Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Becerra-Torres E, et al. Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases In: Terrazaz IL, editor. *Immunobiology of congenital toxoplasmosis*. Kerala India: Reserch Signpost, 2007: 199-224.
  22. Fowler ME, Miller RE. *Zoo and wild animal medicine*. 5<sup>nd</sup> edition. Philadelphia, USA: Saunders, 2003.
  23. Del Cordero CM, Rojo VFA, Martínez FAR, Sánchez AMC, Hernández RS, Navarrete LCI, et al. *Parasitología Veterinaria*. España: Mc Graw-Hill, 2002.
  24. Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Veterinary Parasitology* 2002; 106(2): 121–153.
  25. Dubey JP, Pimenta AL, Abbou LCS, Ravasani RR, Mense M. Dermatitis in a dog associated with an unidentified *Toxoplasma gondii*-like parasite. *Veterinary Parasitology* 2003; 116(1): 51–59.

26. Last RD, Suzuki Y, Manning T, Lindsay D, Galipeau L, Whitbread TJ. A case of fatal systemic toxoplasmosis in a cat being treated with cyclosporin A for feline atopy. *Veterinary Dermatology* 2004; 15: 194–198.
27. Anfray P, Bonetti C, Fabbrini F, Magnino S, Manciani F, Abramo F. Feline cutaneous toxoplasmosis: a case report. *Veterinary Dermatology* 2005; 16(2): 131–136.
28. Dubey JP, Mitchell SM, Morrow JK, Rhyan JC, Stewart LM, Granstrom DE, et al. Prevalence of antibodies to *Neospora* and *Toxoplasma gondii* in wild horses from Central Wyoming. *Journal of Parasitology* 2003; 89(4): 716–720.
29. Epiphanio S, Sinhorini IL, Cataño-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. *Journal of Comparative Pathology* 2003; 129(2-3): 196–204.
30. Espinosa-Avilés D, Morales-Martínez del MS. An outbreak of toxoplasmosis in a colony of captive squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Veterinaria México* 2007; 38(3): 365-368.
31. Folwer ME, Miller RE. Zoo and wild animal medicine. Current Therapy 6. Tissue cyst-forming coccidia of marine mammals. Louis, Missouri, USA, 2008: 319-340.
32. Carme B, Ajzenberg D, Demar M, Demar M, Simon S, Dardé ML, et al. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. *Veterinary Parasitology* 2009; 163(1-2): 132-135.

33. Brown M, Lappin MR, Brown JL, Munkhtsog B, Swanson WF. Exploring the ecologic basis for extreme susceptibility of pallas cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *Journal of Wildlife Diseases* 2005; 41(4): 691–700.
34. Arantes TP, Lopes WD, Ferreira RM, Pieroni JS, Pinto VM, Sakamoto CA, Costa AJ. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Experimental Parasitology* 2009; 123(2): 190–194.
35. Bresciani KDS, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizzoto CRM, Kanamura CT, Moraes FR, et al. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. *Parasitology Research* 2009; 104: 1213–1217.
36. Dubey JP. Review Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. *Veterinary Parasitology* 2009; 163: 1–14.
37. Dubey JP, Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years. *Veterinary Parasitology* 2009; 14(2-4): 89-103.
38. Jae-Hoon K, Kyung-II K, Wan-Cheul K, Hyun-Joo S, Young-Hwa J, Bong Kyun P, et al. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. *Journal of Veterinary Science* 2009; 10(2): 147-151.
39. Webb JA, Keller SL, Southorn EP, Armstrong J, Allen DG, Peregrine AS. Cutaneous manifestations of disseminated toxoplasmosis in an immunosuppressed dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2005; 41(3): 198-202.
40. Amir G, Salant H, Resnick IB, Karplus R. Cutaneous toxoplasmosis after bone marrow transplantation with molecular confirmation. *Journal of the American Academy Dermatology* 2008; 59: 781-784.

41. Nordquist BC, Aronson LR. Pyogranulomatous cystitis associated with *Toxoplasma gondii* infection in a cat after renal transplantation. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2008; 232(7): 1010-120.
42. Swinger RL, Schmidt KA, Dubielzig RR. Keratoconjunctivitis associated with *Toxoplasma gondii* in a dog. *Veterinary Ophthalmology* 2009; 12 (1): 56–60.
43. Galván-Ramírez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. *Toxoplasma gondii* antibodies in Mexican blood donors. *Transfusion* 2005; 45: 281-282.
44. Bustos-Bahena ML. Seroprevalencia de infección por *T. gondii* y factores de riesgo asociados en mujeres embarazadas de la ciudad de Jojutla, Morelos (Tesis de maestría). Cuernavaca, Morelos. Universidad Autónoma de Morelos, 2004.
45. Figueroa-Damián R, Cañedo-Solares I, Fernández-Hernández A, Becerra-Torres E, Ortiz-Alegría LB, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in a third level hospital of Perinatology in Mexico (en preparación).
46. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, et al. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72: 142-144.
47. García-Márquez LJ, Gutiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, Palma JM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico. *Journal of Parasitology* 2007; 93(6): 1527–1528.

48. Besné-Mérida A, Figueroa-Castillo JA, Martínez-Maya JJ, Luna-Pastén H, Calderón-Segura E, Correa D. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Veterinary Parasitology* 2008; 157: 310–313.
49. Figueroa-Castillo JA, Duarte-Rosas V, Juárez-Acevedo M, Luna-Pastén H, Correa D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *Journal of Parasitology* 2006; 92: 394–395.
50. Caballero-Ortega H, Palma JM, García-Márquez LJ, Gildo-Cárdenas A, Correa D. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology* 2008; 135 (12): 1385–1389.
51. Caballero-Ortega H, Quiroz-Romero H, Olazara N-Jenkins S, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology* 2008; 135(8): 897–902.
52. Olamendi Portugal ML. Prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) provenientes de tres estados del noreste de México (Tesis de maestría). Morelos, México: Universidad Autónoma de Morelos, 2009.
53. Sharif M, Gholami S, Ziaei H, Daryani A, Laktarashi B, Ziapour SP, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. *The Veterinary Journal* 2007; 174 (2): 422–424.

54. Chandrawathani P, Nurulaini R, Zanin CM, Premaalatha B, Adnan M, Jamnah O, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs, goats, cattle, dogs and cats in peninsular Malaysia. *Tropical Biomedicine* 2008; 25(3): 257–258.
55. Gilot-Fromont E, Aubert D, Belkilani S, Hermitte P, Gibout O, Geers R, et al. Landscape, herd management and within-herd seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in beef cattle herds from Champagne-Ardenne, France. *Veterinary Parasitology* 2009; 161(1-2): 36–40.
56. Schoonman LB, Wilsmore T, Swai ES. Sero-epidemiological investigation of bovine toxoplasmosis in traditional and smallholder cattle production systems of Tanga Region, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production* 2009; 42(4): 579-587.
57. Jittapalapong S, Sangvaranond A, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Khachaeram W, Koizumi S, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. *Veterinary Parasitology* 2005; 127(1): 17–22.
58. Silva MSA, Uzeda RS, Costa KS, Santos SL, Macedo ACC, Abe-Sandes K, et al. Detection of Hammondia heydorni and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009; 162(1-2): 156–159.
59. Carneiro ACAV, Carneiro M, Gouveia AMG, Guimaraes AS, Marques APR, Vilas-Boas LS, Vitor RWA. Seroprevalence and risk factors of caprine toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009; 160(3-4) :225–229.

60. Ramzan M, Akhtar M, Muhammad F, Hussain I, Hiszczyńska-Sawicka E, Haq AU, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Rahim Yar Khan (Punjab) Pakistan. *Tropical Animal Health and Production* 2009; 41(7): 1225–1229.
61. Meireles LR, Galisteo Jr AJ, Pompeu E, Andrade Jr HF. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Tropical Medicine and International Health* 2004; 9(8): 876–881.
62. Langoni H, JR Modolo, Pezarico SB, Silva RC, Castro APB, Da Silva AV, et al. Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, Sao Paulo State, Brazil 2005. *Journal of Venomous Animals and Toxins include Tropical Diseases* 2006; 12(1): 142-148.
63. Sedlak K, Bartova E. The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies in dogs and cats from the Czech Republic. *Veterinary Medicine* 2006; 51(12): 555–558.
64. Dubey JP, Cortés-Vecino JA, Vargas-Duarte JJ, Sundar N, Velmurugan GV, Bandini LM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary Parasitology* 2007; 145(1-2): 45-50.
65. Hosseini M, Azizi HR, Hosseini F, Schares G. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. *Veterinary Parasitology* 2009; 164(2-4): 315-319.

66. Santos TR, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizotto MCR, Benetti AH, Santos RR, et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009; 161(2-4): 324–326.
67. Akca A, Babur C, Arslan MO, Gicik Y, Kara M, Kilic S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. *Veterinary Medicine* 2004; 49(1): 9-13.
68. Jakubek Eva-Britt, Lunde´n A, Uggla A. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp infections in Swedish horses. *Veterinary Parasitology* 2006; 138(3-4): 194–199.
69. Güclü Z, Karaer Z, Babür C, Kilic S. Investigation of *Toxoplasma gondii* antibodies in sport horses bred in Ankara Province. *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 2007; 3(14): 264-267.
70. Dorny P, Speybroeck N, Verstraete S, Baeke M, de Becker A, Berkvens D, Vercruyse J. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *Veterinary Record* 2002; 151(21): 626-629.
71. Dubey JP, Cortés C, Sundar JA, Gomez-Marin N, Polo JE, Zambrano LJ, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary Parasitology* 2006; 141(1-2): 42-47.
72. Sedlak K, Bartova E. Toxoplasmoza zvirat a jeji laboratorni diagnostika v Ceske republice. *Veterinarstvi* 2007; 57: 562–567.



73. Mendes-de-Almeida F, Labarthe N, Guerrero J, Faria MCF, Branco AS, Pereira CD, et al. Follow-up of the Elath conditions o fan urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2007; 147(1-2): 9-15.
74. Hornok S, Edelhofer R, Joachim A, Farkas R, Berta K, Repasi A, Lakatos B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection of cats in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 2008; 56(1): 81-88.
75. Kim HY, Kim YA, Kang S, Lee HS, Rhie HG, Ahn HJ. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats of Gyeonggi-do, Korea. *Korean Journal of Parasitology* 2008; 46(3): 199–201.
76. Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli AC, Leutenegger CM, et al. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology* 2008; 38 (11):1319–1328.
77. Dubey JP, Bhatia CR, Lappin MR, Ferreira LR, Thorn A, Kwok OCH. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Bartonella* spp. antibodies in cats from Pennsylvania. *Journal of Parasitology* 2009; 95(3): 578-580.
78. Millán J, Candela MG, Palomares F, Cubero MJ, Rodríguez A, Barral M, et al. 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *The Veterinary Journal* 2009; 182 (1): 114-124.
79. Samra A, McCrindle N, Penzhorn CME, Cenci-Goga BL. Seroprevalence of toxolasmosis in sheep in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 2007; 78(3):116–120.

80. Mainar-Jaime RC, Barberán M. Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. *Veterinary Parasitology* 2007; 148(2): 122–129.
81. Sanad MM, Al-Ghabban AJ. Serological survey on toxoplasmosis among slaughtered sheep and goats in Tabouk, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 2007; 37(1): 329–340.
82. Fusco G, Rinaldi L, Guarino A, Proroga YTR, Pesce A, Giuseppina DM, Cringoli G. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Veterinary Parasitology* 2007; 149(3-4): 271–274.
83. Sharma S, Sandhu KS, Bal MS, Kumar H, Verma S, Dubey JP. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in sheep, cattle and buffaloes in Punjab, India. *Journal of Parasitology* 2008; 94(5): 1174–1175.
84. Shaapan, RM, El-Nawawi, FA, Tawfik, MAA. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology* 2008; 153: 359–362.
85. Ragozo AMA, Yai LEO, Oliveira LN, Dias RA, Dubey JP, Gennari SM. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from Sao Paulo State Brazil. *Journal of Parasitology* 2008; 94 (6): 1259–1263.
86. Soares HS, Ahid SMM, Bezerra ACDS, Pena HFJ, Dias RA, Gennari SM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoro, Rio Grande do Norte Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009; 160 (3-4): 211–214.

87. Dubey JP, Gamble HR, Hill D, Sreekumar C, Romand S, Thulliez P. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *Journal of Parasitology* 2002; 88 (6): 1234 -1238.
88. Damriyasa IM, Bauer C, Edelhofer R, Failing K, Lind P, Petersen, et al. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Veterinary Parasitology* 2004;126 (3): 271- 286.
89. Venturini MC, Bacigalupe D, Venturini L, Rambeaud M, Basso W, Unzaga JM, Perfumo CJ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and outdoor farm in Argentina. *Veterinary Parasitology* 2004; 124 (3-4): 161–165.
90. Da Silva AV, Boareto H, Isbarecht FB, da Silva RC, Langoni H. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. *Veterinária e Zootecnia* 2008; 15: 263–266.
91. Poljak Z, Dewey CE, Friendship RM, Martin, SW, Christensen J, Ojkic D, et al. Pig and herd level prevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario finisher pigs in 2001, 2003, and 2004. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2008; 72(4): 303–310.
92. Azevedo SS, Pena HFJ, Alves CJ, Guimaraes AAM, Maksimov P, Schares G, et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009; in press.

93. McFadden KW, Wade SE, Dubovi EJ, Gompper ME. A Serological and fecal parasitologic survey of the critically endangered pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). *Journal of Wildlife Diseases* 2005, 41(3): 615–617.
94. García-Marquéz LJ, Guitiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, Palma JM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, México. *Journal of Parasitology* 2007; 93(6): 1527-1528.
95. Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Martínez-García S, et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *Journal of Parasitology* 2009; 95(2): 319–322.
96. Lanverde IO. Exploración por métodos biológicos y serológicos de toxoplasmosis en *Pica caudata* (urraca) (Tesis licenciatura). México: UNAM FMVZ, 1968.
97. Granados JLC. Detección de anticuerpos contra *T. gondii* en cerdos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Tesis de licenciatura). México: UNAM FMVZ, 1975.
98. Aguilar PO. Frecuencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de México (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1977.
99. Juárez JAM. Identificación de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero sanguíneo de bovino por la prueba de inmunofluorescencia en la cuenca lechera de Cuahutitlán Estado de México (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1980.

100. Vargas SV. Encuesta serológica para la detección de anticuerpos contra *T. gondii*, en bovinos y caprinos procedentes del municipio de Silacayoapilla Estado de Oaxaca (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1985.
101. Báez SAD. Frecuencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii*, en heces de felinos del zoológico de San Juan de Aragón de la ciudad de México (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1986.
102. Martínez JJM. Sondeo serológico para la detección de anticuerpos contra toxoplasmosis en perros de la ciudad de México y su importancia en salud pública (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1986.
103. Aparicio DF. Correlación entre títulos serológicos y presencia de ooquistes en heces, en el diagnóstico de toxoplasmosis en gatos (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1987.
104. Luna AA. Detección de anticuerpos séricos de *Toxoplasma gondii* en equinos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1990.
105. Berrón DH. Detección de anticuerpos contra *T. gondii* mediante la prueba de fijación del complemento en una población de felinos silvestres albergada en el zoológico de Chapultepec (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1991.
106. Cordero AT. Diagnostico de la toxoplasmosis por medio de la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina-Peroxidasa) (Tesis de licenciatura). México: UNAM, 1992.
107. Vidal EH. Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero de wallabie de cuello rojo (*Macropus rufogriseus*) mediante la prueba de

- fijación de complemento directa (Tesis de licenciatura). México DF: UNAM, 1996.
108. Sánchez JGP. Seroprevalencia de IgG contra *Toxoplasma gondii* en los felinos salvajes del zoológico de Zacango en el municipio de Calimaya, México durante el periodo de noviembre de 1996 a enero de 1997 (Tesis de licenciatura). Toluca, México: UNAM, 1998.
109. Radilla LEA, Cardenas SL. Serodiagnóstico de *Toxoplasma gondii* en el hombre y su relación con el gato doméstico (*Felis domesticus*) en la ciudad de Acapulco, Guerrero (Tesis de licenciatura). Toluca, México: UAEM, 2001.
110. Pichardo RP. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en grupos expuestos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM (2002) (Tesis de licenciatura México). Toluca, México: UAEM, 2005.
111. Coyote BC, Martínez GP. Presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en mujeres en edad reproductiva derechohabientes de la clínica de especialidades de la mujer (CEM) (Tesis de licenciatura). Toluca, México: UAEM, 2004.
112. Dorantes MCV, Ruiz CS. Prevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en mujeres en edad reproductiva de un grupo de población abierta de la ciudad de Toluca (Tesis de licenciatura). Toluca, México: UAEM, 2005.
113. Besné-Mérida A. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* y su relación con factores de riesgo en gatos de la ciudad de México (Tesis de licenciatura). México DF: UNAM, 2006.

114. Cedillo PC. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México (Tesis de maestría). México DF: UNAM, 2009.
115. Da Silva CR, Lagoni H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitology Research* 2009; 105: 893-898.
116. Tizard IR. *Veterinary Immunology an Introduction*. 7<sup>nd</sup> ed. EUA: Saunders Elsevier, 2004: 145-153.
117. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 6<sup>nd</sup> ed. USA: Saunders Company, 2007.
118. Medina E, Mata O, Carpio JC, Zabala A, Ruiz A. En: Correa D, Mandujano A, Medina Y, editores. *Manual de técnicas modernas en inmunología teoría y practica*. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA, México, 2000: 15-20.
119. Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Vigliocco A, et al. Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric Protein A- Protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animals species. *Veterinary Microbiology* 2004; 101: 123-129.
120. Fischett VA. *Gram-positive Pathogens*. Washington DC, EUA: ASM Press, 2000: 351-361.
121. Eliasson M, Olsson A, Palmcrantz E, Wiberg K, Inganäs M, Guss B, et al. Chimeric IgG-binding receptors engineered from Staphylococcal Protein A and Steptococcal Protein G. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263 (9): 4323-4327.
122. Deruaz D, Eid P, Deruaz J, Sempére A, Bourgounin C, Rodhain F, et al. Use of enzyme-labelled proteína G assay for the detection of anti *Borrelia*

- burgdorferi* antibodies in wild animal sera. European Journal of Epidemiology 1996; 12: 515-519.
123. Pawelczyk A, Sinski E. prevalence of IgG antibodies response to *Borrelia Burgdorferi* SL in populations of wild rodents from Mazury lakes district region of Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2000; 7: 79-83.
124. Bhide MR, Curlik J, Travnicek M, Lazar P. Protein A/G dependent ELISA a promising diagnostic tool in Lyme disease seroprevalence in game animals and hunting dogs. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2004; 27: 191–199.
125. Saegerman C, De Waele L, Gilson D, Godfroid J, Thiange P, Michel P, et al. Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Microbiology 2004; 100: 91-105.
126. Nielsen K, Smith P, Yu WL, Elmgren C, Nicoletti P, Perez B, et al. Second generation competitive enzyme immunoassay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. Veterinary Microbiology 2007; 124: 173-177.
127. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. Journal of Medical Microbiology 2002; 51: 656–660.
128. Ferreira AC, Cardoso R, Travassos ID, Mariano I, Belo A, Rola IP, et al. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme-Linked



- Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Veterinary Research* 2003; 34: 297-305.
129. Tryland M, Kleivane L, Alfredsson A, Kjeld M, Arson A, Stuen S, et al. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. *Veterinary Record* 1999; 144: 588-592.
130. Hernández-Mora G, Manire CA, González-Barrientos R, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C, Staggs L, et al. Serological diagnosis of *Brucella* infections in Odontocetes. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16 (6): 906-915.
131. Tryland M, Derocher AE, Wiig O, Godfroid J. *Brucella sp.* Antibodies in polar bears from Svalbard and the Barents sea. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37(3): 523–531.
132. Lee BH, Yoshimatsu K, Araki K, Ogino M, Okumura M, Tsuchiya K, et al. Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species. *Archives of Virology* 2003; 148: 1885-1897.
133. Aurtenetxe O, Vicente J, de la Fuente J, Gortázar C, Juste RA. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against *Mycobacterium bovis* in European wild boar. *BMC Veterinary Research* 2008; 1(4): 43-51.
134. Silva DAO, Vitaliano SN, Mineo TWP, Ferreira RA, Bevilacqua E, Mineo JR. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in manes wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *Journal of Parasitology* 2005; 91(5): 1212–1216.

135. Fujii K, Kakumoto C, Kobayashi M, Saito S, Kariya T, Watanabe Y, et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* of *Neospora caninum* in seals around Hokkaido Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2007; 69(4): 393-398.
136. Villari S, Vesco G, Petersen E, Crispo A, Buffolano W. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Veterinary Parasitology* 2009; 161:1-8.
137. Zhang SY, Wei MX, Zhou ZY, Yu JY, Shi XQ. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sera of rare wild in the Shanghai Zoological Garden, People's Republic of China. *Parasitology International* 2000; 49: 171-174.
138. Rivera E, Jackert-Jernberger M, Mejerland T, Karlsson. Evaluation of protein A and G as indicator system in an ELISA for detecting antibodies in mink to *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinary Microbiology* 1994; 42: 265-271.
139. Bellmont-Montoya S. Validación de pruebas diagnósticas. *Angiología* 2007; 56 (6): 433-438.
140. Fescina R, Simini F, Belitsky R. Difusión: Evaluación de los procedimientos diagnósticos, aspectos metodológicos. *Sal Perinat* 1985; 2: 39-44.
141. Sales-Carmona VF. Evaluación de una prueba de diagnóstico. *Compenio de Investigación Clínica Latinoamericana* 1993; 13.
142. Conraths FJ, Schares G. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Veterinary Parasitology* 2006; 136: 91–98.

143. Correa D, Ortiz-Alegría LB. Desarrollo y evaluación de pruebas diagnósticas. Memorias del curso de inmunología y biología molecular de parásitos; 2004. México DF. Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM 2004.
144. Ortiz Alegría LB. Validación de técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas (Tesis de licenciatura). México DF: UNAM 2004.
145. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bulletin of the World Health Organization 1976; 53(1): 55-65.
146. Sedlák K, Bártova E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. Veterinary Parasitology 2006; 136: 223-231.
147. Sawadogo P, Hafid J, Bellete B, Sung RT, Chakdi M, Flori P, et al. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marakech, Morocco. Veterinary Parasitology 2005; 130: 89-92.
148. Zhang D, Wang Z, Fang R, Nie H, Feng H, Zhou Y et al. Use of proteína AG in ELISA for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in four species of animals. Clinic Vaccine Immunology 2010; 17 (3): 485-486.
149. Mineo TWP, Silva DAO, Costa GHN, Ancken von ACB, Kasper LH, Souza MA et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. Veterinary Parasitology 2001; 98: 239-245.

150. Sikkema WD. An Fc- binding protein. American Biotechnology Laboratory 1989; 7: 22–23.
151. Wastling JM, Harkins D, Buxton D. Western blot analysis of the IgG response of sheep vaccinated with S48 *Toxoplasma gondii* (Toxovac). Research in Veterinary Science 1994; 57 (3): 384-386.
152. Harkins D, Clements DN, Marley S, Mark S, Wright S, Esteban I et al. Western blot analysis of the IgG responses of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*. Journal of Comparative Pathology 1998; 119 (1): 45-55.

