



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

LA SALIVA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA LA INFECCIÓN CONGÉNITA O ADQUIRIDA POR *TOXOPLASMA GONDII*

ENSAYO CRÍTICO
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CLÍNICAS

PRESENTA:
CLAUDIA ASTRID MACEDO ROMERO

TUTORAS:
DRA. TERESA FORTOUL VAN DER GOES
DRA. SOCORRO AIDA BORGES YÁÑEZ
División de estudios de Posgrado

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. octubre 2020



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.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. DESARROLLO.....	4
Toxoplasmosis	4
<i>Características biológicas</i>	5
<i>Ciclo de vida</i>	6
<i>Transmisión</i>	7
<i>Epidemiología</i>	8
<i>Manifestaciones Clínicas</i>	9
Papel inmunológico que protege contra <i>T. gondii</i>	12
▪ <i>Respuesta en individuos adultos inmunocompetentes</i>	12
▪ <i>Respuesta inmune en el embarazo</i>	17
Diagnóstico	20
Métodos de Diagnóstico	25
<i>Métodos directos:</i>	26
<i>Métodos indirectos:</i>	27
Determinación de anticuerpos específicos vs <i>T. gondii</i> en la infección adquirida 30	
<i>Anticuerpos específicos IgM</i>	30
<i>Anticuerpos específicos IgA</i>	30
<i>Anticuerpos específicos IgG y subclases</i>	30
<i>Anticuerpos específicos IgE</i>	31
Respuesta inmune en mucosas	32
<i>Inmunoglobulinas en las mucosas</i>	33
La saliva como fluido diagnóstico	37
<i>Propiedades de la saliva y las glándulas salivales</i>	37
<i>Saliva versus sangre</i>	39
<i>Toxoplasmosis y saliva</i>	41
Determinación de anticuerpos específicos anti-Toxoplasma gondii en muestras de saliva y suero	42
III. CONCLUSIÓN	47
ANEXO 1	49
ANEXO 2	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

I. INTRODUCCIÓN

La Toxoplasmosis es una infección parasitaria ampliamente extendida a nivel mundial. Esta enfermedad tiene una gravedad y espectro de manifestaciones clínicas diferentes en función del estado inmunitario del paciente infectado. La infección aguda en el paciente inmunocompetente es generalmente, asintomática y autolimitada. En el paciente inmunocomprometido las manifestaciones clínicas se relacionan con la reactivación de una infección latente, produciendo cuadros graves, especialmente por la afectación del sistema nervioso central (SNC). En la mujer gestante la posible transmisión al feto condiciona una actitud diagnóstica y un tratamiento especiales. Teniendo una presentación clínica, así como un grado de transmisibilidad diferente, en función del periodo de la gestación en la que se produce.

Se sabe que solo el diagnóstico y tratamiento en la fase aguda de la Toxoplasmosis se puede disminuir la transmisión y la gravedad de las manifestaciones clínicas. El diagnóstico se realiza mediante la demostración de anticuerpos específicos en suero pero es limitado, pues no existe información clara acerca de las clases (IgA) y subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentes en la serología y su relación con las manifestaciones clínicas de estos pacientes. Por la relación que tienen el suero y la saliva, es de gran interés el estudio del empleo de esta última, ya que podría ser una alternativa para llevar a cabo el diagnóstico, y monitoreo en la evolución de dicha patología, proporcionando una vía prometedora por la accesibilidad en su obtención, su no invasividad, de bajo riesgo y fácil aceptación.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como propósito analizar la viabilidad del empleo de la saliva como método diagnóstico para la infección congénita o adquirida por *Toxoplasma gondii* por medio de la determinación y la correlación que exista entre la presencia de los anticuerpos específicos en serología y saliva para el diagnóstico de esta enfermedad.

II. DESARROLLO

Toxoplasmosis

La Toxoplasmosis es una infección parasitaria causada por el parásito *Toxoplasma gondii*, es una de las infecciones más comunes en todo el mundo, produce una de las zoonosis más ampliamente distribuidas en el mundo¹; afecta a una tercera parte de los seres humanos, es menos frecuente en las zonas frías y altas que en las zonas templadas, húmedas y bajas.² En México se ha documentado una tasa del 40 al 62%.³

La infección por este parásito, podría ocasionar un grado de daño y un espectro de manifestaciones clínicas diferentes en función del estado inmunitario del individuo infectado. La infección aguda en el paciente inmunocompetente es generalmente, asintomática y autolimitada. En cambio en el paciente inmunocomprometido, las manifestaciones clínicas se relacionan con cuadros graves, especialmente por la afectación del sistema nervioso central (SNC).⁴ En la mujer gestante existe la posibilidad de transmisión al feto, el riesgo de transmisión y grado de daño al feto están en función del periodo de la gestación en la que se produce la infección fetal.⁵ En los bebés infectados por *Toxoplasma gondii* se pueden presentar desde problemas obstétricos, hasta cuadros clínicos graves y secuelas incapacitantes a largo plazo.⁶ Las pruebas de laboratorio aplicadas e interpretadas en forma adecuada pueden ser de gran utilidad en los diferentes escenarios de esta enfermedad.⁷

Toxoplasma gondii

El nombre **Toxoplasma** procede de la palabra griega *toxon* que significa arco, que es la forma que presenta este parásito (Figura 1), el cual fue aislado por primera vez en un roedor *Ctenodactylus gundi* en el norte de África en 1908.⁸ La primera descripción de toxoplasmosis en humanos fue en 1923.⁹

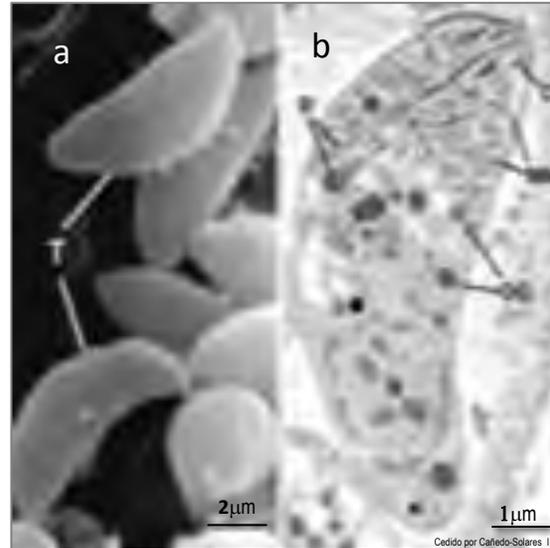


Figura 1. Forma microscópica de *Toxoplasma gondii*: a) etapa de tachizoíto por microscopía de barrido, forma de replicación rápida que solo se puede encontrar cuando el individuo está en la fase aguda o de una reactivación de la enfermedad; b) Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de un tachizoíto

Características biológicas

Toxoplasma gondii es un coccidio tisular de distribución cosmopolita, intracelular obligado, del *Phylum Apicomplexa*. Se estima que infecta de manera crónica aproximadamente de 20 a 50% de la población mundial, así como a un gran número de aves y mamíferos, tanto terrestres como acuáticos, siendo los felinos los hospederos definitivos.¹⁰ Este parásito invade el citoplasma de todas las células nucleadas y se multiplica de forma asexual como tachizoíto, infecta varios tejidos, incluyendo el músculo esquelético, el intestino y el sistema nervioso.

Ciclo de vida

Dependiendo de la etapa del ciclo celular, *Toxoplasma* presenta las siguientes formas parasitarias:

1. Ooquiste. Forma de resistencia en medio exterior, esporula en el ambiente.
2. Esporozoíto. Se encuentran dentro de los ooquistes.
3. Quiste tisular. Forma de resistencia interior.
4. Bradizoíto. Formas de replicación lenta.
5. Taquizoítos. Están relacionados con la fase proliferativa, propios de la fase aguda de la enfermedad, responsables del daño tisular en el organismo (Figura 1).

El parásito tiene ciclo de reproducción sexual y asexual. La fase sexual se lleva a cabo en el huésped definitivo que comprende a todos los felinos, incluido el gato doméstico¹¹, y la fase asexual que ocurre en el huésped intermediario, siendo los animales de sangre caliente (incluido el humano). El ciclo de replicación sexual inicia cuando algún felino ingiere una presa infectada con quistes tisulares (forma infectiva que contiene al bradizoíto). Una vez que pasan al intestino, por acción de las enzimas digestivas, se liberan las formas infectivas del parásito e invaden a los enterocitos del intestino del felino,^{2 12 13} es aquí donde se lleva a cabo un proceso de desarrollo y diferenciación celular, conocido como gametogonia, proceso sexual de reproducción celular que conduce a la formación de ooquistes.⁸ El ooquiste es liberado en forma no esporulada a través de las heces de los felinos y expuesto al medio ambiente, en donde bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad, esporula en 2-3 días produciendo en su interior 8 esporozoítos; el ooquiste así maduro se convierte en la forma infecciosa del parásito.² Millones de ooquistes son producidos y liberados por los felinos a través de las heces fecales, contaminando suelo, hortalizas y fuentes de agua. El ciclo de replicación asexual se desarrolla en los huéspedes intermediarios, los cuales pueden infectarse mediante el consumo de ooquistes esporulados o de quistes tisulares presentes en los tejidos de otros huéspedes intermediarios,^{4 5 14}

como se observa en la Figura 2. En el caso del hombre, la infección puede ser por la ingestión directa de quistes tisulares de carne mal cocida o agua contaminada por ooquistes de *Toxoplasma*. Una vez ingerido el quiste tisular u ooquiste, se liberan los bradizoítos y los esporozoítos respectivamente, los cuales rápidamente se diferencian en taquizoítos, la forma móvil, altamente dinámica e invasiva que atraviesa eficientemente el epitelio intestinal, diseminándose a través de todo el organismo.¹⁵

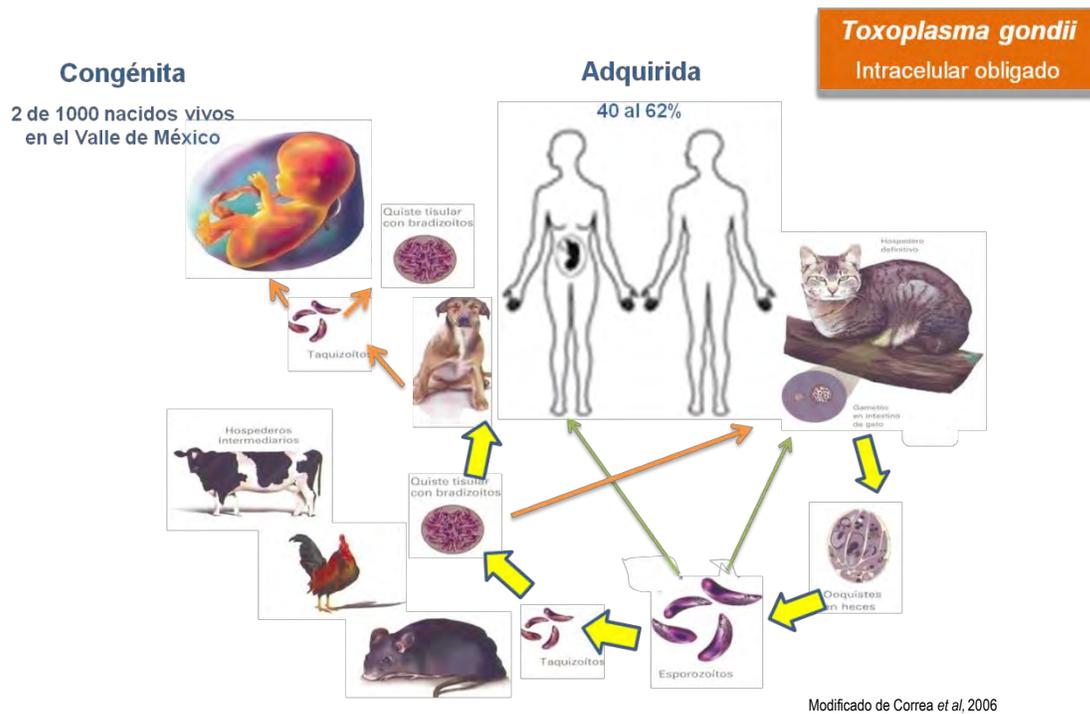


Figura 2. Ciclo de vida del *Toxoplasma gondii*. El felino desecha el ooquiste no esporulado, el cual es esporulado en el ambiente, si es ingerido invade el epitelio intestinal, dando origen a la infección adquirida e inicia la reproducción sexual en felinos y asexual en otros mamíferos y aves, durante la fase aguda puede ocurrir la transmisión vertical, dando como resultado la toxoplasmosis congénita. Cuando se establece la infección crónica se forman los quistes tisulares que conviven con el hospedero de por vida.

Transmisión

La transmisión oral

La principal vía de transmisión de esta parasitosis es la vía oral, ya sea por ingestión de carnes crudas o semicocidas portadoras de quistes tisulares, o por la ingestión de ooquistes en el agua o en los alimentos contaminados con las heces

de gatos.¹⁶ Se ha observado una relación entre la presencia de gatos en el ambiente cercano y la seroprevalencia de anticuerpos específicos de *Toxoplasma*, siendo por lo menos dos veces mayor entre personas con gatos en sus casas, que en aquellos que no los tienen.^{4 10 17} Existe otra forma de transmisión directa en casos de transfusión sanguínea o trasplante de órganos.⁶ Una vez ingeridos los ooquistes o los quistes tisulares, se liberan los taquizoítos, que se diseminan a través de todo el cuerpo en la infección aguda.

A través del trasplante de órganos en un individuo inmunocomprometido, los quistes pueden reactivarse, y provocar la encefalitis toxoplásmica e incluso la muerte.¹⁸

La transplacentaria mejor conocida como toxoplasmosis congénita:

En el caso de una mujer embarazada, que se infecta por primera vez durante su embarazo o en momentos cercanos al mismo, puede transmitir la infección al feto, debido a que el parásito circula en sangre cíclicamente durante el periodo inicial de la infección, provocando así, la toxoplasmosis congénita.^{15 19}

Epidemiología

La toxoplasmosis es una infección cosmopolita, siendo una zoonosis de relevancia, con prevalencias de infección que alcanzan hasta un 80-90% en algunos países como Francia, Brasil, Colombia, aun así puede variar entre las diferentes comunidades de la misma región. La toxoplasmosis humana está difundida por todo el mundo y aproximadamente del 40 al 50% de los adultos sanos, entre 30 y 40 años de edad, presentan una seroconversión toxoplásmica.¹

Se ha estimado que más de un tercio de la población mundial se ha expuesto a este parásito.² En 1992, se evaluó la tasa de prevalencia a partir de 29,279 muestras de sangre provenientes de los 32 estados de la República Mexicana, y se encontró una prevalencia mayor en zonas costeras (40-65%), preferentemente,

en las personas con bajo nivel socioeconómico, así como en mujeres en edad reproductiva.²⁰

En un estudio basado en las encuestas Nacionales de Salud, entre los años 2000 al 2006, se analizó la prevalencia de *Toxoplasma gondii*. Con base en los resultados, se determinó su distribución, dividiendo a la República Mexicana en tres grandes zonas (norte, sur y costa) siendo notoria una mayor prevalencia en las costas que en las zonas céntricas del país.³ En México, la infección adquirida postnatalmente se ha documentado con una tasa de 40 a 62%, incluyendo a las mujeres embarazadas.¹⁹

La infección aguda de la madre no necesariamente culmina en infección fetal. La estimación global de la transmisión materno-fetal es del 20-33% aproximadamente en madres recién infectadas.^{21 22} El riesgo de infección congénita es menor cuando la infección materna se da durante el primer trimestre (10 a 15%) y mayor, cuando la infección ocurre durante el tercer trimestre (60-90%).²³ Se han documentado dos casos por cada 1000 recién nacidos a nivel nacional.³ Se estima que nacen dos millones de niños por año y, de éstos, aproximadamente 4000 podrían estar infectados congénitamente, pero sin ser detectados al nacimiento.^{1 3 4 6}

Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas de un individuo con infección por toxoplasma dependerán de diversos factores:

De la **carga parasitaria** que se encuentre en los tejidos, pues éstos ocasionan muerte celular y necrosis tisular. Así como de la **infectividad del estadio de *T. gondii***, de ello depende la capacidad de replicación e invasión tisular.²⁴ Por otro lado, del **papel del hospedero** dependerá su capacidad inmunológica y otros aspectos de su salud general.

Toxoplasmosis adquirida: Infección aguda por *T. gondii*, es habitualmente una enfermedad benigna en los individuos inmunocompetentes, es asintomática y autolimitada. Solamente entre 10-20% de ellos, podrán presentar linfadenopatía cervical, cefalea, malestar general, fatiga, fiebre moderada, dolor de garganta y mialgias.²⁵

En pacientes inmunocomprometidos se producen las formas diseminadas graves donde el cuadro clínico se compone por fiebre elevada, erupciones cutáneas, astenia, cefalea, náuseas, manifestaciones hepáticas, cerebrales, miocárdicas y pulmonares, debido a diversas causas o a terapia inmunosupresora.¹

T. gondii es un importante patógeno oportunista. A nivel mundial, causa encefalitis severa en más del 40% de los enfermos con VIH, a tal grado que el 10-30% fallece por esta enfermedad.^{4 26 27}

El diagnóstico temprano es de vital importancia en mujeres embarazadas a causa del riesgo de infección del feto.²⁸

Toxoplasmosis congénita:

En este tipo de infección, la capacidad del embrión o del feto en desarrollo de responder a un agente infeccioso, dependerá del momento en el que se transmitió la infección de la madre al feto.²⁹ Dependiendo del trimestre de gestación en el que ocurra la transmisión es el daño al feto o embrión como se observa en la Figura 3.^{30 31} Los estudios existentes sugieren que la presentación y gravedad de signos clínicos en el producto dependen mayormente del grado de maduración de la respuesta inmune cuando se presenta la infección. Lo anterior significa que la respuesta inmune que protege a los individuos inmunocompetentes, es la misma que protege al feto en formación, aunque éste presenta una inmadurez de su sistema inmune.³² El espectro clínico de la infección congénita, abarca alteraciones que se presentan desde la formación fetal al nacimiento

(calcificaciones intracraneanas, microcefalia, macrocefalia, retardo psicomotor, hidrocefalia, afecciones oculares, malformaciones cardiacas, pulmonares, renales, hepáticas o esplénicas), a una infección subclínica, con el riesgo de desarrollar corioretinitis como signo específico de la toxoplasmosis congénita,³³ discapacidad visual, e incluso pudiera desarrollarse ceguera sin datos clínicos iniciales en el 80% de los casos.³¹ La infección congénita por lo general conduce a la enfermedad más grave cuando ocurre durante el primer trimestre de gestación, cerca del 90% de los embriones infectados por *T. gondii* en las primeras semanas de la gestación son abortados³⁴; si la infección ocurre a la mitad del embarazo, los bebés pueden nacer con problemas graves como malformaciones o alteraciones en el SNC^{31 35}. Mientras que 80% de los que se infectan en el tercer trimestre del embarazo, generalmente, nacen asintomáticos, pasando desapercibidos, no obstante, pueden desarrollar secuelas irreversibles en el sistema nervioso central o en el ojo, dichas secuelas pueden manifestarse en días, semanas o años posteriores al nacimiento.³¹ Figura 3

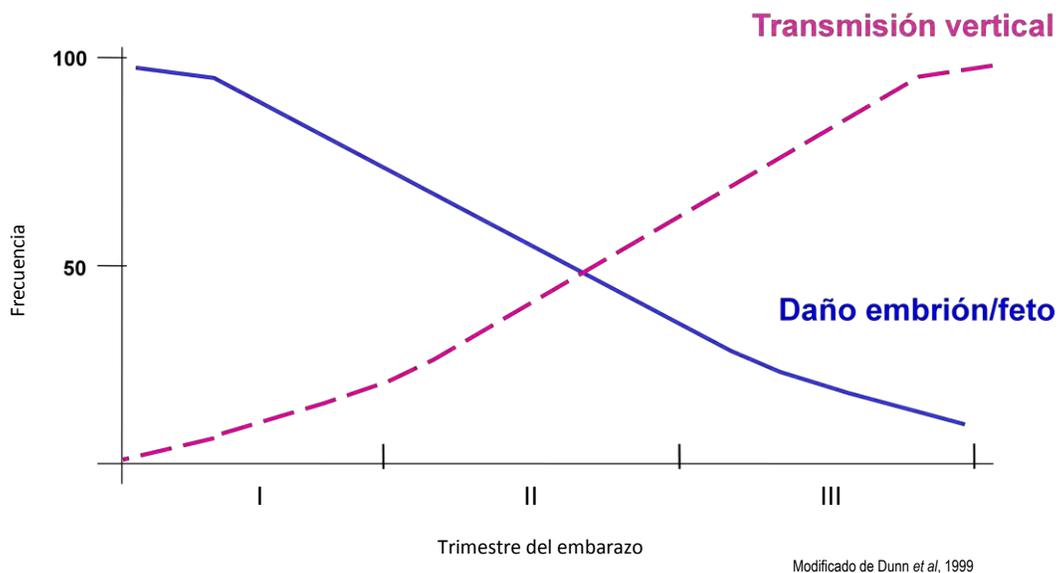


Figura 3. Diagrama que muestra la relación entre la tasa de transmisión vertical de *T. gondii* y el daño al embrión o feto, en relación con el periodo de gestación. En los seres humanos se ha observado una relación inversa entre el tiempo en el que se infectan (embrión o feto) y la frecuencia con que nacen con daño. La transmisión vertical tiene un patrón opuesto, siendo más frecuente al final del embarazo que al principio de éste.

Si la primoinfección es adquirida entre los 4 a 6 meses previos o antes de la concepción, la inmunidad protectora puede prevenir la transmisión vertical al feto y a exposiciones subsecuentes⁶, excepto en los casos en los que existe co-infección con VIH, ya que estarán en riesgo de reactivación de la infección y la posible transmisión del parásito al feto.¹⁸

Es por esta razón la importancia del diagnóstico de la fase aguda, para proporcionar el tratamiento adecuado, y prevenir la transmisión y la gravedad de las manifestaciones clínicas.^{17 36} Esto revela que existe la necesidad de herramientas diagnósticas altamente sensibles, para detectar la presencia de esta infección y con ello evitar daños mayores.^{17 19}

La muerte ocasionada por esta enfermedad puede ocurrir en días posteriores al parto, si no es tratada oportunamente.¹⁰

Papel inmunológico que protege contra *T. gondii*

▪ Respuesta en individuos adultos inmunocompetentes

Tras la infección, un individuo inmunocompetente del hospedero (organismo infectado) produce respuestas inmunológicas protectoras, lo que hace que la infección crónica confiera resistencia a la reinfección.^{37 38 39}

▪ Respuesta inmune innata en infección adquirida

En la infección adquirida, que es aquella infección que se adquiere postnatalmente (incluyendo a las mujeres embarazadas), cuando algún patógeno (*Toxoplasma gondii*) es reconocido por el sistema inmunológico, provocando como primera respuesta a la inmunidad innata, como se observa en la Figura 4.

El tracto gastrointestinal es la puerta de entrada natural de *T. gondii* al organismo, de manera que las células linfoides asociadas al tejido intestinal constituyen la

primera línea de defensa contra este agente patógeno. En la toxoplasmosis aguda experimental, se observa aumento en el número de células en las placas de Peyer y en los ganglios linfáticos mesentéricos, lo cual refuerza el postulado sobre la participación del sistema inmune asociado a la mucosa digestiva (MALT), específicamente en el control inicial de la replicación parasitaria.⁴⁰

En el período en el cual aún no se ha establecido la inmunidad adaptativa, la activación de la respuesta inmune innata es fundamental para limitar la replicación de los taquizoítos; ésta es mediada por macrófagos que realizan la fagocitosis, neutrófilos y células NK, las que mediante la citotoxicidad celular y su interacción inicial con los parásitos, es determinante en el direccionamiento hacia un patrón de citocinas tipo uno (Th1), caracterizado por altos niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12.⁴¹ El IFN- γ es una citocina central para la protección contra *T. gondii*. En experimentos realizados con anticuerpos neutralizantes anti-IFN- γ o con ratones carentes del gen que codifica a éste, se observa que la muerte sobreviene durante la fase aguda de la infección, mientras que, en ratones con inmunodeficiencia combinada severa, carentes de linfocitos T y B, pero que producen IFN- γ a partir de células NK, se observa una sobrevida mayor.⁴² Por lo tanto, es innegable la función esencial de las citocinas proinflamatorias para la resolución de la toxoplasmosis; sin embargo, su producción excesiva es perjudicial para el hospedero, por lo que se requiere la secreción de citocinas reguladoras, provenientes de los propios macrófagos como son la IL-10 y el factor transformante de crecimiento β (TGF- β). Los linfocitos con patrón de citocinas Th2 también contribuyen a la modulación de la respuesta inmune celular al *T. gondii* mediante la síntesis de IL-10 e IL-4.^{43 44} La IL-10 es una citocina fundamental en el control de la respuesta inmune celular y en la transición hacia el estadio latente de la toxoplasmosis, puesto que inhibe la síntesis de IL-12 derivada de macrófagos y la producción de IFN- γ de las células NK.⁴⁵

▪ Respuesta inmune celular en infección adquirida

La inmunidad protectora contra este parásito es específica, limita la replicación de los taquizoítos durante la fase aguda de la infección y es mediada por diferentes componentes, entre los cuales se encuentran los linfocitos B activados, anticuerpos (Ig), linfocitos T, interleucinas (IL), entre otros.⁴⁶

La inmunidad celular durante la toxoplasmosis se caracteriza por la generación de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Estas células producen citocinas y desarrollan funciones citotóxicas. La principal función de los linfocitos T CD4+ es la secreción de la IL-2 necesaria para la proliferación de los linfocitos T CD8+, consideradas las células citotóxicas por excelencia.⁴⁷ Los linfocitos T no solamente controlan la replicación de *T. gondii* durante la fase aguda de la infección, sino que además previenen los episodios de reactivación durante la infección crónica.⁴⁸

Mediante la activación de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y T cooperadores (CD4+); se pueden inducir dos tipos de respuesta inmune, Th1 o Th2.⁴⁹ La respuesta Th1 se ha descrito como la ideal para controlar la infección producida por *T. gondii*⁵⁰, se caracteriza por inducir la secreción de citocinas tales como IL-2, IFN- γ y TNF- α ; estas citocinas combinadas activan, entre otros, a los macrófagos y a las células asesinas naturales (NK), así como la producción de anticuerpos de la clase IgG1, lo que conlleva la modulación de la importante respuesta inflamatoria. Por lo tanto, el desarrollo de una fuerte respuesta inmune celular Th1 es primordial en el control de la infección por *T. gondii* con la producción de citocinas proinflamatorias. La respuesta Th2 produce IL-4, IL-10, IL-5, IL-6 y otras citocinas que promueven la producción de anticuerpos de subclases IgG2 e IgG4 (Figura 4), así como eosinofilia y otras reacciones como la alergia.⁵¹ En sujetos en los que predomina la respuesta Th2, no se bloquea la replicación parasitaria. La patogenia de la enfermedad se asocia a una replicación no limitada y a una continua destrucción de células parasitadas.

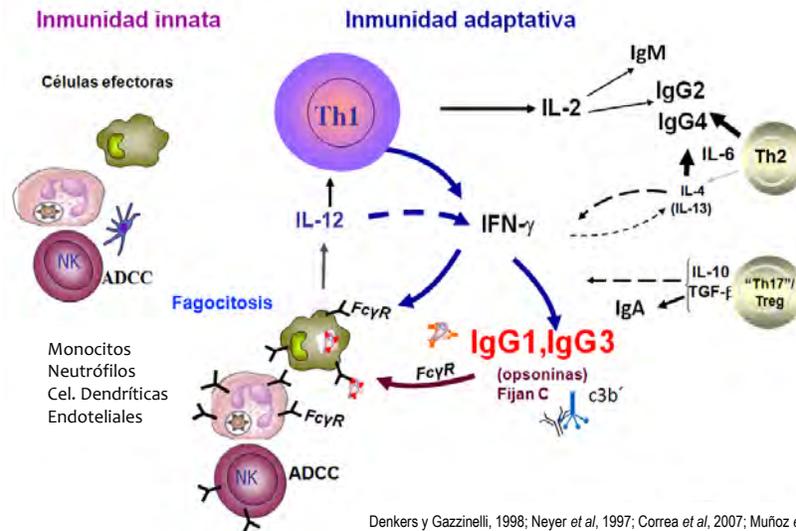


Figura 4. El sistema inmune es esencial para preservar la homeostasis en la relación parásito-hospedero, diferentes componentes de la respuesta innata y adaptativa se encuentran involucrados en el control de la proliferación parasitaria, entre los cuales, anticuerpos de las clases IgG1/IgG3, que facilitan la fagocitosis del parásito mediante la opsonización o neutralizando la invasión celular y otros como las clases IgG4, IgM e IgE relacionados con características clínicas adversas.

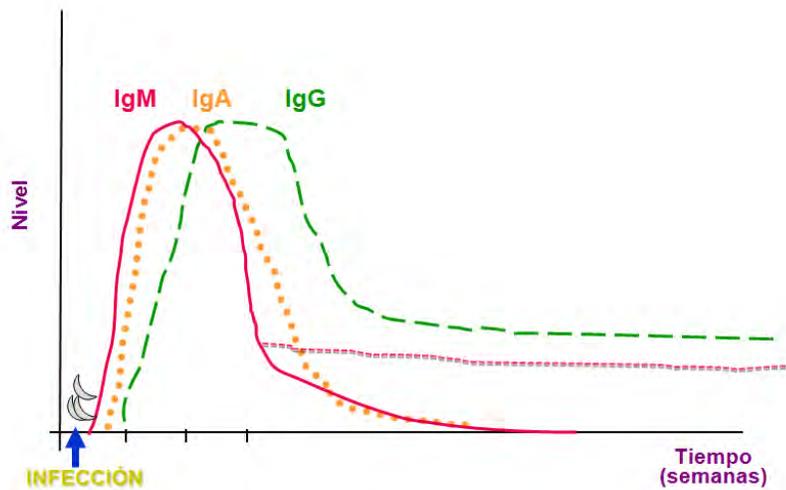
▪ Respuesta inmune humoral en infección adquirida

El sistema inmune humoral participa en la respuesta contra *T. gondii* y la detección de los anticuerpos específicos. Actualmente es una de las estrategias más utilizadas para el diagnóstico de la infección.^{52 53}

La respuesta humoral protectora es mediada por los linfocitos B activados, ya que éstos reconocen directamente al antígeno a través de sus receptores específicos (inmunoglobulinas, Ig). Dichos linfocitos, más tarde, son re-estimulados por interleucinas (IL) producidas por los linfocitos T, para así diferenciarse a células plasmáticas, dando origen a las diferentes clases de inmunoglobulinas.⁵⁴

Algunos de estos anticuerpos originan lisis del protozoario, pero actúan exclusivamente sobre el parásito extracelular, cuya membrana celular perforan con ayuda del complemento, sin poder actuar contra los microorganismos que se multiplican dentro de las células.⁵⁵

En humanos, los anticuerpos IgM específicos son detectables a partir del séptimo día postinfección y pueden permanecer hasta por un año.^{56 57 58} Los anticuerpos IgG aparecen 2 a 3 semanas después y alcanzan su concentración máxima 2 meses más tarde, persistiendo de por vida, se dirigen contra determinantes antigénicos proteicos de la superficie del taquizoíto.⁵⁹ Los isotipos predominantes de IgG son IgG1, seguido de IgG2 e IgG3 y su capacidad para la fijación del complemento, resulta en un mecanismo de resistencia a la infección, puesto que los taquizoítos opsonizados son susceptibles a la destrucción por la vía lisosomal en las células fagocíticas.⁶⁰ En la toxoplasmosis adquirida, se observa predominio de anticuerpos IgA específicos contra diversos antígenos de superficie del taquizoíto, desde la segunda semana postinfección y se mantienen en niveles detectables durante varios meses o incluso hasta un año después, como se observa en la Figura 5. En la toxoplasmosis congénita, los anticuerpos IgA son de gran utilidad para el diagnóstico, ya que las pruebas son más sensibles para IgA que para IgM.^{57 61}



Huskinson et al, 1989; Correa et al, 2007

Figura 5. Comportamiento serológico ante la infección por *T. gondii*. Los anticuerpos son importantes para soportar el diagnóstico, los primeros en aparecer son los de clase IgM, a los 3 o 10 días después de la infección duran de pocas semanas hasta años, en seguida se presentan los anticuerpos de clase IgA los cuales tienen un papel protector inhibiendo la invasión celular por el parásito, principalmente a nivel de mucosas, todas las subclases de IgG se presentan, siendo la IgG1 la predominante y la primera en aparecer, los anticuerpos pueden defender al hospedero de reinfecciones.

▪ Respuesta inmune en el embarazo

Durante el desarrollo del embarazo, el sistema inmune de la futura madre se enfrenta a una doble situación: por un lado, el crecimiento embrionario y, por el otro, toxinas ambientales y patógenos que amenazan al feto y a ella misma.⁶² De hecho, el embarazo exitoso involucra un acertado equilibrio en la organización del sistema inmunológico en el medio fetal–materno y en el útero, resultando en un proceso de reconocimiento y tolerancia.^{63 64}

Actualmente, se sabe que durante el embarazo existen modificaciones fisiológicas, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, que permiten al feto desarrollarse sin ser agredido por la respuesta inmune de la madre y al mismo tiempo, permitiéndole a ésta, continuar protegida contra los invasores del medio. Estos cambios que se manifiestan en el sistema inmune de la madre son consecuencia de las variaciones hormonales asociadas a la gestación y, como consecuencia, las células del sistema inmune y la liberación de citocinas es diferente en cada trimestre del embarazo, además, ahora se sabe que la participación de estas citocinas son esenciales en la implantación del feto, así como en los procesos patológicos asociados al embarazo como preeclampsia y abortos espontáneos.⁶⁵

Durante todo el embarazo el feto es protegido intraútero por diferentes barreras mecánicas, como la placenta, el saco vitelino y el moco cervical; este último, debido a su gran viscosidad y su alto contenido de péptidos antimicrobianos. Se ha descrito también, que las células amnióticas producen defensinas con actividad antimicrobiana, y que el líquido amniótico tiene propiedad bacteriostática.⁶⁶

En respuesta a la infección por los taquizoítos, las células CD4+, CD8+ o NK uterinas (NKu) presentes en la placenta, pueden producir niveles altos de IFN- γ , quimiocinas y citocinas relacionadas.^{55 67} Por otro lado, las NK periféricas, el IFN- γ , el ICAM-1 y el MIF tienen un papel paradójico, pues si bien protegen a la madre del daño ocasionado por los taquizoítos, promueven la transmisión vertical, tanto en modelos de ratón, como en estudios in vitro con vellosidades coriónicas

humanas.⁵⁵ Los anticuerpos son moléculas muy importantes en el control de *T. gondii*, pero también en la patogenia de la enfermedad y su transmisión vertical, como ya lo hemos mencionado.⁶⁸ El cambio de clase hacia IgG1 y 3 humanas es inducido por IFN- γ , por lo que se asocian a una respuesta de tipo Th1, la cual es predominante en la toxoplasmosis adquirida; su síntesis es incrementada por la IL-10 y el TGF- β , moléculas que regulan una respuesta Th1 exacerbada y así evitan el daño. La IgG1 es la inmunoglobulina que se presenta primero y la más común en la toxoplasmosis en adultos, incluyendo mujeres gestantes. Protege por medio de la fijación de complemento y la opsonización de fagocitos y células NK.⁶¹ Más aún, es la subclase con mayor afinidad al receptor neonatal para Fc γ (FcRn), que media la transcitosis de las IgG de la madre al feto, en sincitiotrofoblasto y las células endoteliales de las vellosidades coriónicas, así como en el intestino del lactante a su circulación, por lo que, se le ha atribuido un papel protector para el gestante *in utero* y durante los primeros meses de vida extrauterina. La IgG2 y la IgG4 son inducidas por las citocinas del perfil Th2: IL-6 e IL-4, respectivamente, y no tienen funciones protectoras como la fijación de complemento o la opsonización.⁶⁹

Síntesis de inmunoglobulinas del feto durante el embarazo

Después del estímulo antigénico, las células B se diferencian en células plasmáticas productoras de las inmunoglobulinas. Existen cinco tipos de isotipos de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgD, IgA e IgE.³⁹

Se sabe que, la capacidad de síntesis de anticuerpos de clase IgM en el feto, empieza a partir de las 10 semanas de vida intrauterina (VIU) y, entre las semanas 10 y 12, aparecen las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgE.⁶⁹ El transporte de IgG materna a través de la placenta, se observa desde la octava semana, y aunque los niveles en el cordón umbilical a las 17 semanas de VIU, son del 5 al 10% de la IgG total de la madre, la mayor parte de ellas son de la subclase IgG1. Es hasta la semana 37 de gestación, cuando ocurre un aumento exponencial de IgG1, IgG3 e

IgG4.^{70 71 72} La IgG2 se mantiene en niveles bajos durante todo el embarazo. Cerca de la semana 22 de VIU, el número de células B en órganos linfoides del feto, es similar al de un adulto. En el feto sin estímulo antigénico se detecta IgM en suero hasta la semana 30, y los niveles de IgM e IgA secretoria al nacimiento, son mínimos. En diversos estudios se ha demostrado la presencia predominante de la subclase IgG1 en el suero del cordón umbilical de neonatos.^{40 41 46} El niño alcanza los niveles de inmunoglobulinas del adulto entre el año y los 12 años de edad. Es importante destacar que los neonatos de pretérmino presentan niveles menores que los niños a término.⁷³

Los fetos y neonatos están protegidos en forma parcial por la transferencia pasiva de IgG materna. La respuesta inmune disminuida o limitada en los neonatos, se debe a la presencia de linfocitos B y células plasmáticas inmaduras, a la actividad de las células T inmaduras y a una producción limitada de inmunoglobulinas y citocinas.⁷⁴

Cuadro 1. Niveles de inmunoglobulinas (mg/dL) basados en la edad gestacional (VIU) y edad cronológica

Edad	IgG	IgA
26-28 semanas VIU	251	1.2
29-32 semanas VIU	368	0.6
RN término	1,031	2
1-3 meses, término	430	21
1-3 meses, pretérmino	145	
4-6 meses, término	427	28
4-6 meses, pretérmino	137	
7-12 meses, término	661	37
7-12 meses, pretérmino	277	
Adulto	1,158	200

Penagos et al, 2003

Diagnóstico

Diagnóstico de Infección adquirida (incluyendo mujeres embarazadas)

En la Figura 6 se muestra el diagrama de flujo para el diagnóstico de la toxoplasmosis, basado principalmente en la detección de anticuerpos anti *T. gondii* en el plasma o el suero de la sangre, utilizando el ELISA indirecto o, el de captura de anticuerpos.

Aunque los anticuerpos de clase IgM permiten sospechar la fase aguda de la infección, su presencia no es confirmatoria, ya que en el caso de la infección por *Toxoplasma*, estos anticuerpos pueden permanecer por periodos de 1 o más años, es por ello, que se debe demostrar por el aumento de títulos de anticuerpos IgG entre dos muestras tomadas con un intervalo de 15 a 30 días; un aumento mínimo de 4 veces en los títulos, se considera confirmatorio de fase aguda en conjunto con la avidéz, que permite identificar anticuerpos IgG de avidéz baja (infección aguda) o alta (infección crónica), en una sola muestra. Pero, en los casos con avidéz intermedia, se requiere una segunda muestra para hacer una titulación comparativa.⁷⁵

En pacientes inmunodeprimidos con deficiencia inmune combinada, celular y humoral, se recomienda el empleo de la batería serológica, imagenológica, histopatológica y PCR.

Diagnóstico de infección Congénita

El diagnóstico de laboratorio de enfermedades congénitas involucra primero, la detección de la infección de la mujer embarazada; segundo, la confirmación de la infección del recién nacido (neonatal) de madres positivas.⁷⁴

a) Diagnóstico Prenatal

Los resultados positivos de una serología estándar, que detecte la presencia de anticuerpos *T. gondii*, son suficientes para detectar una infección. La detección de dicha infección en fase aguda debe ser confirmada lo antes posible, junto con el diagnóstico de embarazo y, si no es posible, en cualquier momento durante el embarazo, incluyendo al tiempo del nacimiento.⁷⁶

Si la infección materna está en fase aguda, y la gestación se encuentra entre la semana 14 y la 30, se puede realizar amniocentesis para el diagnóstico de infección fetal, por bioensayo o PCR de líquido amniótico, y así determinar la presencia del parásito o su DNA. Si este ensayo es positivo en el líquido amniótico, debe considerarse que, las técnicas de PCR estandarizadas y validadas, detectan de un 64-100% de los casos de toxoplasmosis en fetos, dependiendo del tiempo de gestación en que se infectó la madre^{75 77} y vale la pena enfatizar que el hallazgo del parásito o de su DNA en la placenta, no es diagnóstico de infección congénita, por ello es importante tomar en cuenta el cuadro clínico y los resultados de otras pruebas de laboratorio en el recién nacido.

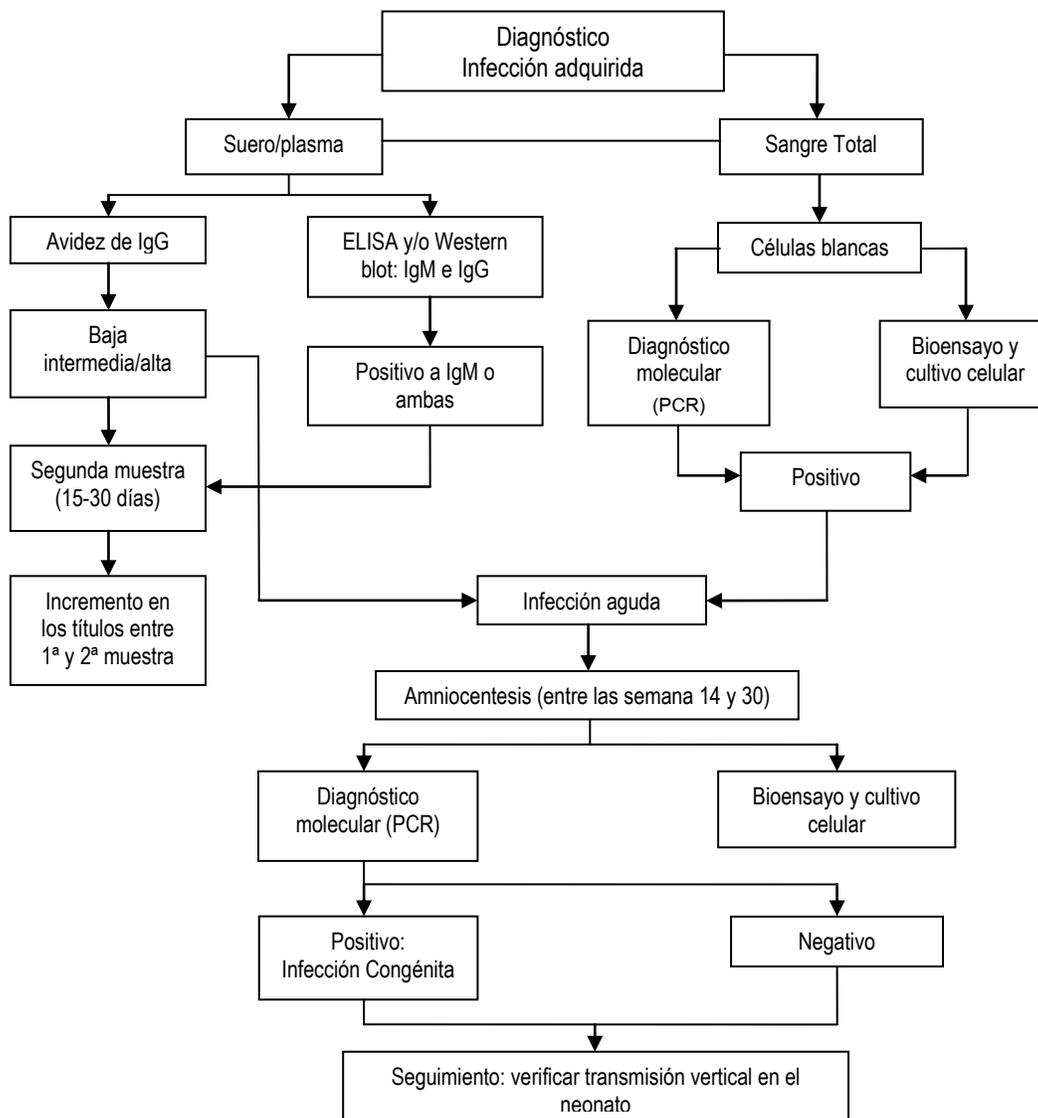


Figura 6. Diagrama de flujo para el diagnóstico de toxoplasmosis en fase aguda de la infección adquirida en la mujer embarazada y diagnóstico prenatal. Las pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos de clase IgM por ELISA de captura, permiten detectar casos sospechosos en fase aguda y corroborarlo por varios métodos: a) Titulación de anticuerpos específicos IgG en muestras seriadas (presentando un aumento en éstas es diagnóstico de fase aguda); b) Determinación de avidéz de anticuerpos IgG; c) Bioensayo (inoculación en ratón) o cultivo celular y d) Pruebas moleculares como PCR punto final o tiempo real. En caso de sospecha o confirmación de fase aguda, debe proporcionarse tratamiento con macrólidos y confirmar infección fetal por PCR, bioensayo o cultivo celular en líquido amniótico. De confirmarse infección en el feto, el tratamiento cambia a Pirimetamina/sulfadiazina y ácido fólico. Al nacimiento debe corroborarse la infección fetal.

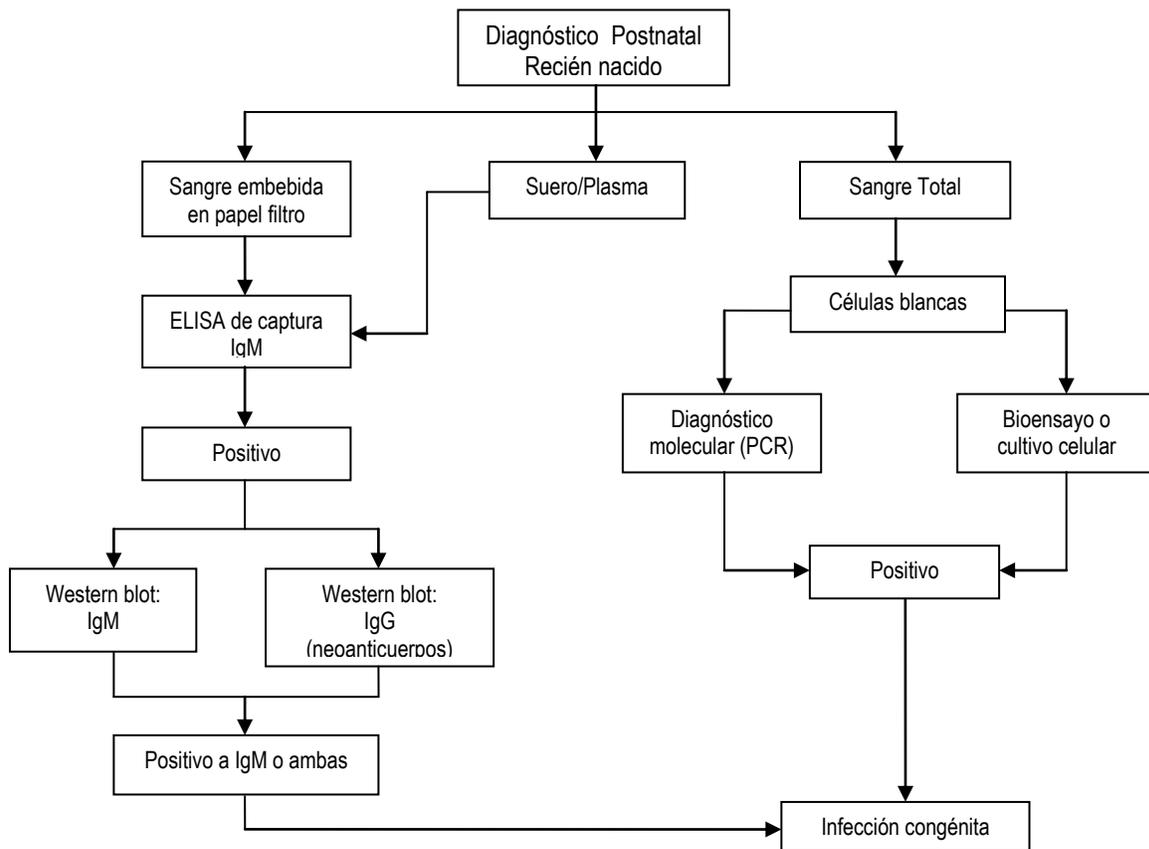


Figura 7. Diagrama de flujo para el diagnóstico postnatal de toxoplasmosis congénita. Las pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos de clase IgM por ELISA de captura tienen alta sensibilidad, aunque debe corroborarse por varios procedimientos, entre ellos, Western blot para la comparación del patrón de anticuerpos IgG entre la madre y el neonato (en busca de neoanticuerpos). Si se cuenta con sangre periférica (o de cordón), se realiza aislamiento en ratón o cultivo celular y las pruebas moleculares como la PCR en punto final o tiempo real. Si el ensayo es positivo en líquido amniótico es confirmatorio de infección fetal.

b) Diagnóstico Postnatal

Para el diagnóstico en los neonatos de madres con un resultado positivo a toxoplasmosis en fase aguda, se recomienda el análisis de muestras de sangre fresca o embebida en papel filtro, además de la inoculación de ratones con suero o sangre del bebé en estudio. La detección de parásitos circulantes en la sangre del recién nacido es confirmatoria de esta infección (Figura 7).

En caso de resultados negativos al nacimiento, es recomendable el análisis de una segunda muestra de sangre fresca o embebida en papel filtro del mismo neonato a la semana(s) o mes(es) posteriores al nacimiento, ya que se incrementa la sensibilidad de la detección cuando existe una transmisión tardía en el embarazo.⁷⁸

El diagnóstico de la infección congénita en el neonato asintomático, se basa en la detección de anticuerpos IgM o IgA específicos que no cruzan la placenta, así como la detección de anticuerpos IgG, que sí la cruzan, por lo que es necesario comparar el patrón antigénico del recién nacido con el de la madre. En este caso, la presencia de antígenos reconocidos, únicamente por los anticuerpos del hijo (“neoanticuerpos”) se considera infección congénita del neonato. Esto se puede realizar mediante la comparación de los anticuerpos de clase IgG, analizadas por medio de Western blot, presentes en la muestra de madre y neonato, que es una herramienta útil para el diagnóstico de infección congénita, por medio de la identificación de los anticuerpos producidos por el neonato y no transferidos por la madre como se muestra en la Figura 8.^{79 80}

En los casos de neonatos con signos clínicos y sospecha de Toxoplasmosis congénita, la prueba oftalmológica permite observar retinocoroiditis, lesión muy común en esta enfermedad, que además de ser característica, permite el diagnóstico diferencial con otras infecciones congénitas.

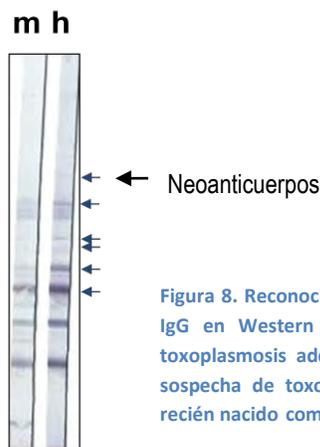


Figura 8. Reconocimiento de patrones de *Toxoplasma Gondii* por anticuerpos IgG en Western Blot realizado con muestras de suero de madres con toxoplasmosis adquirida durante el embarazo y muestras de sus hijos con sospecha de toxoplasma congénita, se detectaron “neoanticuerpos” en el recién nacido comparados con la muestra de la madre.

Diagnóstico diferencial:

Con el complejo TORCH (de las iniciales en inglés toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus, herpes simple y VIH) un grupo de enfermedades infecciosas congénitas que tienen algunas manifestaciones similares: sífilis, varicela-zoster, parvovirus, sarampión.

Métodos de Diagnóstico

Uno de los grandes problemas, es el diagnóstico de la toxoplasmosis especialmente de la fase aguda, ya que de eso depende el tratamiento, pues el tratamiento efectivo está dirigido contra los taquizoítos, presentes solo en esta fase y el tratamiento es altamente tóxico, por lo que resulta deseable tener la certeza de su existencia antes de administrarlo.⁵

El diagnóstico etiológico de la toxoplasmosis se ha basado principalmente en la detección de anticuerpos específicos en el suero de los individuos, como la infección aguda en la embarazada, la toxoplasmosis cerebral y la infección congénita.⁸¹

La medicina actual, por lo general, utiliza estas técnicas en conjunto para tener un diagnóstico más certero, se vale del recurso de los métodos inmunológicos y de la biología molecular.^{82 83 84} No obstante, el método inmunológico de mayor empleo en el diagnóstico es el inmunoensayo (ELISA)^{85 64 86} como prueba rutinaria para la detección de anticuerpos específicos contra *T. gondii*. También se considera de gran utilidad el estudio de avidéz de IgG, variante de ELISA, para el diagnóstico de infección reciente.⁴²

Estudios de gabinete

La tomografía computarizada (TC) revela múltiples lesiones hipodensas bilaterales, que se observan mejor a la administración del medio de contraste, con

un patrón de anillo que rodea la lesión, existiendo lesiones cerebrales focales en el 70-80% de los pacientes.⁵ Estas lesiones tienden a involucrar a los ganglios basales y la unión corticomedular hemisférica. La resonancia magnética (RM) es más sensible que la TC y, por lo tanto, es la técnica de imagen de elección, especialmente en pacientes sin alteraciones neurológicas focales. A pesar de que la encefalitis toxoplásmica en ocasiones puede causar una lesión cerebral única en la RM, se deben descartar diagnósticos alternativos (sobre todo el linfoma del SNC). La sensibilidad para esta prueba va desde 86 hasta 100%, con una especificidad del 76% al 100%. Los estudios de gabinete usuales en ginecobstetricia, como el ultrasonido, permiten detectar casos con problemas clínicos como hidrocefalia, malformaciones congénitas o alteraciones de la placenta relacionados con toxoplasma congénita.¹⁷

El diagnóstico de la toxoplasmosis puede hacerse por métodos directos o indirectos.

Métodos directos:

Los métodos directos se basan en la demostración de formas parasitarias.

Aislamiento in vivo e in vitro

El aislamiento de *Toxoplasma gondii* a partir de sangre, suero, líquido cefalorraquídeo o líquido amniótico, establece que la infección es aguda. Los intentos de aislamiento del parásito se pueden realizar mediante la inoculación en ratón o en la inoculación de cultivos de tejidos celulares, donde se pueden demostrar las células cargadas de parásitos.¹⁶

Identificación histológica

La presencia de taquizoítos en secciones de tejido o en fluidos corporales (ej. líquido cefalorraquídeo) nos permite establecer el diagnóstico de infección aguda.

A menudo, es difícil demostrar la presencia de taquizoítos en secciones de tejido teñido, no obstante, se pueden observar múltiples quistes cerca de un área de inflamación necrótica. La tinción con anticuerpos fluorescentes puede ser útil, pero este método, a menudo, da resultados inespecíficos. La técnica de inmunoperoxidasa, que utiliza antisueros frente a *Toxoplasma gondii*, han utilizado con éxito anticuerpos monoclonales, marcados con fluoresceína en la demostración del parásito en el sistema nervioso central.^{10 87}

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final o en tiempo real

La amplificación por PCR para la detección de ADN del *Toxoplasma gondii* en tejidos y fluidos corporales, provee con éxito el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral, ocular y congénita. La sensibilidad de la PCR en el líquido cefalorraquídeo (LCR) varía entre 11% y 77%, mientras que la especificidad es cercana a 100%. La sensibilidad de la PCR en la sangre varía del 15% al 85%.⁸⁸ Una gran desventaja, es que, en el diagnóstico de infección fetal en el líquido amniótico por PCR, la negatividad no la descarta y que, en la mayoría de los casos, no es posible detectar al parásito en los fluidos.^{68 71}

Métodos indirectos:

Estos métodos se basan en la demostración de la presencia de anticuerpos IgM, IgG o IgA específicos contra *T. gondii*. La detección de estos anticuerpos se ha usado para definir con más detalle el diagnóstico, pudiendo ser útil para sugerir el pronóstico.⁴³

Prueba de Sabin y Feldman (SF)

Considerado como el estándar de oro es el método del colorante Sabin-Feldman⁸⁹ ⁹⁰ basado en la visualización de taquizoítos vivos, provenientes del líquido peritoneal de ratones inoculados con suero del paciente. Los taquizoítos se tiñen con azul de metileno, sólo cuando los anticuerpos se han unido sobre la superficie

del parásito y fijan el complemento, lisando los toxoplasmas. Mide principalmente la IgG, siendo una técnica sensible y específica.⁹¹

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Este método detecta antígenos de membrana en muestras de suero. Los anticuerpos IgG que aparecen en general 1-2 semanas después de iniciada la infección y probablemente, persistan títulos bajos durante toda la vida. El título no se correlaciona con la severidad de la enfermedad, ya que, con frecuencia, se detectan falsos positivos en sueros con anticuerpos anti-núcleo y, también falsos negativos en suero con bajos títulos de anticuerpos IgG. Por lo que puede dar falsos positivos por factor reumatoide (FR) y anticuerpos antinucleares (ANA) sintetizados por el feto y falsos negativos por IgG de la madre.⁹²

Hemaglutinación (HAI)

Se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-*T. gondii* de producir aglutinación en presencia de glóbulos rojos, sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito.⁹³ Se utilizan muestras de suero para detectar anticuerpos de tipo IgG que, por lo general, aparecen más tardíamente que los detectados por la reacción de SF y de inmunofluorescencia indirecta. Este método es específico y sensible. Sin embargo, su limitación recae en el diagnóstico de la infección reciente, ya que los anticuerpos que detecta aparecen más tardíamente que los de la IFI. Por lo que esta técnica no se recomienda para el diagnóstico de infección congénita, ya que puede dar falsos negativos en casos comprobados de infección. Tampoco debe emplearse para el diagnóstico de infección aguda en mujeres embarazadas puesto que existe demora en la elevación de títulos.

ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay) o Bioensayo

El diagnóstico se basa en gran medida, en los resultados de pruebas serológicas, que detecten anticuerpos específicos anti-*T. gondii* IgG, IgM e IgA. La mayor parte

de los kits comerciales (BosterBio, MyBioSource, Aviva Systems Biology)[®] están basados en placas sensibilizadas con lisados de antígenos de toxoplasma (antígenos totales o fracciones de parásitos). En años recientes, se ha demostrado la utilidad de emplear proteínas antigénicas recombinantes. No obstante, tiene como desventajas la poca o ninguna disponibilidad de la prueba para uso común y la persistencia de IgA, hasta por un año después de la infección.⁹⁴

La sensibilidad y la especificidad de este método son mayores del 90%, dependiendo fundamentalmente de los antígenos utilizados.⁹⁵

Avidez de anticuerpos IgG (ELISA modificado)

Método descrito por Hedman et al en 1989, se basa en la distinta fuerza de unión entre antígeno y anticuerpo tanto en la infección aguda como en la crónica. De acuerdo con diferentes estudios, esta afinidad aumenta con el tiempo, lo que permite discriminar si la infección es reciente (< 4 meses), o antigua (> 4 meses).⁹⁶ En las primeras fases predominan las IgG con baja avididad, mientras que en la infección crónica se produce la situación contraria.⁹⁷ La avididad de estos anticuerpos IgG representa una herramienta útil, aunque puede verse obstaculizada en algunos casos, ya que puede persistir por meses una avididad baja de los mismos.⁹⁸

Western-blot

La técnica de western-blot para IgG anti-*Toxoplasma*, ha mostrado que la presencia de bandas de 25, 22 y 69 kDa son útiles para predecir la aparición de una toxoplasmosis congénita.⁷⁴ También de manera reciente, se ha aplicado una técnica de western-blot de avididad en toxoplasmosis, que permite poner en evidencia proteínas marcadoras de infección crónica y aguda.⁹⁹ Las limitaciones para su aplicación son su costo y la laboriosidad en su realización e interpretación.⁵⁷

Determinación de anticuerpos específicos vs *T. gondii* en la infección adquirida

Anticuerpos específicos IgM

Desafortunadamente, la presencia de los anticuerpos IgM en muestras de suero no siempre permite diferenciar entre la fase aguda y la fase crónica, debido a que, se ha observado que su presencia pudiera persistir más allá de un año, lo que indica, que no es un marcador preciso de infección aguda.^{82 85 100.} La IgM en fase aguda ha sido registrada de 0-3 meses, con un decremento significativo entre los 3 y los 9 meses posteriores a la primoinfección.¹⁰¹

Anticuerpos específicos IgA

En la fase inicial de la infección (0-6 meses) también se han observado niveles más altos de la IgA, por lo que la presencia de este anticuerpo es considerado un buen marcador de infección aguda, más tarde van disminuyendo en forma gradual, hasta su desaparición.^{82 102} Sin embargo, no siempre es detectada, en cerca de un 15% de los casos de infección aguda no podrá ser detectada.¹⁰³

Anticuerpos específicos IgG y subclases

Se ha señalado que existe un incremento de los anticuerpos de la clase IgG hasta los 6-9 meses del inicio de la infección. También se han estudiado las diferentes subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), tanto en la primoinfección como en la reactivación de la enfermedad. La detección de las subclases IgG anti-Toxoplasma, podría ser útil en el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis congénita.¹⁰⁴

La subclase IgG1 ha sido la mayormente estudiada. Siendo la predominante para diferenciar las etapas de la infección, ya que presenta mayor reactividad en sueros durante la fase aguda que en los de fase crónica.^{105 106} Sin embargo, en otros estudios se ha encontrado que esta subclase de IgG1 presenta un incremento en su reactividad entre los 0 y los 6 meses del inicio de la infección, seguido de un ligero decremento, pero manteniendo sus niveles a lo largo de los primeros 12

meses de enfermedad.¹⁰⁷ La búsqueda de anticuerpos de la clase IgG y la subclase IgG1 mediante el ELISA, ha resultado una prueba muy útil para identificar la infección en los recién nacidos, aunque no diferencia con precisión a los no infectados.¹⁰⁸ Los anticuerpos IgG1 e IgG3 presentan niveles altos en la fase inicial de la infección (0-6 meses), seguida de un decremento continuo en el tiempo.¹⁰⁹ La asociación de la relación $IgG1/IgG3 > 1.0$ con la positividad de IgM o IgA fue encontrada predominantemente en los primeros 3 meses de infección, mientras que, la asociación entre la relación $IgG1/IgG3 < 1.0$ con anticuerpos IgM positivo o IgA negativo fueron observados con mayor frecuencia entre los 3 a 12 meses de infección. Lo anterior podría ser un método potencial para distinguir tempranamente una infección aguda de una infección crónica de la Toxoplasmosis.¹¹⁰

En un estudio previo realizado con muestras de suero de binomios madre-hijo tomadas al momento del parto, se encontró que en los casos infectados, la frecuencia de anticuerpos IgG1 e IgG2 fue mayor en las madres de niños con manifestaciones clínicas, que en aquellas de los subclínicos con significancia para IgG1. Esto fue contrario a lo esperado, por lo que la IgG1 producida por la madre, no parece tener un papel protector contra la transmisión; sino relacionarse con problemas clínicos en el hijo.⁷² Estos datos sugieren que las subclases IgG2 e IgG3, presentes en el suero del neonato y ausentes en el de la madre, indican infección congénita, por lo que resultan útiles para el diagnóstico y, las subclases IgG3 e IgG4 presentes en el bebé pueden ser marcadores de problemas clínicos.⁴⁹ La explicación de una respuesta no protectora de IgG3, pudiera estar relacionada con la alta afinidad de esta subclase al receptor Fc- γ R, que ocasiona una señalización ligada al inhibidor, que regula a la baja las funciones de la respuesta inmune, contribuyendo al mecanismo de evasión del parásito de la respuesta inmune.¹¹¹

Anticuerpos específicos IgE

La detección de IgE específica no es un buen marcador, se describe en función del curso clínico de la infección. Así, en las formas asintomáticas, la IgE es

detectable durante un par de meses y desaparece muy rápido mientras que en las formas sintomáticas persiste durante varios meses. Hay que señalar también que es posible detectar IgE en los casos de toxoplasmosis de reactivación.⁵¹ Se sabe que la presencia de anticuerpos IgE es de mal pronóstico, tanto en la infección congénita como en la adquirida, antes o después del tratamiento.^{112 113}

Respuesta inmune en mucosas

Debido al tema de interés en este trabajo y tomando en cuenta que la principal forma de adquirir la Toxoplasmosis es por la vía oral, consideramos importante la revisión de esta respuesta a nivel de las mucosas. Como ya se mencionó anteriormente, el sistema inmune es el responsable de mantener la integridad del individuo ante la gran diversidad de agentes extraños agresores, mejor conocidos como antígenos (Ag), en este caso *Toxoplasma gondii*. El sistema inmune secretor de las mucosas o tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), está compuesto por un grupo de tejidos linfoides, organizados en folículos que se encuentran presentes en la superficie de todas las mucosas, tanto respiratorias, como digestivas y genitourinarias.¹¹⁴ Dichos tejidos pueden presentarse en forma de folículos agregados como en las amígdalas palatinas, amígdalas linguales y los adenoides.¹¹⁵

El MALT tiene la función de impedir el ingreso de antígenos al organismo. Los antígenos ingeridos o inhalados penetran a través de células que cubren la mucosa oral, respiratoria y tubo digestivo a nivel de acúmulos linfáticos.¹¹³

Estudios recientes sugieren un posible papel de las células epiteliales en la presentación de antígenos. Células dendríticas situadas en el epitelio de las mucosas, pueden presentar directamente antígenos hacia las células B y, dirigir sus cambios de isotipo hacia la IgA e IgA2 con la ayuda de las citocinas producidas por las células epiteliales. Por lo tanto, el papel principal de las células epiteliales es la producción de anticuerpos IgA de las mucosas, los cuales son esenciales para la defensa de las mucosas. Las células epiteliales producen el

componente secretor (glicoproteína) que confiere estabilidad a la IgA, siendo el responsable del transporte externo de polímeros de IgA e IgM producidos localmente.^{116 117}

Cuando penetra un agente nocivo, se desencadena una respuesta inmunológica a nivel de las mucosas, donde la adherencia bacteriana constituye un paso clave en el desarrollo del proceso patológico; el agente infeccioso permanece en el hospedero, ganando acceso a los nutrientes a través de este mecanismo.¹¹⁴

Esta estimulación antigénica, puede inducir la proliferación y diferenciación de células B y T. La migración de estos linfocitos sensibilizados hacia los tejidos secretorios, como las glándulas salivales, en los que las células B se diferencian, proliferan y maduran espontáneamente en células plasmáticas. Estos linfocitos B son grandes productores de anticuerpos.¹¹⁸

La infección de las mucosas producidas por patógenos intracelulares, induce la inmunidad mediada por células¹¹⁹, como la que se pone de manifiesto en las células T tipo 1 (CD4+, CD8+) y en los linfocitos citotóxicos. Estas respuestas son acompañadas normalmente, por la producción de anticuerpos para la síntesis de IgA secretoria (s-IgA), las cuales proveen una primera línea de defensa, muy importante contra la invasión de agentes patógenos hacia los tejidos.¹¹⁵

Un antígeno puede desencadenar la producción de inmunoglobulinas (Igs) de diferentes tipos: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE; las cuales, tienen propiedades biológicas e inmunológicas distintas.

Inmunoglobulinas en las mucosas

Aunque en las mucosas se sintetizan todas las inmunoglobulinas, la más característica es la IgA, teniendo una distribución porcentual en los fluidos internos (sangre, líquidos intersticiales), la razón IgG/IgA es de 5:1. Sin embargo, en las secreciones asociadas a las mucosas (saliva, lágrimas, secreciones intersticiales, leche, etc.) la razón IgG/IgA es <1.¹²⁰

La IgM en secreciones está asociada al componente secretor, aunque su concentración es menor que la de IgA. Por su parte, la concentración de IgG en secreciones puede ser igual, o incluso mayor que para la IgM, aunque su transporte no está asociado al receptor de polinmunoglobulina y, por tanto, tampoco al componente secretor.¹¹³

Pequeñas concentraciones de IgE pueden aparecer en secreciones, fundamentalmente en casos en que reacciones alérgicas afecten la permeabilidad del tejido mucoso.¹¹⁴

Debido a que la vida media es de 5 días para la mayoría de las células de IgA del plasma, muchas de ellas se convierten en células B, para garantizar un suplemento continuo de anticuerpos IgA en las mucosas. Por esto, las células circundantes deben proveer un suplemento constante de citocinas, necesarias para el cambio de isotipo de las células B, para el crecimiento y para la diferenciación de las células secretorias de IgA del plasma.¹²¹

En el organismo, la IgA secretora constituye más del 80% de todos los anticuerpos producidos por el MALT. La respuesta inmune humoral en las mucosas es principalmente del isotipo IgA. Este anticuerpo puede atravesar las membranas de las mucosas y ayuda a impedir la entrada de los microorganismos.¹¹³ Las células linfoides asociadas a la mucosa, recirculan principalmente dentro del MALT. Así las células linfoides estimuladas por un antígeno en las placas de Peyer, viajan por la linfa hacia los linfáticos regionales y, luego por el conducto torácico a la circulación, para de nuevo establecerse en las mucosas, donde secretan IgA. La recirculación específica (tropismo por las mucosas) se basa en las moléculas de adhesión que estas células expresan. Basándose en este mecanismo, la estimulación antigénica en un área de la mucosa provoca una respuesta de anticuerpos (IgA) en otras zonas mucosas.¹¹⁸ La mayoría se produce como resultado de una síntesis y, no del torrente circulatorio. Solamente los PMN neutrófilos presentan un receptor para la IgA.¹¹⁷ Existen dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2, con diferente distribución en tejidos corporales. En el caso de IgA1 la distribución en los fluidos internos es casi del 90% y en las secreciones mucosas

entre un 40-60%. Por otro lado, quizá en respuesta a las proteasas producidas por algunos organismos capaces de hidrolizar a la IgA1, la distribución de la IgA2 puede ser de hasta 60%.¹²⁰

El papel biológico de la IgA en las secreciones (IgAs) es:

1) Antiviral (tanto frente virus que producen infecciones locales como a virus que se diseminan). Neutraliza mediante el bloqueo de receptores específicos, impidiendo la colonización de la mucosa. También desarrolla una función antibacteriana, porque impide la adherencia y colonización de las superficies mucosas. Además, es capaz de neutralizar toxinas bacterianas (cólera) y llevar a cabo una acción antiparasitaria.

2) Neutralización de los virus dentro de las células endoteliales infectadas.

3) Formación de complejos inmunes, dado el contacto frecuente con los antígenos. La IgA secretora contribuye a su eliminación (Ag+IgG+IgA). Por otro lado, la IgA es poco inflamatoria ya que activa poco al complemento. Es por esto que, los complejos formados con IgA tienen muchas menos posibilidades de desencadenar enfermedad por inmunocomplejos.¹²²

Los principales mecanismos de inactivación de las inmunoglobulinas están relacionados con su degradación enzimática.

La cavidad oral presenta dos nichos biológicos como entidad inmunológica.^{123 124}

1. **Saliva:** mezcla de elementos excretados por las glándulas salivales, mucosa oral y surcos gingivales; componentes solubles y anticuerpos. En el Cuadro 2 se describen dichos componentes.
2. **Fluido gingival:** componentes solubles, anticuerpos y células como se expresa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes solubles e insolubles de la cavidad oral, presentes en la saliva y el fluido gingival

Componentes solubles de la saliva		
Componentes antimicrobianos	Mucinas Lactoferrina Peroxidasa salival Lisozima	Sinergia con IgA secretora
Promotores de la adhesión selectiva de microorganismos	Proteínas ricas en histidina Péptidos ricos en prolina Beta-2-microglobulina Fibronectina	
Anticuerpos	IgA1 40% IgA2 60% Componente secretor de IgA, IgM IgG	
Componentes solubles del fluido gingival		
Inmunoglobulinas	IgG>IgA>IgM	IgG= opsonización y neutralización
Complemento	Factores C3 y C4	Opsonización
Albúmina, transferrina, fibrinógeno, prostaglandinas, lisozima y citocinas.		
Componentes celulares		
	Fluido gingival	Sangre
PMNs	95-97%	60%
Linfocitos	1-2%	20-30%
T	30%	60-70%
B	70%	15-30%
Monocito-macrófagos	2-3%	5-10%

Regueiro et al, 1997

La saliva como fluido diagnóstico

La saliva se ha utilizado para controlar fármacos y hormonas^{125 126 127} también para el diagnóstico de enfermedades infecciosas virales, por levaduras o parasitarias.^{128 129} Estas revelaciones han constituido la base del campo del estudio de la saliva y, por lo tanto, han desencadenado investigaciones que han culminado con la identificación de marcadores basados en saliva para trastornos que van desde el cáncer hasta enfermedades infecciosas.¹³⁰

La información obtenida de microbios orales y factores inmunológicos sigue siendo uno de los aspectos más intrigantes en la búsqueda de biomarcadores salivales. Hoy en día, la saliva se considera como un fluido biológico capaz de reflejar el estado de salud actual de un individuo. Los esfuerzos continuos en este campo podrían llevar al establecimiento de ensayos, clínicamente aceptables, para la detección y monitoreo de distintos estados de enfermedad en todo el cuerpo.

Propiedades de la saliva y las glándulas salivales

Tal como fue expuesto anteriormente, la saliva contiene inmunoglobulina A secretora, procedente de las células plasmáticas de las glándulas salivales, pero también de IgG e IgM exudadas en el líquido gingival crevicular.¹³¹

La saliva es generada dentro de las glándulas salivales por las células acinares, recolectada en pequeños conductos y posteriormente liberada en la cavidad oral (Figura 9).¹³²

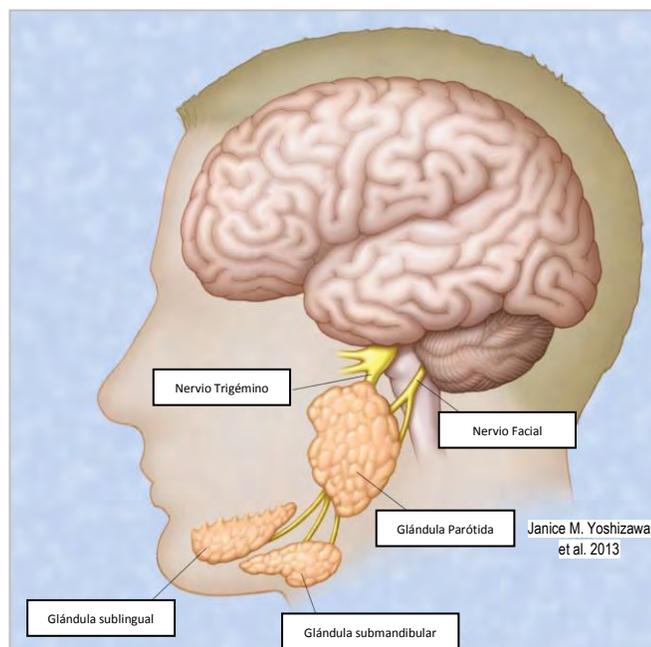


Figura 9. Ubicación bilateral de las glándulas salivales mayores (parótidas, submandibulares y sublinguales) y los nervios encargados de su inervación (trigémico y facial).

Cada glándula salival es altamente permeable y está envuelta por capilares (Figura 10), característica que permite el libre intercambio de moléculas de base sanguínea en las células acinosas productoras de saliva adyacentes. Los investigadores postulan que las moléculas derivadas de la sangre ingresan a los tejidos salivales a través de rutas transcelulares (transporte pasivo y activo) o paracelulares (ultrafiltración extracelular)¹³³ y podrían potencialmente, influir en la constitución molecular de los fluidos orales. Esto sugiere que, los componentes circulantes de la enfermedad absorbidos por las glándulas salivales pueden alterar la composición bioquímica de las secreciones salivales. En consecuencia, los fluidos orales pueden contener información molecular, capaz de comunicar el estado de salud actual de un individuo. Aunque queda mucho por demostrar, este mecanismo hipotético intenta explicar la etiología de los marcadores diagnósticos basados en la saliva.¹³⁴

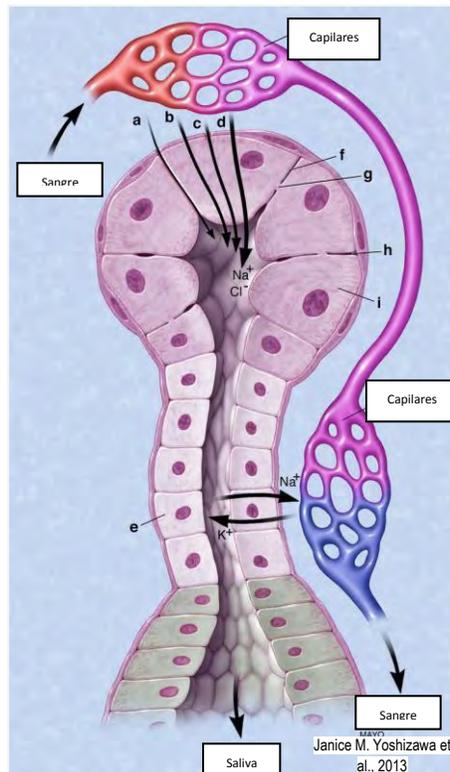


Figura 10. Mecanismo de transporte molecular del suero a los conductos de las glándulas salivales. La imagen muestra la proximidad de una glándula salival importante al sistema vascular. Las glándulas salivales están muy vascularizadas, lo que permite el intercambio de componentes a base de sangre. Las células acinares dentro de las glándulas salivales absorben moléculas de la sangre y secretan jugos salivales en la cavidad bucal. Las alteraciones en la composición molecular de la sangre pueden modificar posteriormente la composición de las secreciones salivales.

Saliva versus sangre

Al igual que la saliva, la sangre es un fluido corporal complejo que se sabe contiene una amplia gama de componentes moleculares, incluidas enzimas, hormonas, anticuerpos y factores de crecimiento.¹³⁵ Mientras que las células, los tejidos, y otras alternativas se persiguen rutinariamente, el suero o plasma sanguíneo es tradicionalmente y, con mayor frecuencia, la fuente de biomarcadores medibles. Los procedimientos necesarios para recolectar y finalmente analizar las muestras de sangre a menudo pueden ser costosos, problemáticos y físicamente intrusivos. El uso de fluidos salivales como medio para el desarrollo y evaluación de biomarcadores presenta una mejor aceptación

del paciente a través de la provisión de un método no invasivo de detección de enfermedades.¹²⁴

Comparativamente, la saliva tiene muchas ventajas sobre la sangre, incluidas las siguientes:

1. La colección es poco exigente. Si bien las muestras de sangre requieren personal altamente capacitado, cualquier persona puede realizar la obtención de saliva, incluida la auto-recolección.
2. El procedimiento no es invasivo. La obtención de muestras es indolora, lo que reduce la incomodidad que la mayoría de las personas padecen como resultado de biopsias y extracciones de sangre repetidas, al mismo tiempo que alienta a otros a participar en evaluaciones médicas y evaluaciones oportunas.
3. Las muestras son más seguras de manejar. Las secreciones salivales contienen factores que inhiben la infectividad del VIH, lo que resulta en tasas de transmisión oral extremadamente bajas o insignificantes.¹³⁶
4. Las muestras son más fáciles de enviar y almacenar. La saliva no coagula y requiere menos manipulación que la sangre.
5. El procedimiento es económico. La saliva se recolecta, envía y almacena fácilmente, lo que reduce los costos generales para los pacientes y los proveedores de atención médica.

Una de sus grandes desventajas y que debe considerarse es que, si bien la mayoría de los analitos detectados en el suero sanguíneo también se encuentran en la saliva, sus niveles disminuyen sustancialmente.¹³⁷ Por ejemplo, en adultos sanos, los niveles de IgG (5 a 30 mg / ml frente a 5 a 30 µg/ ml) e IgM (0,5 a 1 mg / ml frente a 5 a 10 µg / ml) son varias veces más altos que los encontrados en la saliva, pero a la inversa, los niveles de IgA son normalmente de 250 a 500 µg / ml en suero y de 2.5 a 5 mg / ml en saliva.¹³⁸ Aun así, la correlación entre los constituyentes salivales y los basados en la sangre implica que, si bien estos dos biofluidos son separados y únicos, pueden estar vinculados a un nivel molecular. Por lo tanto, es imperativo que exploremos la saliva como una alternativa potencial a los diagnósticos basados en tejidos y en la sangre.

Toxoplasmosis y saliva

Existe muy poca evidencia acerca de estos anticuerpos específicos anti-*T. gondii* en saliva y la mayoría de los estudios están basados en la búsqueda de los anticuerpos de clase IgG en muestras de saliva y suero.

En estudios anteriores se han medido anticuerpos anti-*T. gondii* en saliva, empleando ensayos de aglutinación para identificar IgG, IgM e IgA en individuos infectados en la fase aguda.¹³⁹ En otro estudio se demostró que la IgA de la saliva, a diferencia de IgG, refleja su nivel en suero. Recientemente, la IgG específica se encontró en la saliva de un alto porcentaje (64% y 98%) de los pacientes con VIH/SIDA con encefalitis toxoplásmica, diagnosticados por ELISA y Western blot, respectivamente. Los anticuerpos IgM también se encontraron en el 81% de las muestras de saliva.¹⁴⁰ En otro trabajo se correlacionó IgG en suero con neurotoxoplasmosis, IgA en líquido cefalorraquídeo e IgG en saliva, como posibles marcadores de diagnóstico en la encefalitis toxoplásmica.¹⁴¹ En otro estudio mediante Western blot modificado, fue posible detectar 58 pacientes positivos en saliva, de 59 seropositivos de IgG anti-Toxoplasma.¹⁴²

El estudio de la toxoplasmosis resulta de gran relevancia, ya que es considerada un problema de salud pública, que puede traer consecuencias graves a los pacientes inmunocomprometidos y a los fetos o recién nacidos. En la actualidad existen obstáculos que dificultan el diagnóstico a tiempo de esta parasitosis, pues el costo del examen en suero es alto y la escasa información acerca de las diferentes clases y subclases de anticuerpos no han sido estudiados con relación a la presencia de las diversas manifestaciones clínicas. Actualmente existen escasos reportes que empleen la saliva como una alternativa para el diagnóstico de esta enfermedad.

Con el fin de disponer de evidencia precisa a lo anteriormente expuesto, se realizó el trabajo de investigación “Determinación de anticuerpos específicos de la clase IgA y de las cuatro subclases de IgG en muestras de saliva y suero en individuos

con infección congénita o adquirida por *Toxoplasma gondii* en el que se obtuvieron los siguientes resultados:

Determinación de anticuerpos específicos anti-Toxoplasma gondii en muestras de saliva y suero

Correlación entre muestras de suero y saliva para las clases y subclases de IgG e IgA. Resultados

En el artículo publicado por Cañedo y cols.,¹⁴³ en general no se observó correlación entre muestras de saliva y suero, excepto para los anticuerpos de clase IgG total; lo que significó que, los individuos que fueron positivos para un anticuerpo generalmente fueron negativos o con baja respuesta para los otros anticuerpos, especialmente para los anticuerpos de las subclases IgG2 e IgG4, la mayoría resultaron positivos en saliva, pero negativos o con muy baja respuesta en suero, exceptuando dos casos en la IgG4 (Figura 11). Para la IgA no es sorprendente, pues se sabe que hay producción local en mucosas; pero los resultados de las subclases de IgG sugieren que también hay una respuesta local y que no hay paso de éstas de la mucosa oral hacia el suero (respuesta sistémica).

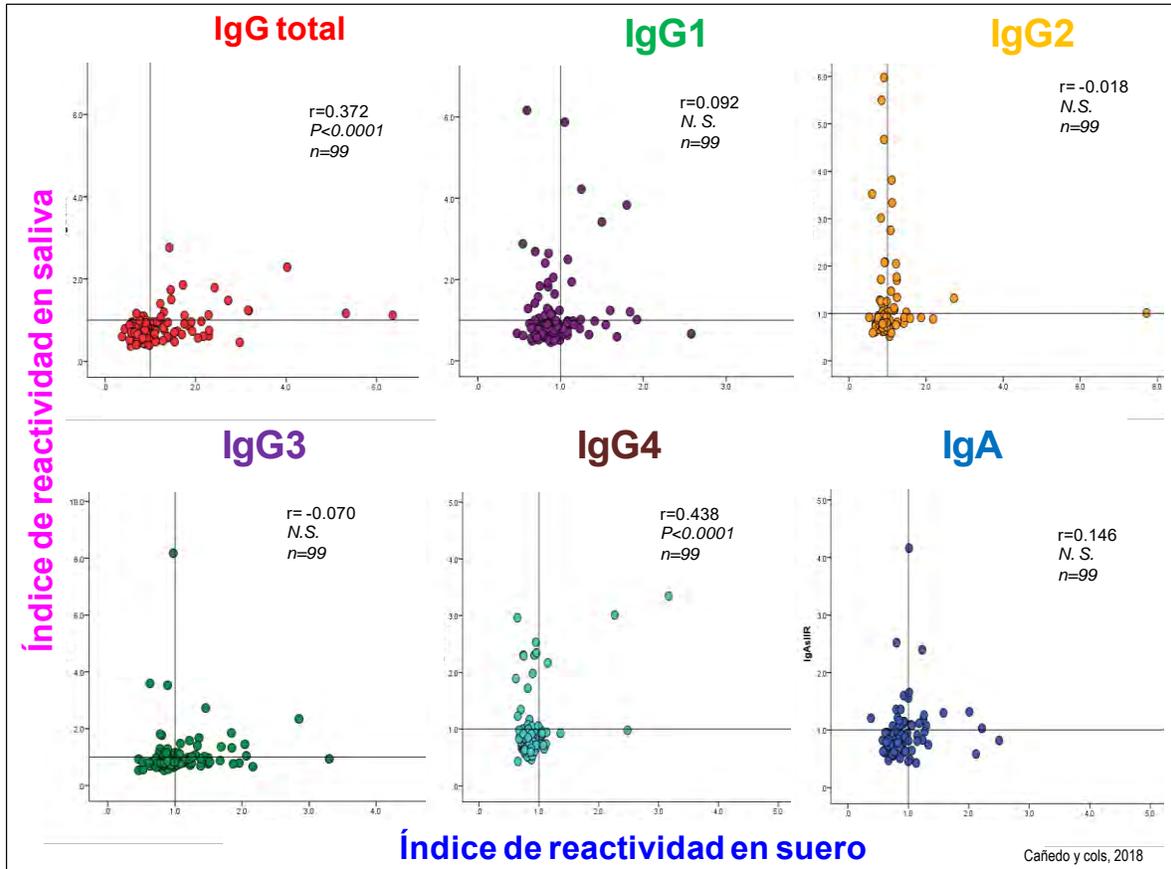
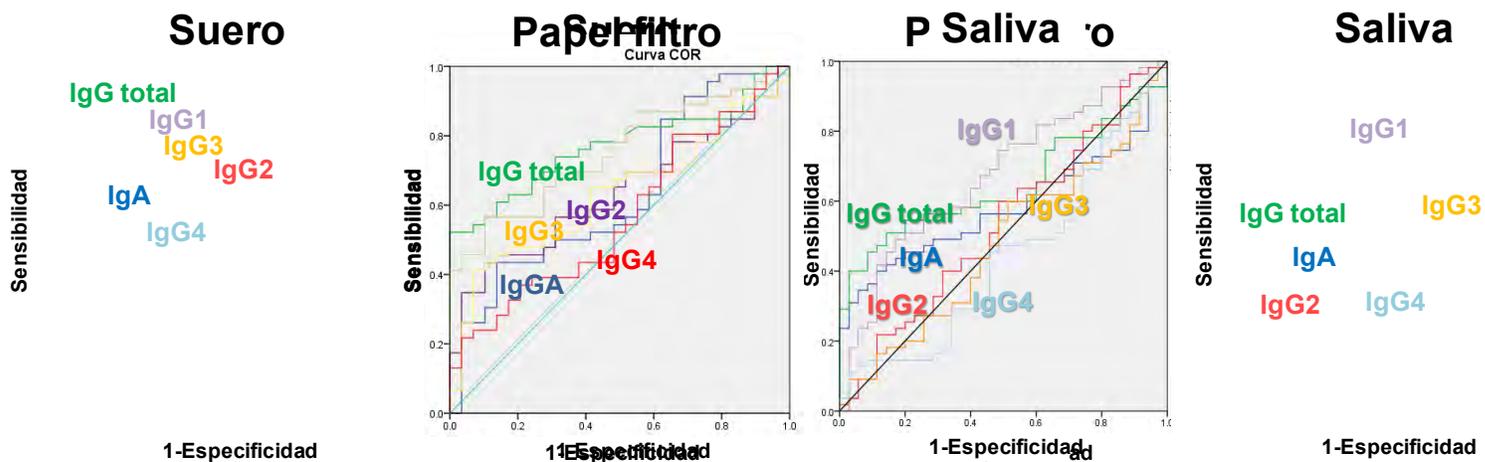


Figura 11. Correlación de los índices de reactividad de los anticuerpos de clase IgA, y las cuatro subclases de IgG específicos, contra *Toxoplasma gondii* en muestras de suero y saliva, determinados por ELISA. Las líneas verticales y horizontales, dentro de cada gráfica, representa los puntos de corte de suero y saliva, respectivamente. $P<0.001$ con significancia estadística. NS = no significativa.

En los siguientes gráficos, se muestran las curvas ROC que se emplearon para determinar la capacidad diagnóstica de infección por *T. gondii* tanto de los anticuerpos de clase IgA, IgG total, como de las cuatro subclases de IgG para cada tipo de muestra. Se puede observar que tanto la IgG total como la IgG1 en suero, tienen un mejor valor diagnóstico usando suero que usando saliva lo que apoya la tesis de este trabajo.



Curvas ROC de los anticuerpos anti-*T. gondii* de clase IgG, IgA, y de las subclases de IgG usando muestras de suero o saliva.

En comparación con la sensibilidad y especificidad de IgG total en suero (73% y 98% respectivamente), la sensibilidad y especificidad en saliva fue de 67% y 60%. (Cuadro 3 y 4) En el Anexo 1 se presenta la metodología y los resultados que soportan ésta investigación. En el Anexo 2 artículo publicado en el 2018.

Cuadro 3. Parámetros Diagnósticos del ELISA para la detección de infección por *T. gondii* con anticuerpos de las clases y subclases de IgG e IgA anti-Toxoplasma en muestras de suero

Marcadores	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Verosimilitud Positiva	Verosimilitud Negativa	Precisión
IgG	0.73	0.98	0.98	0.71	29.2	0.3	83%
IgG1	0.66	0.98	0.98	0.66	26.4	0.3	79%
IgG2	0.37	0.93	0.88	0.50	5.0	0.7	60%
IgG3	0.37	0.90	0.85	0.49	3.7	0.7	59%
IgG4	0.14	0.90	0.67	0.41	1.4	1.0	44%
IgA	0.36	0.90	0.84	0.49	3.6	0.7	58%
IgG1 ó IgG2	0.78	0.90	0.92	0.73	7.8	0.2	83%
IgG1 ó IgG3	0.78	0.90	0.92	0.73	7.8	0.2	83%
IgG1 ó IgG4	0.68	0.88	0.89	0.65	5.6	0.4	76%
IgG1 ó IgA	0.80	0.90	0.92	0.75	8.0	0.2	84%
IgG2 ó IgA	0.61	0.83	0.84	0.59	3.5	0.5	70%
IgG3 ó IgA	0.59	0.83	0.83	0.58	3.4	0.5	69%
IgG2 ó IgG3	0.53	0.88	0.86	0.56	4.2	0.5	67%
IgG2 ó IgG4	0.41	0.85	0.80	0.49	2.7	0.7	59%
IgG4 ó IgA	0.41	0.83	0.77	0.49	2.3	0.7	58%
IgG3 ó IgG4	0.42	0.85	0.81	0.50	2.8	0.7	60%
IgG1 ó IgG2 ó IgG3	0.83	0.88	0.91	0.78	6.6	0.2	85%
IgG1 ó IgG2 ó IgG4	0.86	0.83	0.88	0.80	4.9	0.2	83%
IgG1 ó IgG2 ó IgA	0.88	0.83	0.88	0.83	5.0	0.1	86%
IgG1 ó IgG3 ó IgG4	0.78	0.85	0.88	0.72	5.2	0.3	81%
IgG1 ó IgG3 ó IgA	0.86	0.83	0.88	0.80	4.9	0.2	85%
IgG2 ó IgG3 ó IgG4	0.54	0.83	0.82	0.55	3.1	0.6	66%
IgG2 ó IgG3 ó IgA	0.69	0.80	0.84	0.64	3.5	0.4	74%
IgG3 ó IgG4 ó IgA	0.61	0.78	0.80	0.57	2.7	0.5	68%
IgG4 ó IgA ó IgG2	0.61	0.78	0.80	0.57	2.7	0.5	68%
IgG4 ó IgA ó IgG1	0.80	0.83	0.8704	0.73	4.6	0.2	81%
IgG1 ó IgG2 ó IgG3 ó IgG4	0.83	0.83	0.88	0.77	4.7	0.2	83%
IgG1 ó IgG2 ó IgG3 ó IgA	0.92*	0.80*	0.87	0.86	4.6	0.1	87%
IgG1 ó IgG2 ó IgG4 ó IgA	0.88	0.78	0.85	0.82	3.9	0.2	84%
IgG1 ó IgG3 ó IgG4 ó IgA	0.86	0.78	0.85	0.79	3.8	0.2	83%

Si VPOs =10 son concluyentes , VNEs <1.0 son concluyentes

VPP= ? VPN= ?

Cuadro 4. Valores Diagnósticos del ELISA para la detección de infección por *T. gondii* con anticuerpos de la clase IgA y las subclases de IgG anti-Toxoplasma en muestras de saliva

Marcadores	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Verosimilitud Positiva	Verosimilitud Negativa	Precisión
IgG	0.27	1.00	1.00	0.48	0.0	0.7	56%
IgG1	0.33	0.83	0.74	0.45	1.9	0.8	53%
IgG2	0.28	0.75	0.63	0.41	1.1	1.0	47%
IgG3	0.27	0.70	0.57	0.39	0.9	1.0	44%
IgG4	0.13	0.80	0.50	1.64	0.7	1.1	40%
IgA	0.37	0.93	0.88	0.49	4.9	0.7	59%
IgG1 ó IgG2	0.48	0.70	0.71	0.47	1.6	0.7	57%
IgG1 ó IgG3	0.47	0.65	0.67	0.45	1.3	0.8	54%
IgG1 ó IgG4	0.38	0.70	0.66	0.43	1.3	0.9	51%
IgG1 ó IgA	0.58	0.75	0.78	0.55	2.3	0.6	65%
IgG1 ó IgG2 ó IgG3	0.52	0.63	0.67	0.46	1.4	0.8	56%
IgG1 ó IgG2 ó IgG4	0.48	0.63	0.66	0.45	1.3	0.8	54%
IgG1 ó IgG2 ó IgA	0.65	0.63	0.72	0.54	1.7	0.6	64%
IgG1 ó IgG3 ó IgG4	0.47	0.58	0.62	0.42	1.1	0.9	51%
IgG1 ó IgG3 ó IgA	0.67*	0.60*	0.71	0.55	1.7	0.6	64%
IgG1 ó IgG4 ó IgA	0.60	0.63	0.71	0.51	1.6	0.6	61%
IgG1 ó IgG2 ó IgG3 ó IgG4	0.52	0.55	0.63	0.43	1.1	0.9	53%
IgG1 ó IgG2 ó IgG3 ó IgA	0.68	0.58	0.71	0.55	1.6	0.6	64%
IgG1 ó IgG2 ó IgG4 ó IgA	0.65	0.55	0.68	0.51	1.4	0.6	61%
IgG1 ó IgG3 ó IgG4 ó IgA	0.67	0.53	0.68	0.51	1.4	0.6	61%

Si VPOs =10 son concluyentes , VNEs <1.0 son concluyentes

VPN=? VPP = ?

En estudios previos ya se han demostrado la presencia de anticuerpos específicos de las clases IgG, IgM e IgA en muestras de saliva, en algunos de estos estudios los niveles de IgA e IgG salival reflejan los del suero, pero con valores de sensibilidad y especificidad bastante bajos como los encontrados en este último estudio.^{139 140 142 144 145} Este trabajo fue el primero en estudiar anticuerpos específicos de las subclases de IgG en saliva, para establecer los parámetros de diagnóstico se utilizó la clase IgG total en suero como estándar de referencia ¹⁴⁵ los resultados mostraron mayor correlación con el anticuerpo IgG1 presente en suero. Los anticuerpos de clase IgG1 presentes en saliva arrojaron un mejor resultado para diagnosticar una infección que los anticuerpos de clase IgG total salivales en contraste con el estándar de referencia, aunque con una sensibilidad baja. Esto pudiera ser respuesta a que la IgG1 es la subclase predominante en el suero y pudiera reflejarse también en la saliva.^{61 107} Los valores de sensibilidad fueron bajos (0.36) para las clases de IgA y todas las subclases de IgG de forma individual. A pesar de que las combinaciones de varias subclases brindan mejores parámetros de diagnóstico, su uso combinado resultaría en una tecnología costosa y la necesidad de una muestra de saliva mayor.

Los resultados muestran que la mayoría de los casos que en saliva tenían presencia de anticuerpos específicos de IgG2, IgG3 e IgG4 presentaron una respuesta negativa en suero. Tomando en cuenta que *Toxoplasma gondii* se adquiere por vía oral, excluyendo a la infección congénita y las formas adquiridas por trasplante o de manera accidental ¹⁶; la presencia de anticuerpos en la saliva puede ser el resultado de la exposición local al parásito sin desarrollar una infección sistémica. En general, los resultados muestran un perfil de subclase de IgG diferencial entre la saliva y el suero, no explorado previamente. Estos resultados pueden sugerir un papel importante del sistema inmunitario oral, probablemente al limitar la infección sistémica por *T. gondii*, ésto siendo relevante para ser corroborado en próximos estudios.

Las conclusiones a las que se llegó en este estudio fueron que: se reportaron baja sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las muestras de saliva frente a las muestras de suero en el diagnóstico de toxoplasmosis congénita o adquirida. Los valores de sensibilidad fueron bajos (0.36) para las clases de IgA y todas las subclases de IgG de forma individual. A pesar de que las combinaciones de varias subclases brindan mejores parámetros de diagnóstico, su uso combinado resultaría en una tecnología costosa y la necesidad de una muestra de saliva mayor. También se observaron que la mayoría de los casos que tenían presencia de anticuerpos específicos de IgG2, IgG3 e IgG4 en saliva, presentaron una respuesta negativa en suero. Tomando en cuenta que *Toxoplasma gondii* se adquiere por vía oral, excluyendo a la infección congénita y las formas adquiridas por trasplante o de manera accidental la presencia de anticuerpos en la saliva puede ser el resultado de la exposición local al parásito sin desarrollar una infección sistémica. Lo que sugiere que existe una respuesta inmune local, distinta a la sistémica en un mismo individuo.

III. CONCLUSIÓN

En general, la información presentada en este trabajo propone que la muestra de saliva sigue siendo una alternativa a la muestra de sangre para el diagnóstico de diversas enfermedades con buenos resultados, en el caso de la infección congénita o adquirida por toxoplasma gondii los resultados no fueron favorables para su empleo como método diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo la información obtenida de los resultados es que muestran un perfil de subclase de IgG diferente entre la saliva y el suero, no explorado previamente. Esto pudiera sugerir un papel importante del sistema inmunitario oral, probablemente al limitar la infección sistémica por *T. gondii*. Siendo necesario diseñar nuevos estudios que aporten un mayor nivel de evidencia, con criterios de selección más estrictos, como estudios de casos y controles o de cohorte.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Los pocos hallazgos encontrados en la literatura. En las investigaciones analizadas, no se encuentra un gran sustento relacionada con la búsqueda de anticuerpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* presentes en la saliva, ya que se encuentran basados en estudios transversales con muestras por conveniencia, presentando limitaciones en la documentación de los resultados de la prueba, ya que éstos son distintos en sujetos sin y con la presencia de Toxoplasmosis. Por lo que se recomienda realizar estudios con otros diseños y con un tamaño de muestra mayor, generando resultados más precisos.

Posibles sesgos que pueden afectar la evaluación de la saliva como método diagnóstico, ya que las investigaciones previas presentan variabilidad metodológica relacionada con la muestra y su procesamiento (congelación y/o mantenimiento a diferentes temperaturas); variabilidad metodológica relacionada con las técnicas empleadas en el laboratorio para su determinación (método de medida, precisión del método). Siendo esto fundamental a tomarse en cuenta en las condiciones de recolección de las muestra de saliva, han de estar perfectamente protocolizadas y estandarizadas, para asegurar que las condiciones sean óptimas en estudios subsecuentes.

ANEXO 1

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

“Determinación de anticuerpos específicos de la clase IgA y de las cuatro subclases de IgG en muestras de saliva y suero en individuos con infección congénita o adquirida por *Toxoplasma gondii*”

OBJETIVO GENERAL

Comparar la presencia de anticuerpos específicos de clase IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 entre muestras de saliva y suero, de recién nacidos infectados congénitamente, e individuos con infección adquirida por *Toxoplasma gondii*.

Objetivos específicos

- Determinar la presencia de anticuerpos específicos IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en muestras de saliva y en suero por medio de ELISAs, en pacientes diagnosticados con toxoplasmosis, en el Laboratorio de inmunología experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP).
- Determinar la correlación de los anticuerpos de IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 entre saliva y suero de pacientes con toxoplasmosis.

Tipo de estudio

Estudio transversal.

Aspectos éticos

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud de México con número de registro 060/211 y apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 181175).

Ubicación del estudio

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Criterios de selección

Criterios de inclusión: individuos con infección congénita o adquirida por *T. gondii* de cualquier edad y sexo, confirmados por pruebas de laboratorio con o sin síntomas/signos clínicos, que aceptaron participar en el estudio o, cuyos padres o tutores autorizaron la inclusión, en caso de menores de edad.

Criterios de exclusión: Se excluyeron todos aquellos individuos que presentaron infecciones por otras causas, hipertensión o diabetes.

Tamaño de la muestra

Se estudiaron 99 casos. Los pacientes involucrados en este estudio, provinieron del proyecto “Tamiz pre y posnatal de infección congénita en la Ciudad de México” y, fueron atendidos en los respectivos centros de referencia: Hospital Gea González, Hospital Naval de Especialidades, Instituto Nacional de Perinatología e Instituto Nacional de Pediatría. Los casos estudiados, fueron reclutados durante 2 años, posterior a un tamizaje inicial de los hospitales de referencia o, como confirmación de casos clínicos, presentados en el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, los cuales cumplían con los criterios de inclusión establecidos. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la institución y se cuenta con el consentimiento informado de todos los participantes en este estudio.

Estrategia del estudio

Se trabajaron muestras de niños y adultos con infección congénita o adquirida por *T. gondii*, obtenidos de manera prospectiva, anidada al proyecto “Tamiz pre y posnatal de infección congénita en la Ciudad de México”, o por necesidades de confirmación de diagnóstico para su atención médica. Se buscaron anticuerpos de clase IgA, IgG total y de las subclases IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 mediante un ELISA indirecto, como se indica en la Figura 1. Previa estandarización de las técnicas de ELISA para la detección de cada anticuerpo específico anti-Toxoplasma, en ambos tipos de muestra (suero y saliva). Se realizó el análisis de las muestras en el Laboratorio de Inmunología Experimental.

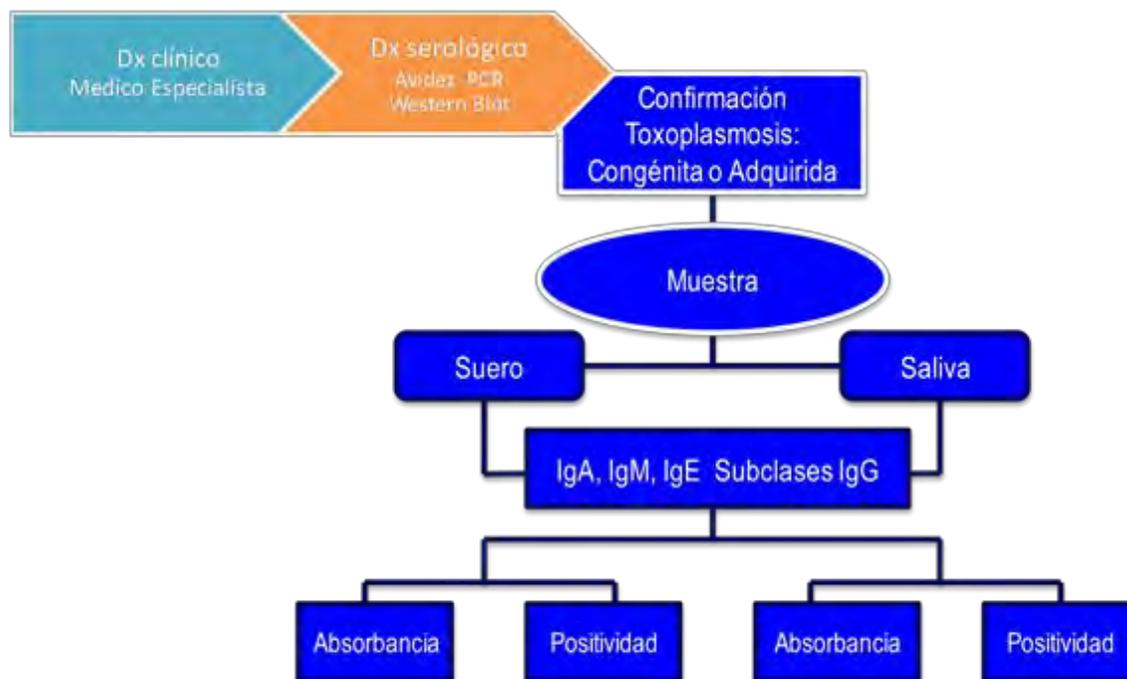


Figura 1. Estrategia del estudio

Métodos de laboratorio

Población y muestras biológicas

Se estudiaron 99 sujetos, 90 mujeres (edad media de 30.9), de las cuales 77 estaban embarazadas y 9 hombres (edad media de 30.2). Las muestras fueron analizadas y clasificadas a partir de pruebas estandarizadas de laboratorio, para la detección y confirmación de infección por *T. gondii*:

- a) ELISA indirecto para anticuerpos IgG en suero
- b) Western blot para IgG e IgM
- c) PCR en tiempo real punto final

Obtención del antígeno

El antígeno usado para el ELISA se produjo a partir de los parásitos obtenidos del exudado peritoneal de los ratones de la cepa RH, se resuspendieron en solución de NaCl 0.15 M, amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.4 y se centrifugó a 1,200 rpm /5 min, para quitar detritus celular, si era necesario, se centrifugaba a baja velocidad hasta obtener un grado de pureza >90% de los taquizoítos. Se resuspendieron en una solución comercial (Sigma®) que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Dentro de un recipiente con hielo se sonicaron 3 veces a 7 hz, por periodos de 1 minuto, con descansos intermedios de 5 minutos. Después del sonificado se centrifugó a 10,000 rpm x g durante 1 hora a 4° C, el sobrenadante se fraccionó y se almacenó a -70° C hasta su uso. Se cuantificó la concentración de las proteínas por el método de Bradford con el reactivo comercial de Bio-Rad.¹⁴⁶

Obtención y procesamiento de las muestras

Procesamiento previo de las muestras para la detección de los anticuerpos específicos

Fueron recolectadas muestras pareadas de suero y saliva de cada individuo: para la muestra de sangre se tomaron 3ml de sangre por medio de venopunción y 3ml

de la muestra de saliva recolectada en tubos de plástico con tapa plástica con inhibidores de proteasas. En el caso de los bebés, la toma de la muestra de saliva fue asistida con una perilla estéril o pipeta de plástico, fueron fraccionadas con inhibidores de proteasas y conservadas ambos tipos de muestras a -20°C hasta su análisis.

Determinación de anticuerpos específicos de *Toxoplasma gondii*

ELISA indirecto para muestra de suero:

Para determinar anticuerpos de clase IgG total y subclases IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA específicos anti-*T. gondii* en el suero, se utilizó el siguiente procedimiento: 1) En placas de ELISA de polipropileno (Maxisorb, Nunc, Roskilde, Denmark)® se colocaron 100 µL/pozo del antígeno de *T. gondii* a una concentración de 5 µg/mL en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.0, y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. 2) Los lavados se realizaron 5 veces con 200 µL/pozo de PBS con tween 20 (PBS-T), al 0.05% v/v durante 5 minutos. 3) Se incubaron con albúmina bovina al 1.0% en PBS-T durante 30 min, a temperatura ambiente. 4) Después de lavar 5 veces, se incubaron por duplicado los sueros problema (diluidos a 1:500 en PBS-Tween 20) durante 2 horas a 37° C. 5) Se prosiguió lavando la placa 5 veces, añadiendo 100 µL/pozo del anticuerpo conjugado correspondiente (se usaron anticuerpos monoclonales biotinilados comerciales (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA®) para las diferentes clases y subclases conjugados a peroxidasa, (anti- IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA) a la dilución óptima establecida en ensayos de titulación previos mostrados en el cuadro 2. 6) Se incubaron durante 2 horas a 37° C. 7) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, fue lavada la placa 3 veces con PBS-T y 2 veces con PBS. 8) Para todas las subclases de IgG, se realizó un paso final con estreptoavidina con peroxidasa de (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA®). 9) La actividad enzimática fue revelada con 4 mg de O-fenilendiamina/H₂O₂, se diluyó en un amortiguador que contiene, 10 ml sol. de ácido cítrico, de sol. de citratos 0.1M: 4 µL de H₂O₂ al 30. 10) Se incubaron durante un máximo de 30 min, después de lo

cual se detuvo la reacción con 50 μL de H_2SO_4 2N. 11) Finalmente, se dio lectura a la placa en un lector de ELISA a una absorbancia de 490 nm.

ELISA indirecto para muestra de saliva:

Las muestras de saliva se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se fraccionaron en dos tubos, para ser almacenados a -20°C hasta su análisis.¹⁴⁷

Para determinar anticuerpos de clase IgG total y subclases IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA específicos anti-*T. gondii* en la saliva, se utilizó el siguiente procedimiento: 1) Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 100 μL /pozo de anti-Ig humana a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como control positivo de reacción (directo) de la placa, utilizando saliva sin diluir, 100 μL /pozo en amortiguador de boratos y como control negativo de la placa (blanco) se usó el amortiguador sólo (100 μL /pozo); la placa se incubó a 4°C toda la noche. 2) La placa fue lavada al siguiente día con PBS-Tween 20 al 0.5% y PBS. Los lavados se realizaron 5 veces con 200 μL /pozo de PBS con tween 20 (PBS-T), al 0.05% v/v durante 5 minutos. 3) se bloqueó la placa con 200 μL /pozo de albumina al 1% diluida en PBS-Tween 20, se incubó a 37°C por 30 minutos. Se lavó nuevamente la placa como se menciona en el paso número 2. Se realizó una dilución 1:50 de cada muestra de saliva en PBS-Tween 20 y se colocaron 100 μL /pozo por duplicado de cada muestra en la placa; se incubó nuevamente a 4°C toda la noche o a 37°C durante 2 horas. Se lavó la placa tal y como se menciona en el paso número 2. Se realizó la dilución correspondiente a cada conjugado anti-Ig humana con peroxidasa en PBS-Tween 20, concentraciones mostradas en cuadro 2, y se agregó 100 μL /pozo en la placa, se incubó a 37°C durante dos horas. Pasadas las dos horas, se prosiguió con el lavado de la placa, como se menciona en el paso número 2. Se reveló la placa con la solución de cromógeno sustrato: 5 mL de citrato de sodio + 5 mL de ácido cítrico + 4 μL de peróxido de hidrógeno + $\frac{1}{2}$ tableta de OPD (orto-fenil-diamino). Finalmente, se agregó 100 μL /pozo de la solución de revelado en la placa y se dejó en la oscuridad. Cuando viró el color se detuvo la reacción colocando 50

µL/pozo de solución de ácido sulfúrico y se dio lectura a la placa en el lector de ELISA a 490 nm.

El punto de corte por ensayo, fue calculado mediante la media de las absorbancias de 3 controles negativos más tres desviaciones estándar. Los resultados de las absorbancias, fueron expresados por el índice de Reactividad (IR), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IR = \text{absorbancia de la muestra} / \text{el valor del punto de corte}$$

Para el punto de corte final, se realizaron curvas ROC para cada tipo de muestra e inmunoglobulina.

Variables del estudio

En el siguiente cuadro se concentran las variables dependientes e independientes empleadas en este estudio

Cuadro 1. Variables del estudio

Variable independiente			Variable dependiente correspondiente		
Nombre de variable	Tipo de variable	Unidad de medición	Nombre de variable	Tipo de variable	Unidad de medición
Infección congénita	Dicotómica	Sí/No	Presencia de anticuerpos de (clase/subclase)	Dicotómica	Sí/No
Infección adquirida	Dicotómica	Sí/No	Presencia de anticuerpos de (clase/subclase)	Dicotómica	Sí/No
Problemas clínicos	Dicotómica	Sí/No	Presencia de anticuerpos de (clase/subclase)	Dicotómica	Sí/No
Absorbancia en suero	Numérica continua	0.0-3.0	Absorbancia en saliva	Numérica continua	0.0-3.1

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa SPSS 21. Los valores de absorbancia de anticuerpos de cada clase o subclase, se correlacionaron entre la saliva y el suero, por medio de regresión lineal, usando la R de Pearson como prueba de hipótesis. La concordancia del resultado final (positivo/negativo) se midió, usando coeficiente Kappa. Se emplearon curvas ROC, para determinar la capacidad diagnóstica de infección, por *T. gondii* de los anticuerpos de clase IgA, IgG total, así como de las cuatro subclases de IgG, para cada tipo de muestra. Se usó χ^2 para identificar asociación entre las variables considerando una $P \leq 0.05$ como significativa.

Estandarización de los ELISAs para detectar anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en muestras pareadas de suero y saliva

Con el propósito de determinar las diluciones adecuadas, para cada tipo de muestra (suero o saliva) y de los conjugados, se probaron distintas diluciones, quedando finalmente las diluciones como se describen en el cuadro 2, se utilizaron muestras pareadas de suero y saliva de 20 individuos, de los cuales, 7 eran positivos en suero a anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*, y 13 negativos, previamente probados por ELISA indirecto para anticuerpos IgG en suero y confirmados por Western blot para IgG e IgM y PCR en tiempo real punto final.

Cuadro 2. Que muestra las diluciones utilizadas para cada tipo de muestra y los conjugados, así como los puntos de corte que se determinaron en la estandarización del estudio por medio de curvas ROC.

Inmuno-globulina	Tipo de muestra	Dilución muestra	Dilución conjugado	Punto de Corte
IgA	Suero	1:125	1:1000	0.241
	Saliva	1:8	1:500	0.374
IgG	Suero	1:500	1:10000	0.325
	Saliva	1:2	1:250	0.367
IgG1	Suero	1:125	1:2000	0.320
	Saliva	directa	1:500	0,240
IgG2	Suero	1:125	1:2000	0.271
	Saliva	directa	1:500	0,320
IgG3	Suero	1:125	1:2000	0.285
	Saliva	directa	1:500	0,270
IgG4	Suero	1:125	1:2000	0.283
	Saliva	directa	1:500	0,350

El coeficiente de variación inter-técnico alcanzó un valor de Kappa de 0.9, con un coeficiente de variación inter-ensayo de 0.06 a 0.10.

Estandarización del ELISA para la detección de IgG total (IgGt) anti-*T. gondii* en muestras de suero y saliva

Se probaron las siguientes condiciones:

- a) Dos concentraciones del antígeno de *Toxoplasma* a 2µg/mL y 5µg/mL para muestras de saliva a una dilución 1:2 y suero a una dilución 1:500. En la Figura 2 a y b, se pudo observar que en las muestras de suero, no existieron diferencias en los valores de absorbancia entre las dos concentraciones del antígeno, tanto en las muestras positivas 1, 2 (recuadro rojo) como negativas 3-6 (recuadro azul). En cambio, en las muestras de saliva, la concentración de 5µg/ml del antígeno los valores aumentaron, en general, incluyendo el fondo que presentan los casos negativos. Dados los resultados con las muestras positivas, se decidió utilizar la concentración de antígeno de 5µg/ml, para ambas muestras.

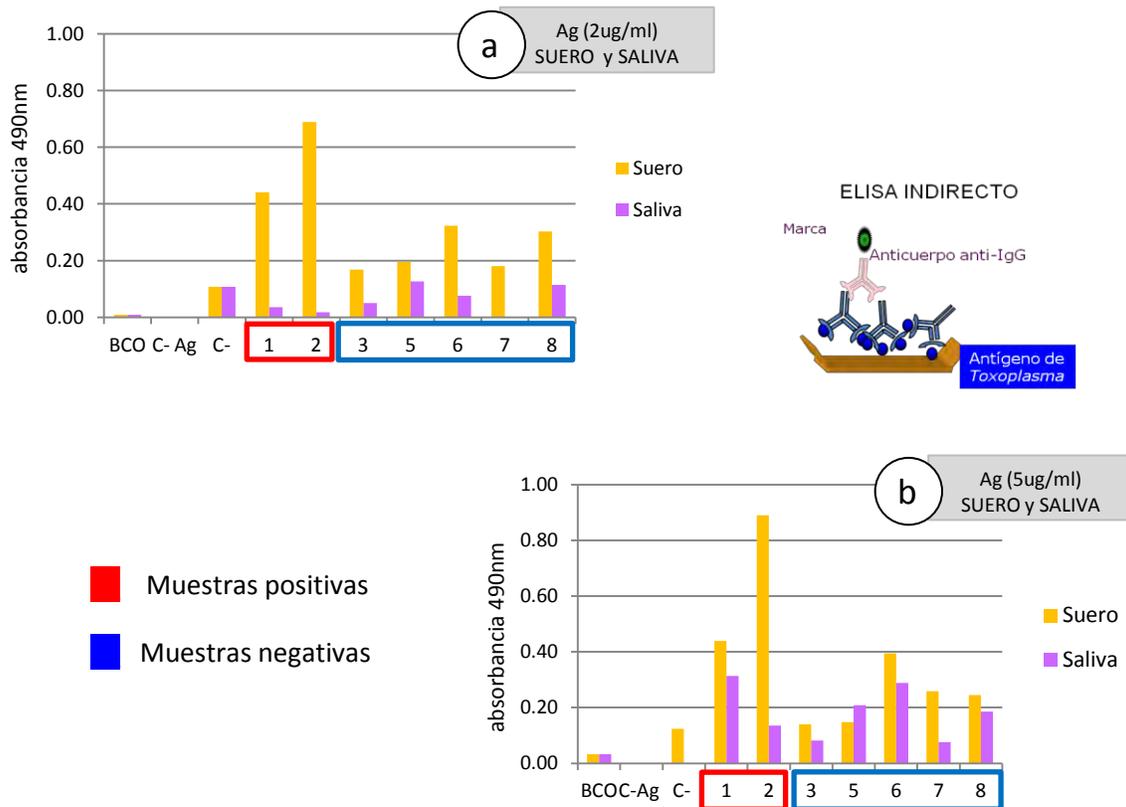


Figura 2. Resultados de la concentración de antígeno con muestras de saliva y suero, a dos concentraciones: a) 2 µg/ml y b) 5 µg/ml

b) Se probó la dilución ideal, para el conjugado anti IgG humana, fijado a peroxidasa: 1:2500, 1:5000, 1:10 000, 1:20 000, 1:40 000 en muestras de suero. Para este ensayo, se probaron tres sueros positivos (alto, medio y bajo) y tres sueros negativos (alto, medio y bajo) a una dilución de 1:500; para la determinación de la mejor dilución del conjugado anti-IgG en suero se tomó como referencia la distancia que hay entre el suero positivo bajo y el suero negativo alto (Figura 3). Se escogió como la mejor dilución la de 1:10 000. A una concentración del antígeno de 5 µg/ml.

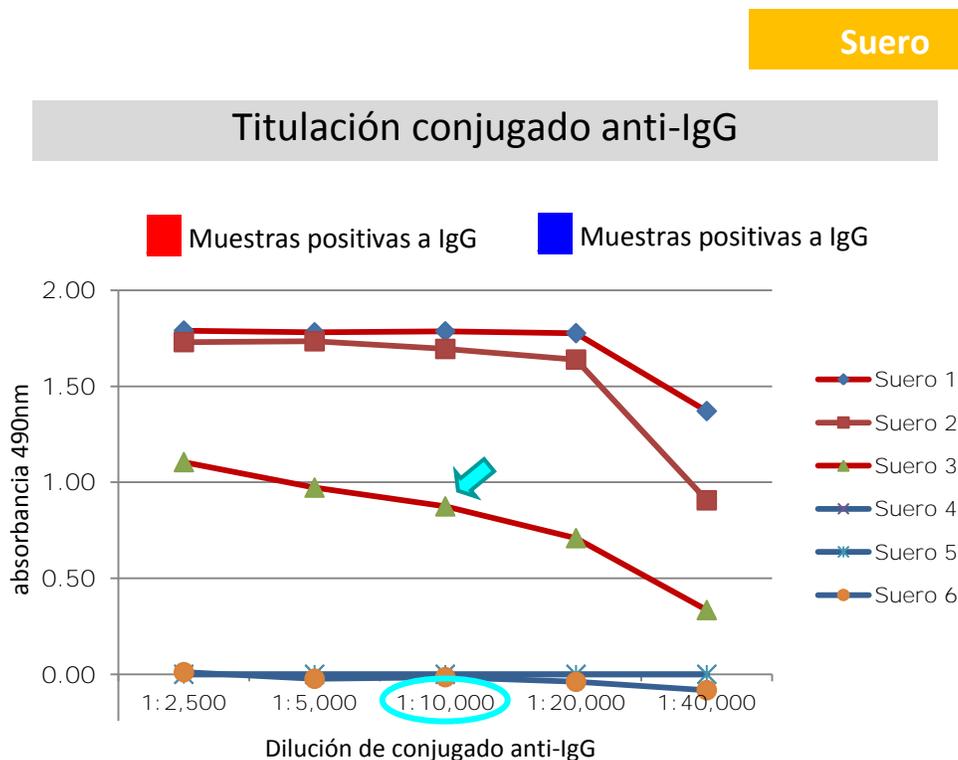


Figura 3. Titulación del conjugado anti-IgG humana para determinación de concentración de éste, en sueros controles (positivos y negativos) a anticuerpos IgG.

Las mejores condiciones, para distinguir entre un suero positivo y uno negativo son: antígeno 5µg/mL; suero: 1:500, la cual se eligió, por la experiencia previa del Laboratorio de Inmunología Experimental del INP; conjugado 1:10 000. Los resultados se muestran en la Figura 4.

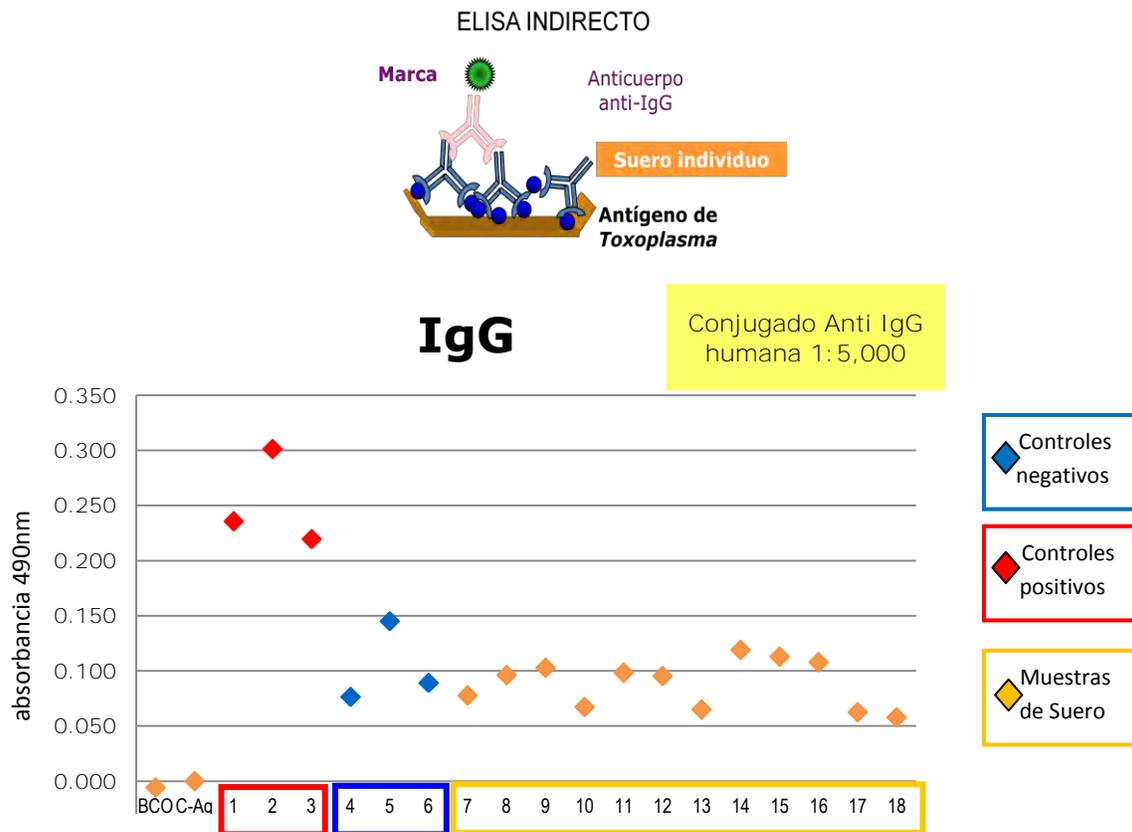


Figura 4. Resultados de la estandarización del ELISA para detección de IgG anti *T. gondii* en el que se diferencian los sueros positivos: 1, 2, 3; de los negativos: 4, 5, 6 y muestras de suero de individuos probadas.

ELISA para detección de IgG total (IgGt) específica anti-*T. gondii* en muestras de saliva

Se probaron las siguientes condiciones:

- a) Antígeno a concentración de 2µg/mL y 5µg/mL. Se determinó que la mejor concentración es 5µg/ml con base en los resultados mostrados en la Figura 12, se decidió probar el antígeno a 5µg/mL para el siguiente ELISA, la cual, se probaron dos diluciones de la saliva.
- b) Se probó muestras de saliva diluida 1:2 y 1:4.

Se escogió la dilución de 1:2 ya que en los resultados de los ensayos, se encontraron más separadas las salivas positivas de las negativas que en la dilución 1:4 (Figura 5)

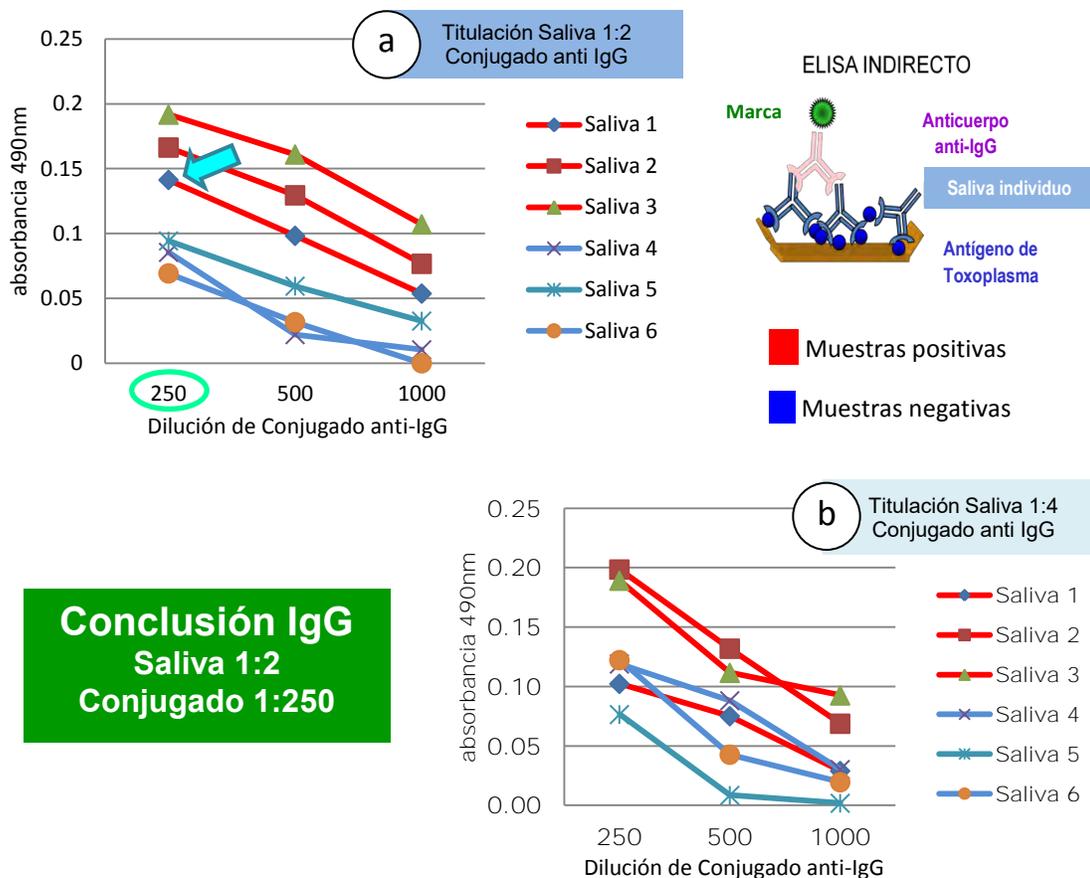


Figura 5. Titulación del conjugado anti-IgG humana para determinación de concentración de éste, en salivas controles (positivos y negativos) a anticuerpos específicos anti-IgG a dos diluciones de la saliva: a) 1:2 y b) 1:4

Además se probaron diferentes diluciones del conjugado anti IgG humana fijado a peroxidasa, diluido: 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000. Se eligió la dilución del conjugado: 1:250 por las razones ya expuestas. Podemos concluir que, las mejores condiciones, para distinguir, entre una saliva positiva y una negativa son: antígeno 5µg/mL; saliva: 1:2 y conjugado 1:250.

Estandarización del ELISA para la detección de IgA específica anti-*T. gondii* en muestras de suero

Se probaron las siguientes condiciones:

Para estandarizar el ELISA se escogieron tres muestras de suero que fueran confirmadas previamente positivas y tres negativos a IgG anti-Toxoplasma, ya que

la IgG es uno de los anticuerpos que se buscan de primera instancia. Se busca la presencia de anticuerpos específicos IgA anti-Toxoplasma en los sueros positivos a IgG y confirmar su ausencia en los negativos a IgG. Pues no se contaba con sueros con ésta clase de anticuerpo para ser utilizados como controles (Figura 6). Las mejores condiciones, que permiten distinguir entre un suero positivo y negativo son: antígeno 5µg/mL; suero: 1:125; conjugado 1:500.

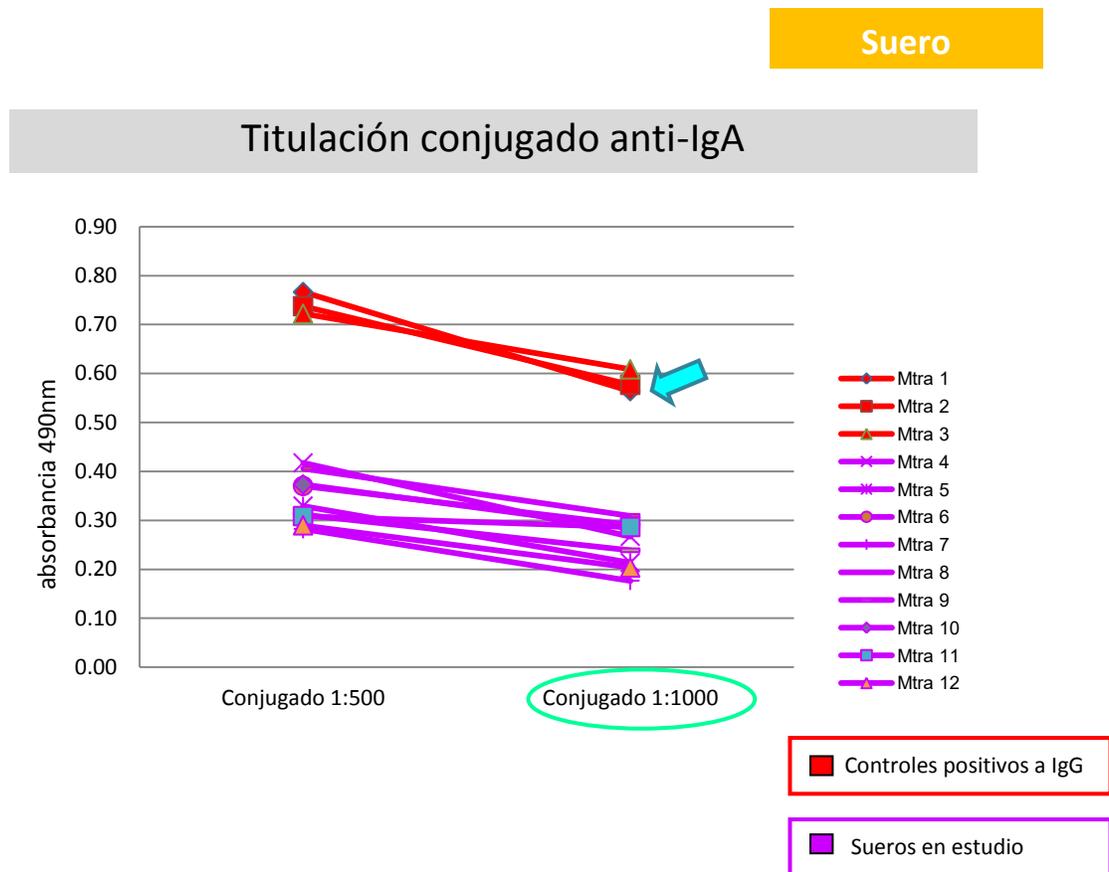


Figura 6. Resultados de la estandarización del ELISA para detección de IgA anti *T. gondii* en suero. Mtra 1-3 = Sueros controles positivos a IgG y Mtra 4-12: Muestras de sueros de individuos en estudio.

ELISA para la detección de IgA específica anti-*T. gondii* en muestras de saliva

Se probaron las siguientes condiciones: Antígeno a concentración de 5µg/mL; saliva: sin diluir (directa), diluido: 1:4 y 1:8. Conjugado anti IgA humana fijado a

peroxidasa, diluido: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000. Las salivas que se emplearon para este ensayo, fueron tres positivas a IgG en suero y tres negativas.

Las mejores condiciones de la concentración del antígeno que permitió distinguir entre una saliva positiva y una negativa a IgA específica anti-*T. gondii* son: antígeno 5µg/mL (Figura 7).

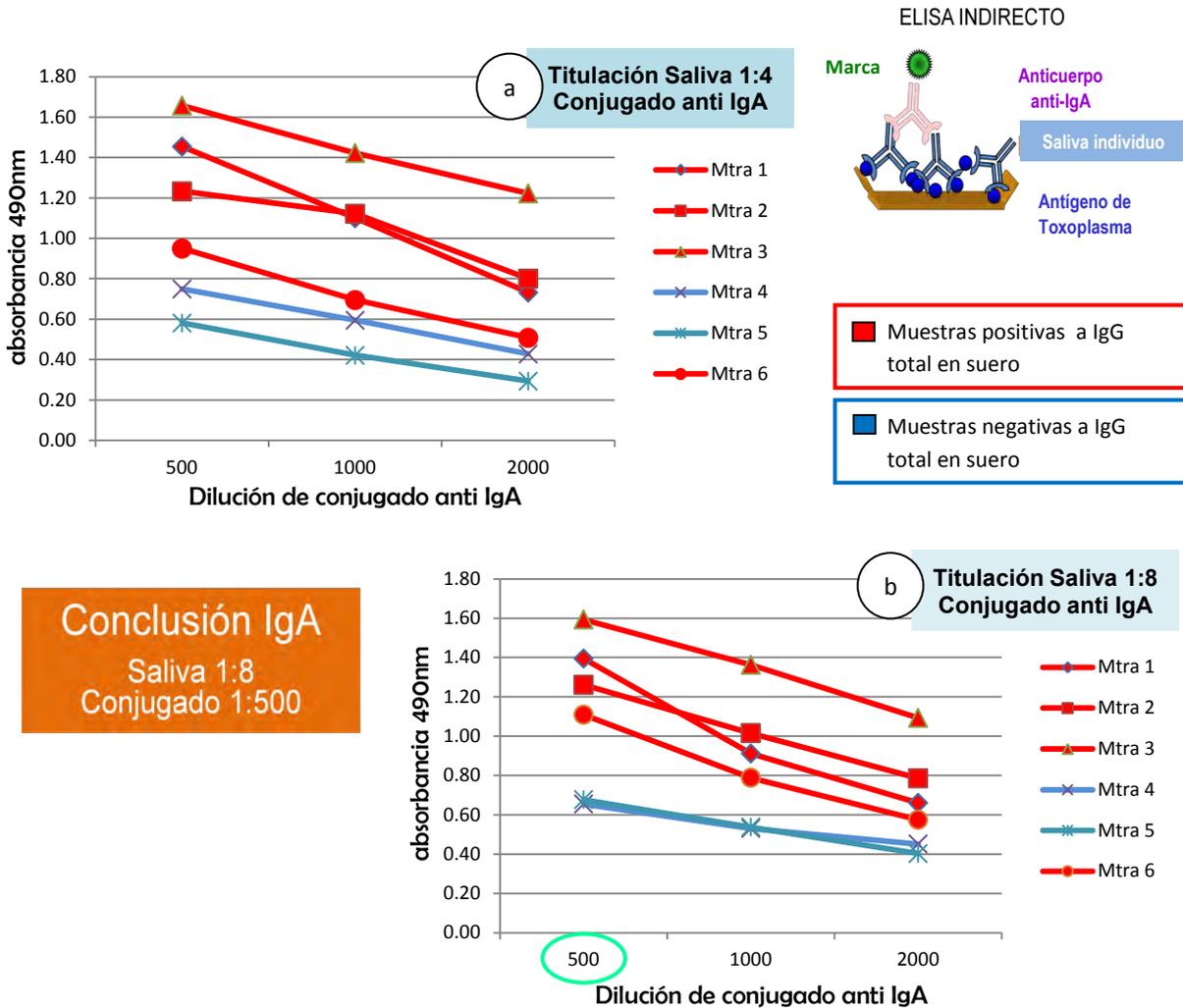


Figura 7. Titulación del conjugado anti-IgA humana para determinación de concentración de éste, en salivas controles (positivos y negativos) a anticuerpos específicos anti-IgA a dos diluciones de la saliva: a) 1:4 y b) 1:8

Bajo las condiciones anteriormente expresadas, en total se estudiaron 99 individuos, 90 mujeres (edad promedio=30.9) y 9 hombres (edad promedio=31.2). Del grupo de mujeres 77 embarazadas, 51 positivas (66.3%) y 26 negativas (33.7%), de las cuales, 39 (50.6%) estaban en el primer tercio de la gestación.

ANEXO 2

What do anti-*Toxoplasma gondii* IgA and IgG subclasses in human saliva indicate?

I. Cañedo-Solares¹ | F. Gómez-Chávez^{1,2}  | H. Luna-Pastén¹ | L. B. Ortiz-Alegria¹ |
Y. Flores-García¹ | R. Figueroa-Damián³ | C. A. Macedo-Romero¹ | D. Correa¹  1 2

¹Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

²Cátedras CONACyT, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México

³Servicio de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

Correspondence

Dolores Correa, Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México.
Email: mariadol@yahoo.com

Present address

Y. Flores-García, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Malaria Research Institute, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MA, USA

Funding information

This work had support from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT, grant No. 181175) and Federal Funds from INP (No. 078/2012).

1 | INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a cosmopolitan, water/food-borne infection caused by *Toxoplasma gondii*.¹ In immunocompetent individuals, it is regularly asymptomatic and self-limiting, but clinical problems arise in immunocompromised persons, such as HIV patients or congenitally infected newborns. This is because the immune system maintains the homeostasis in this host-parasite relationship.^{2,3} In fact, many components of the innate and adaptive responses are involved in the control of parasite proliferation, including antibodies (abs) which fix complement, facilitate phagocytosis of the parasite by opsonization (human IgG1/IgG3) or neutralize cell invasion. However, abs in

Summary

Diagnostic tests for toxoplasmosis are based on serological techniques due to their high sensitivity. Some IgG subclasses are related to clinical outcome in the congenital form. In this work, we determined the levels of IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired saliva and serum samples from 91 women by indirect ELISA using a crude extract of the RH strain. The levels of IgA, IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies and, to a lesser extent, IgG1 did not correlate between saliva and serum, that is, most cases that were positive for 1 Ig class in 1 sample were negative or very low in the other, and vice versa. We also observed that most samples of saliva that were positive for 1 IgG subclass were also positive for at least 2 of the other 3; this contrasted with findings in serum, wherein each person was positive almost exclusively for 1 subclass, as demonstrated before by us and other researchers. Although these findings are disappointing for the use in diagnosis, the richer response in saliva might indicate local exposure to *T. gondii* antigens without systemic infection; thus, saliva might be reflecting a local (protective?) response against this protozoan.

KEYWORDS

antibodies, IgA, IgG subclasses, saliva, *Toxoplasma gondii*

serum can also be neutral, such as IgG2, or related to adverse clinical effects, for example IgM, IgE and IgG4.^{2,4-6}

Diagnosis of both acquired and congenital toxoplasmosis is still based on serology, by detection of IgG, IgM and, to a lesser extent, IgA abs against parasite crude extract or recombinant antigens. Different methods have been adapted for the detection of toxoplasmosis infection phase, for confirmation of congenital infection and even to monitor the effectiveness of treatment.⁷⁻⁹ As saliva samples are more accessible and their collection is less invasive than serum, several studies have focused on the detection of IgG, IgM or IgA abs in this oral fluid, those being the IgG abs with a better diagnostic performance.¹⁰⁻¹⁶

	Journal Name	PIM
	Manuscript No.	12526
WILEY	Dispatch	24-3-2018
	No. of pages	6
	CE	Arockiaraj P
	PE	Bhagyalakshmi

Some years ago, specific abs of several IgG subclasses were studied using serum samples from patients with acquired infections.¹⁷⁻¹⁹ The main finding was that IgG1 abs were predominant and long-lasting. More recently, we and other groups have found that specific serum IgG subclasses are useful to confirm congenital infection and may be associated with clinical problems in the newborns.²⁰⁻²²

To determine whether specific abs of different subclasses can be found in saliva and reflect those of serum, we tested paired samples from women. We found surprising results about the local response, which we think deserve attention from scientists interested in mucosal immune response against parasites.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics statement

This study was reviewed and approved by the Research and Ethics Committees of the National Institute of Pediatrics of the Mexican Ministry of Health (IRB-NIH numbers IRB00008064 and IRB00008065), with registration number 078/2012. The National Institute of Perinatology also approved this sample collection, (212250-22571). Written informed consent was obtained from all participants.

2.2 | Samples

For the detection of IgA, IgG and the 4 IgG subclasses of anti-*T. gondii* abs, we recruited 91 women (mean age 30 ± 6 years), of whom 72 were pregnant, 53 in the first trimester (74%), eleven in the second (15%) and 8 in the third (11%). We included the 4 groups because no differences were observed for any antibody in any sample among them (not shown). From the 91 women tested, 50 (54.9%) were positive for IgG antibodies in serum, 4 with low avidity (4.4%) according to cut-offs previously determined for the conditions of this work²³; the frequency of positives was larger among pregnant women, that is 47 (65.3%).

Saliva samples (3.0 mL) were obtained using sterile polypropylene transfer pipettes and collected in 15.0-mL Falcon tubes which contained 3×10^{-4} g of a protease-inhibitor cocktail (Sigma P2714; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were immediately centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes. Supernatants were aliquoted and stored at -20°C until testing. Three-millilitre blood samples were obtained by venipuncture; serum was separated by centrifugation at 1200 rpm, aliquoted and frozen at -20°C until analysis.

2.3 | Indirect ELISAs

Anti-*T. gondii* class/subclass antibodies in serum were detected using indirect ELISA, as previously reported.^{20,24} Detection was adapted for saliva comparing several antigen concentrations and sample dilutions. Final conditions were as follows: polystyrene plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) coated with 5 µg/mL of the RH strain crude extract of *T. gondii*, blocked with 1% BSA and

incubated with serum diluted in PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) to 1:500 for IgG, to 1:250 for IgG1 and to 1:125 for IgG2-4 and IgA. Saliva samples were diluted 1:2 and 1:8 for IgG and IgA, respectively, and undiluted for the 4 IgG subclasses. The reactions were developed with peroxidase-labelled goat anti-human IgG (gamma-chain specific); IgA (alfa-chain specific; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA); or biotinylated monoclonal abs against each IgG subclass: IgG1 (clone 8c/6-39), IgG2 (clone HP-6014), IgG3 (clone HP-6050) and IgG4 (clone HP6025) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), at previously established optimal dilutions in direct ELISAs. For all IgG subclasses, a final step was performed with HRP-Streptavidin (Sigma Chemical Co.) diluted 1:10 000. The enzymatic activity was revealed with O-phenylenediamine/H₂O₂ in citrate buffer (pH 5.0) and stopped with 0.1N sulphuric acid. The absorbance values were determined at 492 nm in a micro-ELISA auto-reader using the Modulus™ Microplate Reader (Promega, Madison, WI, USA). The cut-off was determined per plate and sample type by the mean plus 3 standard deviations of 6 previously tested negative samples. Then, the Reactivity Index (RI) was calculated dividing the mean absorbance of duplicates of each sample by the cut-off value for each immunoglobulin. An RI ≥ 1.0 was considered positive. Correlations between samples and between classes/subclasses in each sample were calculated by Spearman's Rho coefficient. A P value ≤ .05 was considered significant. The analysis was performed using Excel and SPSS v.21 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 21.0; Armonk, NY: IBM Corp). The diagnostic parameters of each class/subclass in each sample were calculated with ROC curves using serum IgG abs as a reference.

3 | RESULTS

Serum/saliva correlations for each antibody class/subclass are shown in Figure 1. Our findings indicated no correlation between serum and saliva abs. For IgG and IgG1, several individuals had antibodies in both samples, and few of them were positive only in saliva or serum; however, no significant correlation was found between these samples either. Regarding IgG2, IgG3, IgG4 and IgA, most cases were positive in saliva but negative (or at very low level) in serum or vice versa, with some exceptions for IgG3 and IgG4.

When we analysed antibody classes in serum, we only found a positive correlation between IgG1 and IgG (Figure 2). We also found that many samples presented higher IgG RI compared to those of any IgG subclass or IgA. Moreover, except for IgG1, no correlation among subclasses and IgG or IgA was observed in serum. Saliva showed no correlation between IgG or IgA, or between any IgG subclass, but in contrast to serum, we found 1 group of individuals positive for several antibody classes and another, larger group positive for the IgG subclasses and negative (or with low RI) for total IgG abs.

When we compared IgG subclasses among them, we found different patterns in serum and saliva (Figure 3). In the serum samples, we found a response almost exclusive to 1 subclass, except for IgG3 tested against IgG1 or IgG2; conversely, in saliva, IgG2, IgG3 and

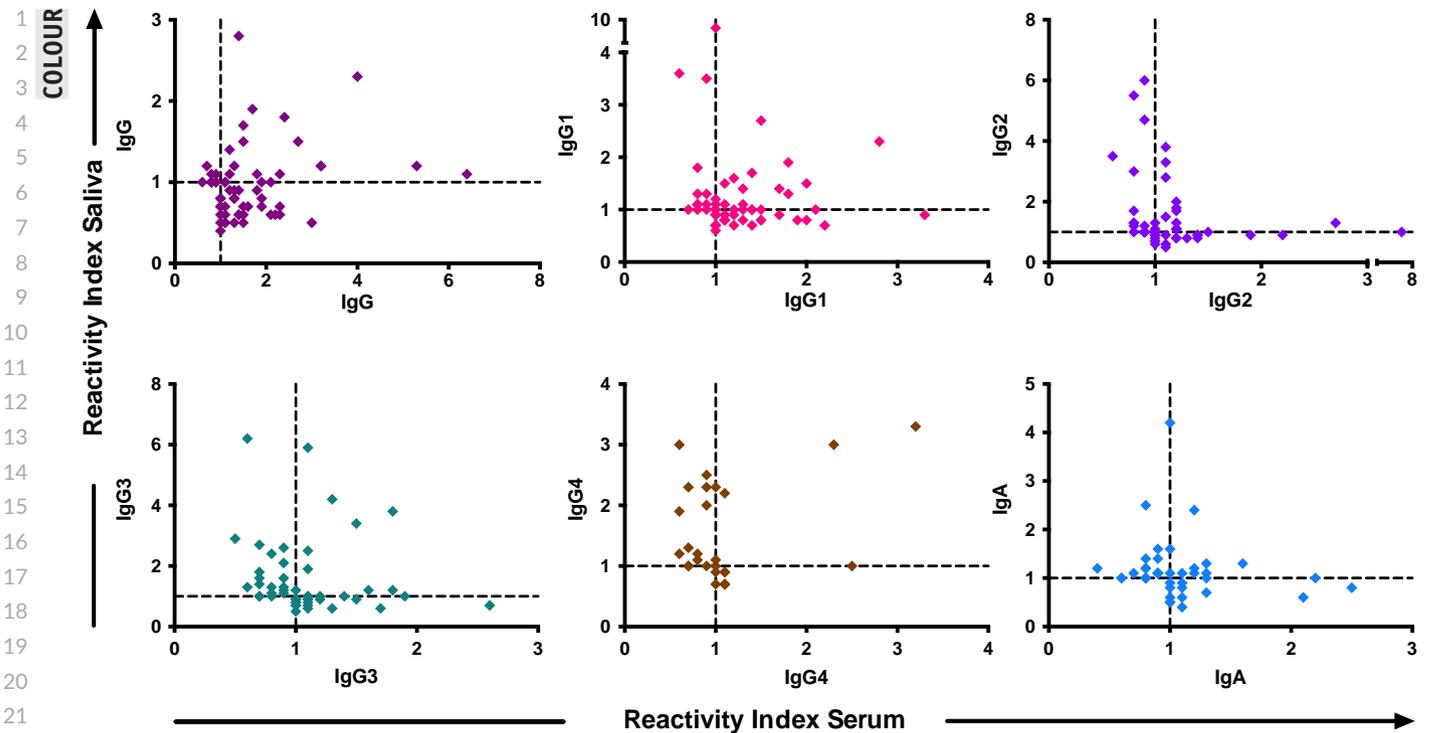


FIGURE 1 Scatter plots showing the correlation between serum and saliva samples for IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 anti-*T. gondii* antibodies. Dashed lines depict cut-off values. Double-negative samples are excluded from the correlation analysis. Confidence intervals and regression lines are not shown, as no significant correlation was found

IgG4 were highly correlated among the samples. Correlations between IgG1 and the other 3 subclasses in saliva identified 3 distinct groups, one which presented all subclasses and the other 2 representing exclusive responses.

Because of these findings, the diagnostic performance of different IgG antibody subclasses both in serum and saliva was low when compared to total IgG abs in serum (Figure S1). IgG1 abs had a sensitivity (Se) of 0.67 and a specificity (Sp) of 0.71 in serum and 0.40 Se and 0.85 Sp in saliva. No other antibody gave values of Se and Sp higher than 0.50 in saliva.

4 | DISCUSSION

In the present study, we evaluated saliva as an alternative, non-invasive sample to detect IgA, IgG and the 4 IgG subclasses of anti-*T. gondii*-specific abs, as we have previously observed that their serum pattern in maternal/offspring pairs may reflect the clinical status of congenitally infected newborns, as it has been corroborated by others.²⁰⁻²² Additionally, the predominant Ig class is associated with prognosis in acquired toxoplasmosis.⁴

Previous reports have shown that anti-*T. gondii* IgG, IgM and IgA abs are present in saliva. In some studies, the salivary IgA and IgG levels reflect those in serum, but they show low sensitivity and specificity values, as in the present study.¹⁰⁻¹⁶ To our knowledge, searches of anti-*T. gondii* IgG subclasses have not been performed in saliva. We hoped they could help diagnose or suggest prognosis,

but we found a rather different panorama, as they performed badly, mainly because most positive cases for specific IgG2, IgG3 and IgG4 abs in saliva were negative in serum and did not correlate to IgG abs either; thus, they exhibited very low diagnostic parameters.

These results captured our attention when we looked at them from a different perspective: as *Toxoplasma gondii* is acquired orally—except for congenital or artificial (transplant or accidental) infections—the presence of antibodies in saliva may be the result of local exposure to the parasite without systemic infection, which could explain those cases in the present study which were negative in serum but positive in saliva. Once ingested by the hosts, sporozoites or bradyzoites are released from oocysts or tissue cysts in the gastrointestinal tract, and infect enterocytes quickly, from where they disperse within the body and induce systemic innate and adaptive immune responses.²⁵ Then, the local dendritic cells produce IL-10, IL-12 and IFN- γ , which stimulate T helper and IgA-producing and IgG-producing plasma cells, both locally and systemically.²⁶⁻²⁹ Different studies have shown specific antibodies in the intestinal mucosa, milk and tears, suggesting the idea that these local responses have a protective role.^{25,30} In this context, several murine models have demonstrated that the nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) and the gut-associated lymphoid tissue (GALT) promote an effective protection against *T. gondii* antigens locally and systemically.^{27,31} In humans, NALTs, such as adenoids and palatine tonsils, have been considered more important than GALT as the sites for induction of B cells, which produce antibodies destined for the salivary

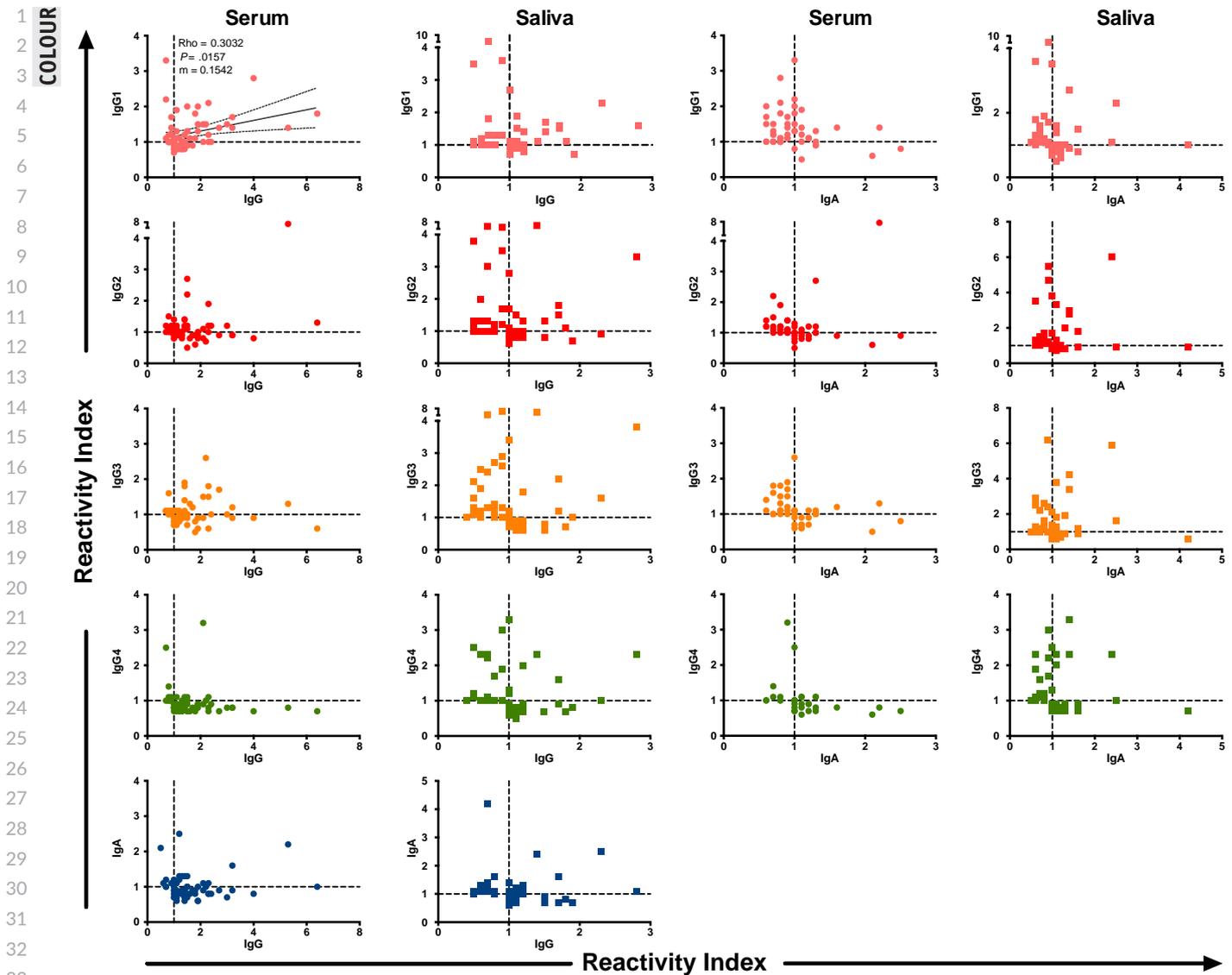


FIGURE 2 Correlations between anti-*T. gondii* IgG or IgA and each of the 4 IgG subclasses in serum or saliva. The vertical and horizontal dashed lines within each graph represent the cut-off. Double-negative samples are excluded from the correlation analysis. Statistically significant Rho values, as well as regression and CI_{95%} lines, are shown in the case in which statistical significance was found

glands.³² Additionally, it has been reported that direct immunization increases local B cell response in palatine tonsils and adenoids, but not in intestinal mucosa, reflecting the importance of a local response for limiting systemic infection.³³ Acquired toxoplasmosis occurs after ingestion of viable infective *T. gondii* in undercooked food or water, but it is feasible to encounter non-viable parasites in heat-treated meals: cysts of *T. gondii* become non-infective to mice due to temperature treatment, but they can keep immunogenic capacity.³⁴ In this regard, Zorgi and colleagues reported that non-viable *T. gondii* induced a low humoral immune response at the local level when injected through the oral cavity.³⁵ Our results suggest that antibodies in saliva were of low level, because the sample had to be used undiluted for the IgG subclasses, and at low dilutions for IgG and IgA, compared to serum. Whether they are produced after exposure to non-viable

or very low parasite burden of non-virulent strains and controlled at the local level remains to be elucidated.

IgG1 and IgG3 abs are potent triggers of effector mechanisms, such as complement activation and opsonization, and interact efficiently with most FcγRs, while IgG2 and IgG4 may neutralize the entrance of the parasite to the epithelial cells. Therefore, the presence of these subclasses in the oral fluid may provide a first line of defence, which reduces the need for pro-inflammatory systemic immunity to eliminate invading infectious agents and other exogenous antigens.^{36,37} In general, our results show a differential IgG subclass profile between saliva and serum, not previously explored; it seems there is richer response in saliva, because several antibody subclasses co-exist at similar levels, as opposed to serum. These results may suggest a major role of the oral immune system, which may limit the systemic infection by *T. gondii*, a study area that deserves more attention.

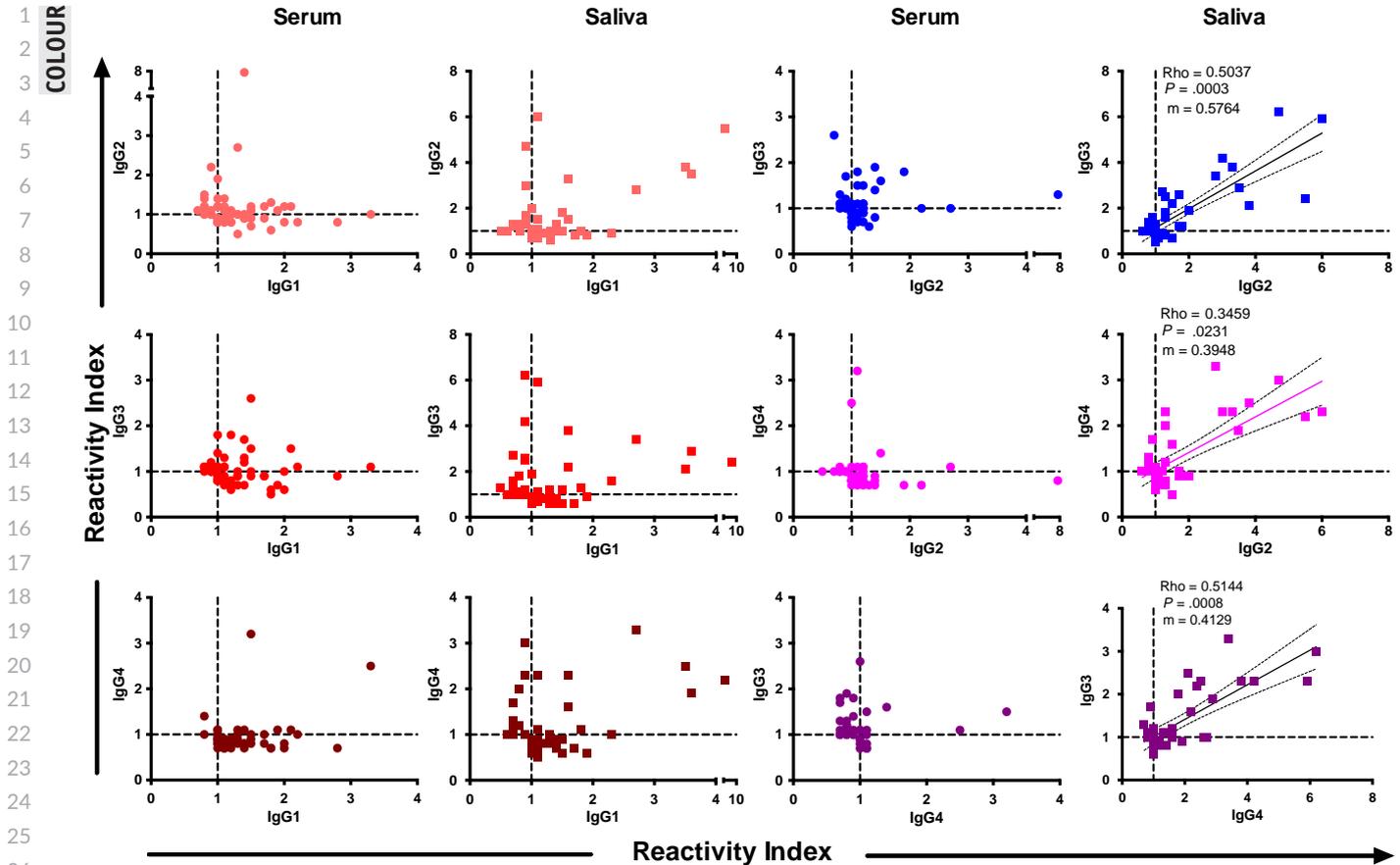


FIGURE 3 Correlations among the 4 anti-*T. gondii* IgG subclasses in serum or saliva samples. Dashed lines represent the cut-off points. Statistically significant Rho values, as well as regression and CI_{95%} lines, are shown in the corresponding graphs. The rest did not show significant correlation among antibodies. Double-negative samples are excluded from the correlation analysis

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Rafael López-Reboseño for his excellent technical assistance and to Dr. Valeria Gómez-Toscano for providing clinical advice to individuals who participated. This work was partially financed by the Institutional grant number 078/2012 and external funds from CONACyT, project 181175.

ORCID

F. Gómez-Chávez  <http://orcid.org/0000-0002-5050-2143>

D. Correa  <http://orcid.org/0000-0002-3354-4421>

REFERENCES

- Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:264-296.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*. 2011;240:269-285.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2001;56:296-305.
- Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol*. 2007;29:651-660.
- Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, et al. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun*. 2010;11:363-373.
- Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:766-778.
- Beghetto E, Nielsen HV, Del Porto P, et al. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. *J Infect Dis*. 2005;191:637-645.
- Rodrigues IM, Castro AM, Gomes MB, Amaral WN, Avelino MM. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:434-440.
- Rodrigues IM, Costa TL, Avelar JB, Amaral WN, Castro AM, Avelino MM. Assessment of laboratory methods used in the diagnosis of congenital toxoplasmosis after maternal treatment with spiramycin in pregnancy. *BMC Infect Dis*. 2014;14:349.
- Hajeer AH, Balfour AH, Mostratos A, Crosse B. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. *Parasite Immunol*. 1994;16:43-50.
- Loyola AM, Durighetto AF Jr, Silva DA, Mineo JR. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *J Oral Pathol Med*. 1997;26:187-191.
- Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, Naguleswaran A, Hemphill A. Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *J Parasitol*. 2005;91:561-563.

13. Chahed Bel-Ochi N, Bouratbine A, Mousli M. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G antibodies in human sera and saliva. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20:468-473.
14. Sampaio BF, Macre MS, Meireles LR, Andrade HF Jr. Saliva as a source of anti-*Toxoplasma gondii* IgG for enzyme immunoassay in human samples. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:O72-O74.
15. Chapey E, Meroni V, Kieffer F, et al. Use of IgG in oral fluid to monitor infants with suspected congenital toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22:398-403.
16. Singh MP, Dubey ML, Sud A, Malla N. Antibody response to *Toxoplasma gondii* in saliva samples from human immunodeficiency virus-infected patients. *Br J Biomed Sci.* 2016;62:81-84.
17. Ee TY, Singh M, Yap EH. The determination of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in different IgG subclasses of human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1989;20:71-79.
18. Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2031-2038.
19. Santana SS, Silva DA, Vaz LD, et al. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunol Lett.* 2012;143:193-201.
20. Cañedo-Solares I, de la Luz Galván-Ramírez M, Luna-Pastén H, et al. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:469-474.
21. de Souza-e-Silva CH, Vasconcelos-Santos DV, de Andrade GQ, et al. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:13-16.
22. Silva CH, Andrade GQ, Januario JN, et al. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:342-347.
23. Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Figueroa-Damián R, et al. Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *J Perinatol.* 2009;29:668-672.
24. Caballero-Ortega H, Castillo-Cruz R, Murieta S, et al. Diagnostic-test evaluation of immunoassays for anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in a random sample of Mexican population. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:642-647.
25. Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol.* 2006;8:535-544.
26. Johnson LL, Sayles PC. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of host-protective mechanisms against *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 1997;186:1799-1802.
27. Rodrigues MM, Wang H-L, Zhang T-E, et al. Partial protective effect of intranasal immunization with recombinant *Toxoplasma gondii* Rhopty protein 17 against toxoplasmosis in mice. *PLoS One.* 2014;9:e108377.
28. McLeod R, Frenkel JK, Estes RG, Mack DG, Eisenhauer PB, Gibori G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol.* 1988;140:1632-1637.
29. McLeod R, Mack DG. Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1986;136:2640-2643.
30. Charde T, Bourguin I, Mevelec MN, Dubremetz JF, Bout D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun.* 1990;58:1240-1246.
31. Charde T, Velge-Roussel F, Mevelec P, Mevelec MN, Buzoni-Gatel D, Bout D. Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunology.* 1993;78:421-429.
32. Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003;67(Suppl 1):S69-S76.
33. Quiding-Jarbrink M, Granstrom G, Nordstrom I, Holmgren J, Czerkinsky C. Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils. *Infect Immun.* 1995;63:853-857.
34. Grunvald E, Chiaromonte M, Hieny S, et al. Biochemical characterization and protein kinase C dependency of monokine-inducing activities of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1996;64:2010-2018.
35. Zorgi NE, Costa A, Galisteo AJ Jr, do Nascimento N, de Andrade HF Jr. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. *Immunol Lett.* 2011;138:187-196.
36. Silin DS, Liao CW, Lyubomska OV, Weng CN. Immunity development following oral vaccination against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a mouse model. *Int J Biotechnol.* 2007;9:381-390.
37. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol.* 2004;59:1-15.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Cañedo-Solares I, Gómez-Chávez F, Luna-Pastén H, et al. What do anti-*Toxoplasma gondii* IgA and IgG subclasses in human saliva indicate?. *Parasite Immunol.* 2018;e12526. <https://doi.org/10.1111/pim.12526>

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Martínez VO, de Mendonça Lima FW, de Carvalho CF, et al. *Toxoplasma gondii* infection and behavioral outcomes in humans: a systematic review. *Parasitol Res.* 2018; 117: 3059.
- ² Hampton MM. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal Netw.* 2015; 34: 274–278.
- ³ Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Correa D. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans Roy Soc trop Med Hyg.* 2012; 106: 653-659.
- ⁴ Ramírez-Crecencio, MA. Velásquez-Pérez, L. Epidemiology and trend of neurological diseases associated to HIV/AIDS. Experience of Mexican patients 1995-2009. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013; 115: 1322-1325.
- ⁵ Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care.* 2011; 25: 355-364.
- ⁶ Ambroise-Thomas P, Petersen E. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, France, 2000; 324.
- ⁷ Roc ML, Palacian MP, Lomba E, Monforte ML, Rebaje V, Revillo MJ. Serologic diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 24: 105-107.
- ⁸ Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Acad Sci.* 1909; 148: 369.
- ⁹ Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008; 55: 467-475.
- ¹⁰ Fallahi S, Rostami A, Nourollahpour Shiadeh M, Behniafar H, Paktinat S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2018 Mar; 47: 133-140.
- ¹¹ Boyer, KM. Congenital toxoplasmosis: Current status of diagnosis, treatment, and prevention. *Sem Pediatr Infect Dis.* 2000; 11: 165-171.
- ¹² Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 1019-1024.
- ¹³ Dubey JP. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J parasitol.* 2002; 88: 713-717.
- ¹⁴ Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Hasseine L, Darde ML, et al. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 1327-8.
- ¹⁵ Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64: 607-623.
- ¹⁶ Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.* 2015; 8: 292.
- ¹⁷ Pomares C, Montoya JG. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 2448-54.
- ¹⁸ Andrade GM, Vasconcelos-Santos DV, Carellos EV, Romanelli RM, Vitor RW, Carneiro AC, et al. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. *J Pediatr (Rio J).* 2010; 86: 85-88.
- ¹⁹ Carral L, Kaufer F, Pardini L, Durlach R, Moré G, Venturini MC, Freuler C. Congenital toxoplasmosis: Serology, PCR, parasite isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii*. *Rev Chilena Infectol.* 2018; 35: 36-40.
- ²⁰ Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C. Epidemiología de la toxoplasmosis en México. *Salud Pública Mex.* 1992; 34: 222-229.
- ²¹ Muñiz HS, Mondragón FR. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *Rev Educ-Bioq.* 2009; 28: 52-58.
- ²² Sánchez LR, Couret CM, Ginorio GD, Nodarse RA, Sanchez RN, Soler GI. Toxoplasmosis and Pregnancy. *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 2012; 38: 99-106.
- ²³ Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counseling. *Lancet.* 1999; 353: 1829–1833.
- ²⁴ Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS.* 2009; 117: 458-476.

-
- ²⁵ Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013; 114: 125-145.
- ²⁶ Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992; 15: 211-222.
- ²⁷ Pereira-Chioccolla VL, Vidal JE y S Chunlei. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiology*. 2009; 4: 1363-1379.
- ²⁸ Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 387-411.
- ²⁹ Robert-Gangneux F, Murat JB, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Gangneux JP, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol*. 2011; 27: 530-536.
- ³⁰ Rabilloud M, Wallon m, Peyron F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29: 421-425.
- ³¹ Martín-Hernández I. Toxoplasmosis congénita: una mirada al problema. *Rev Biomed* 2004; 15: 181-190.
- ³² Correa D, Figueroa R. *Infecciones congénitas y perinatales*. México: Médica Panamericana. 2014: 167-173pp.
- ³³ Melamed J, Eckert GU, Spadoni VS, Lago EG, Uberti F. Ocular manifestations of congenital toxoplasmosis. *Eye (Lond)*. 2010; 24: 528-534.
- ³⁴ Freeman K, Oakley L, Pollak A, Buffollano W, Petersen E, Semprini AE, Salt A, Gilbert R. Association between congenital toxoplasmosis and preterm birth, low birthweight and small for gestational age birth. *BJOG*. 2005; 112: 31-37.
- ³⁵ Kasper DC, Sawers L, Walter E, Hayde M, Stillwaggon E. Congenital toxoplasmosis in Austria: Prenatal screening for prevention is cost-saving. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11 (7): 1-24.
- ³⁶ Rajapakse S, Weeratunga P, Rodrigo C, de Silva NL, Fernando SD. Prophylaxis of human toxoplasmosis: a systematic review. *Pathogens and Global Health*. 2017; 111: 333-342.
- ³⁷ Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: Case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis*. 2009; 199: 280-285.
- ³⁸ Galvan-Ramirez ML, Troyo R, Roman S, Calvillo-Sanchez C, Bernal-Redondo R. A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. *Parasit Vectors*. 2012 Nov 26; 5: 271.
- ³⁹ Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol*. 2012; 34: 793-813.
- ⁴⁰ Charde T, Bout D. Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res Immunol* 1993; 144: 57-60.
- ⁴¹ Dzierszinski FS, Hunter CA. Advances in the use of genetically engineered parasites to study immunity to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 2008; 30: 235- 244.
- ⁴² Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994; 153: 2533-2543.
- ⁴³ Lang C, Gross U, Luder CG. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 2007; 100: 191-203.
- ⁴⁴ Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. Role of macrophage derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 219: 127-139.
- ⁴⁵ Hunter CA, Suzuki Y, Subauste CS, Remington JS. Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996; 219: 113-125.
- ⁴⁶ Alexander J, Scharton-Kersten TM, Yap G, Roberts CW, Liew FY, Sher A. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997; 352: 1355-1359.
- ⁴⁷ Ueno N, Lodoen MB, Hickey GL, Robey EA, Coombes JL. *Toxoplasma gondii*-infected natural killer cells display a hypermotility phenotype in vivo. *Immunol Cell Biol*. 2015; 93: 508-513.
- ⁴⁸ Silva JL, Rezende-Oliveira K, da Silva MV, Gómez-Hernández C, Peghini BC, Silva NM, Mineo JR, Rodrigues Júnior V. IL-17-expressing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in human toxoplasmosis. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014: 573825.

-
- ⁴⁹ Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Becerra-Torres E, Olmedo-Hernández M, Medina-Escutia ME, Murrieta S, Hernández-Islas JL. Immunobiology of congenital toxoplasmosis. En: Terrazas LI. *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*. Research Signpost. Kerala: India, 2007b: 387. ISBN: 81-308-0166-3.
- ⁵⁰ Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2009; 39: 23-39.
- ⁵¹ Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria B, Caballero-Ortega, Rico-Torres C. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol*. 2007; 29: 651-660.
- ⁵² Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2002; 185: S73-82.
- ⁵³ Piao LX, Cheng JH, Aosai F, Zhao XD, Norose K, Jin XJ. Cellular immunopathogenesis in primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Parasite Immunol*. 2018; 40: e12570.
- ⁵⁴ Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. *Toxoplasmosis. Infectious Diseases of Fetus and Newborn Infant*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders Company. 2006; 947-1091.
- ⁵⁵ Abbas AK, Lichtman AH, Pober SJ. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed. Londres, Inglaterra: WB Saunders Company. 2000; 553.
- ⁵⁶ Petersen E, Eaton RB. Control of congenital infection with *Toxoplasma gondii* by neonatal screening based on detection of specific immunoglobulin M antibodies eluted from phenylketonuria filter-paper blood-spot samples. *Acta Paediatr Suppl*. 1999; 88: 36-39.
- ⁵⁷ Sharma SD. Immunology of toxoplasmosis. In Wyler DJ, *Modern parasite biology cellular, immunological and molecular aspects*. USA: Freeman and Company. 1990; 184-199.
- ⁵⁸ Sharma SD, Mullenax J, Araujo FG, Erlich HA, Remington JS. Western Blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J Immunol*. 1983; 131: 977-983.
- ⁵⁹ Handman E, Goding JW, Remington JS. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1980; 124: 2578-2583.
- ⁶⁰ Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 2031-2038.
- ⁶¹ Murat JB, Souvignet A, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Pelloux H. Assessment of the IgA immunosorbent agglutination assay for the diagnosis of congenital toxoplasmosis on a series of 145 toxoplasmic seroconversions. *Clin Vaccine Immunol*. 2015; 22: 456-8.
- ⁶² Salge AKM, Siqueira KM, Castral TC, Guimarães JV, Rocha AA, et al. Immunological aspects of pregnancy: a literature review. *J Neonatol Clin Pediatr*. 2017; 4: 016.
- ⁶³ Helieh S. Oz, Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon, *Front Microbiol*. 2014; 5: 385.
- ⁶⁴ Xu YY, Wang SC, Li DJ, Du MR. Co-Signaling Molecules in Maternal-Fetal Immunity. *Trends Mol Med*. 2017; 23: 46-58.
- ⁶⁵ Armenta O, Espinosa N, Arroyo JC, Soto E. Modulación de la respuesta inmunológica durante el embarazo. *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 2011; 37: 277-287.
- ⁶⁶ Hsu P, Nanan R. Foetal immune programming: hormones, cytokines, microbes and regulatory T cells. *J Reprod Immunol*. 2014; 104: 2-7.
- ⁶⁷ Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, et al. Congenital toxoplasmosis: Candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun*. 2010; 11: 363-373.
- ⁶⁸ Pfaff AW, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M, et al. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: The dual role of IFN-gamma. *Parasitology*. 2007; 134: 1895-1902.

- ⁶⁹ Gurevich P, Elhayany A, Ben-Hur H, Moldavsky M, Szvalb S, Zandbank J, Schneider DF, Zusman I. Secretory component, J chain, and immunoglobulins in human embryos and fetuses of the first trimester of pregnancy: immunohistochemical study. *Pediatr Dev Pathol*. 2003; 6: 35-42.
- ⁷⁰ Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Reviews of Reproduction*. 1999; 4: 81-89.
- ⁷¹ Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez ML, Luna-Pastén H, Rodríguez Pérez R, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Figueroa-Damián R, Correa D. Human congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Ped Infect Dis J*. 2008; 27: 469-474.
- ⁷² Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Figueroa-Damián R, Bustos-Bahena ML, González-Henkel H, Calderón-Segura E, Luna-Pastén H, Correa D. Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *J Perinatol*. 2009; 29: 668-672
- ⁷³ Penagos MJ, Berrón RD, García ML, Zaragoza JM. El sistema inmune del recién nacido. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. 2003; 12: 63-68.
- ⁷⁴ Gross U, Lüder CG, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, Krczal D, Enders G. Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3619-3622.
- ⁷⁵ Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: 554-566.
- ⁷⁶ Zhang K, Lin G, Han Y, Li J. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. *Clin Chim Acta*. 2016; 461: 83-9.
- ⁷⁷ Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissound C, Peyron F, Garcia-Meric P, Kieffer F. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet Gynecol*. 2010; 115: 727-733.
- ⁷⁸ Magi B, Migliorini L. Western blotting for the diagnosis of the congenital toxoplasmosis. *New microbial*. 2011; 34: 93-95.
- ⁷⁹ Machado AS, Andrade GM, Januario JN, Fernandes MD, Carneiro AC, Carneiro M, Carellos EV, Romanelli, RM, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RW. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 757-761.
- ⁸⁰ Capobianco JD, Monica TC, Ferreira FP, Mitsuka-Breganó R, Navarro IT, Garcia JL, Reiche EM. Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Pediatr (Rio J)*. 2016; 92: 616-623.
- ⁸¹ Contini C, Fainardi e, Cultrera R. Advanced laboratory techniques for diagnosing *Toxoplasma gondii* encephalitis in AIDS patients: significance of intrathecal production and comparison with PCR and ECL- Western blotting. *J Neuroimmunol*. 1998; 92: 29-37.
- ⁸² Bessières MH, Berrebi A, Cassaing S, Fillaux J, Cambus JP, Berry A, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: Prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 389-392.
- ⁸³ Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med*. 1994; 331: 695-699.
- ⁸⁴ Jones J, López A, Wilson M. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician*. 2003; 67: 2131-2138.
- ⁸⁵ Galván-Ramírez ML, Soto-Mancilla JL, Velasco-Castrejón O, Pérez-Medina R. Incidence of anti-*Toxoplasma* antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995; 28: 333-337.
- ⁸⁶ Rodríguez M, Rodríguez D, Ginorio D, Martínez R, Casanova P, Fraga J et al. Primoinfección por *Toxoplasma gondii* durante el embarazo. *Panam Infectol*. 2006; 8: 43-46.
- ⁸⁷ Alarcon Guzmán T, Bolaños León E, Alarcón Avilés T. Toxoplasmosis cerebral en pacientes con sida. *Rev Mex Neuroci*. 2004; 5: 404-411.
- ⁸⁸ Montoya JG, Liesenfeld O. Seminario de Toxoplasmosis. Artículo de revisión *The Lancet* 2004; 363:1965-1976.

-
- ⁸⁹ Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoan Parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948; 108: 660-663.
- ⁹⁰ Frenkel JK. *Toxoplasmosis*. En: Goldsmith R, Heyneman D. *Parasitología y medicina tropical*. México, DF: Manual Moderno, 1995; 430-443.
- ⁹¹ Beaman MH, McCabe R, Wong SY, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Enfermedades infecciosas y parasitarias*. 4a ed. Bogotá, Colombia: Panamer, 1997; 2754-2775.
- ⁹² Jones JL, Kruszon-Moran D, Elder S, et al. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 2011-2014. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 98: 551-557.
- ⁹³ Jacobs L, Linde MN. A Hemagglutination Test for *Toxoplasmosis* *J Parasitol*. 1957; 43: 308.
- ⁹⁴ Kotresha D, Noordn R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS*. 2010; 118: 529-542.
- ⁹⁵ Torres E, Osorio E, Núñez L, Chacón L, Castaño ME, Rivera R, Ramírez ML, Gómez-Marín JE. Validación de pruebas ELISA IgM anti-*Toxoplasma* para uso en programas de tamización en recién nacidos. *Infectio*. 2011; 15: 84-89.
- ⁹⁶ Buffolano W, Lappalainen M, Hedman L, Ciccimarra F, Pezzo Md, Rescaldani R. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 23: 825-830.
- ⁹⁷ Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Del Pezzo M, Di Cristina M, Minenkova O. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 5414-5418.
- ⁹⁸ Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanita*. 2004; 40: 81-88.
- ⁹⁹ Marcolino PT, Silva DA, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: Determination of immunoglobulin G avidity by Western-blotting. *Clin Diag Lab Immun*. 2000; 7: 384-389.
- ¹⁰⁰ Liesenfeld O, Montoya JG, Tathineni NJ, Davis M, Brown BW, Cobb JKL. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184: 140-145.
- ¹⁰¹ Wong SY, Remington JS. *Toxoplasmosis* in pregnancy. *Clin Infect Dis*. 1994; 18: 853-861.
- ¹⁰² Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Relevance of and New Developments in Serology for *Toxoplasmosis*. *Trends Parasitol*. 2016; 32: 492-506.
- ¹⁰³ Olariu TR, Blackburn BG, Press C, Talucod J, Remington JS, Montoya JG. Role of *Toxoplasma* IgA as Part of a Reference Panel for the Diagnosis of Acute *Toxoplasmosis* during Pregnancy. *J Clin Microbiol*. 2019; 30; 57.
- ¹⁰⁴ De Souza C, Queiroz G, Januario J, De Aguilar AC, Carneiro M, Vasconcelos-Santos D, De Almeida R. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. 2012; 107: 342-347.
- ¹⁰⁵ Derouin F, Sulcebe G, Ballet JJ. Sequential determination of IgG subclasses and IgA specific antibodies in primary and reactivating toxoplasmosis. *Biomed Pharmacother*. 1987; 41: 429-433.
- ¹⁰⁶ Béla SR, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Pirovani CP, Chaves-Borges FA, Carvalho FR. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62: 245-54.
- ¹⁰⁷ Santana S, Silva D, Vaz L, Pirovani C, Barros G, Lemos E, Reynaldo D, Mineo J. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunology Letters*. 2012; 143: 193-201.
- ¹⁰⁸ de Jesus LN, Tonini Ade C, Barros GB, Coelho-dos-Reis JG, Béla SR, Antonelli LR, Machado AS, Carneiro AC, Andrade GM, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, Teixeira-Carvalho A, Vitor RW, Ferro EA, Mineo JR, Bahia-Oliveira LM, Martins-Filho OA, Lemos EM; UFMG Congenital Toxoplasmosis Brazilian Group, UFMG-CTBG. IgA and IgG1 reactivities assessed by flow cytometry mirror clinical aspects of infants with ocular congenital toxoplasmosis. *J Immunol Methods*. 2016; 428: 1-8.

-
- ¹⁰⁹ de Souza-e-Silva CH, Vasconcelos-Santos DV, de Andrade GQ, Carellos EV, de Castro Romanelli RM, de Resende LM, Januário JN, Carneiro M, de Aguiar Vasconcelos Carneiro AC, de Almeida Vitor RW. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2013; 32: 13-6.
- ¹¹⁰ de Castro Zacche-Tonini A, Fonseca GSF, de Jesus LNNP, Barros GB, Coelho-Dos-Reis JGA, Béla SR, Machado AS, Carneiro ACAV, Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, Teixeira-Carvalho A, Vitor RWA, Ferro EAV, Mineo JR, Martins-Filho OA, Lemos EM; UFMG Congenital Toxoplasmosis Brazilian Group - UFMG-CTBG. Establishing tools for early diagnosis of congenital toxoplasmosis: Flow cytometric IgG avidity assay as a confirmatory test for neonatal screening. *J Immunol Methods*. 2017; 451: 37-47.
- ¹¹¹ Pleass J, Woof M. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol*. 2001; 11: 545-555.
- ¹¹² Foudrinier F, Villena I, Jaussaud R, Aubert D, Chemla C, Martinot F, Pinon JM. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 1681-1686.
- ¹¹³ Matowicka-Karna J, Kemon H. IgE antibodies in toxoplasmosis. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014; 68: 597-602.
- ¹¹⁴ Ahluwalia B, Magnusson MK, Öhman L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol*. 2017; 52: 1185-1193.
- ¹¹⁵ Moutsopoulos NM, Konkel JE. Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier. *Trends Immunol*. 2018; 39: 276-287.
- ¹¹⁶ Ross KF, Herzberg MC. Autonomous immunity in mucosal epithelial cells: fortifying the barrier against infection. *Microbes Infect*. 2016; 18: 387-98.
- ¹¹⁷ Zaldivar, M. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 2002; 18: 352-354.
- ¹¹⁸ Dutzan N, et al. Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol*. 2016; 9: 1163-1172.
- ¹¹⁹ VanGinkel FW, Nguyen HH, McGhee JR. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 2000; 6: 123-132.
- ¹²⁰ Burbelo PD, Bayat A, Lebovitz EE, Ladarola MJ. New technologies for studying the complexity of oral diseases. *Oral Dis*. 2012; 18: 121-126.
- ¹²¹ Salvi S, Holgate ST. Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29:1597-1605.
- ¹²² Corthesy B, Spertin F. Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem*. 1999; 380: 1251-1262.
- ¹²³ Regueiro JR, López Larrea C. *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune 2ª Ed*. Madrid: Médica Panamericana. 1997.
- ¹²⁴ Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 5th Ed. Londres: Mosby. 1998.
- ¹²⁵ Haeckel, R. Procedures for saliva sampling. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1989; 27: 246-247.
- ¹²⁶ Aas A Jr, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 5721-5732.
- ¹²⁷ Bonne N, Wong D. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. *Genome Med*. 2012; 4: 82.
- ¹²⁸ Wang, Z, Xue, C, Lou, W et al, Non-invasive immunodiagnosis of *Schistosomiasis japonica*: the detection of specific antibodies in saliva. *Chin Med J (Engl)*. 2002; 115: 1460-1464.
- ¹²⁹ Wong, DT. Salivary diagnostics: scientific and clinical frontiers. *Adv Dent Res*. 2011; 23: 350-352.
- ¹³⁰ Amado LA, Villar LM, de Paula VS, de Almeida AJ, Gaspar AM. Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 149-155.
- ¹³¹ Kaufman, E, Lamster, IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13: 197-212.
- ¹³² Edgar W. Saliva and dental health. *Br Dent J*. 1990; 169: 96-98.

-
- ¹³³ Haeckel R, Hanecke P. The application of saliva, sweat, and tear fluid for diagnostic purposes. *Ann Biol Clin.* 1993; 51: 903–910.
- ¹³⁴ Yoshizawa J, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster B, Wong D. Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities. *Microbiol Rev.* 2013; 12: 781-789.
- ¹³⁵ Rehak NN, Cecco SA, Csako G. Biochemical composition and electrolyte balance of “unstimulated” whole human saliva. *Clin. Chem Lab Med.* 2000; 38:335.
- ¹³⁶ Campo J, Perea MA, Del Romero J, Cano J, Hernando V, Bascones A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral Dis.* 2006; 12: 219–228.
- ¹³⁷ Miller S. Saliva testing—a nontraditional diagnostic tool. *Clin Lab Sci.* 1994; 7: 39–44.
- ¹³⁸ Challacombe SJ, Percival RS, Marsh PD. Age-related changes in immunoglobulin isotypes in whole and parotid saliva and serum in healthy individuals. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10: 202–207.
- ¹³⁹ Hajeer, AH, Balfour, AH, Mostratos, AN. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. *Paras Immunol.* 1994; 16: 43-50
- ¹⁴⁰ Loyola, AM, Durighetto, AF, Silva, DA, Minero, JR. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26: 187-191.
- ¹⁴¹ Borges, A, Castro Figueiredo, JF. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG, IgM and IgA immunoglobulins in the serum, cerebrospinal fluid and saliva of patients with acquired immunodeficiency syndrome and neurotoxoplasmosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004; 62: 1033-1037.
- ¹⁴² Stroehle, A, Schmid, K, Arunasalam, A, Hemphill, A. Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *J Parasitol.* 2005; 91: 561-563.
- ¹⁴³ Cañedo-Solares I, Gómez-Chávez F, Luna-Pastén H, Ortiz-Alegría LB, Flores-García Y, Figueroa-Damián R, Macedo-Romero CA. What do anti-*Toxoplasma gondii* IgA and IgG subclasses in human saliva indicate? *Parasite Immunol.* 2018;40:e12526.
- ¹⁴⁴ Chahed Bel-Ochi N, Bouratbine A and Mousli M. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G antibodies in human sera and saliva. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20: 468-473.
- ¹⁴⁵ Singh MP, Dubey ML, Sud A and Malla N. Antibody response to *Toxoplasma gondii* in saliva samples from human immunodeficiency virus-infected patients. *British Journal of Biomedical Science.* 2016; 62: 81-84.
- ¹⁴⁶ Bradford, A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Annals of Biochemistry.* 1976; 72: 248–254.
- ¹⁴⁷ Jaedicke, K, Taylor, J, Preshaw, P. Validation and quality control of ELISAs for the use with human saliva samples. *J Immunol Methods.* 2012; Mar (30) 377: 62-65.

What do anti-*Toxoplasma gondii* IgA and IgG subclasses in human saliva indicate?

I. Cañedo-Solares¹ | F. Gómez-Chávez^{1,2}  | H. Luna-Pastén¹ | L. B. Ortiz-Alegria¹ |
Y. Flores-García¹ | R. Figueroa-Damián³ | C. A. Macedo-Romero¹ | D. Correa¹  1 2

¹Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

²Cátedras CONACyT, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México

³Servicio de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

Correspondence

Dolores Correa, Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México.
Email: mariadol@yahoo.com

Present address

Y. Flores-García, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Malaria Research Institute, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MA, USA

Funding information

This work had support from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT, grant No. 181175) and Federal Funds from INP (No. 078/2012).

1 | INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a cosmopolitan, water/food-borne infection caused by *Toxoplasma gondii*.¹ In immunocompetent individuals, it is regularly asymptomatic and self-limiting, but clinical problems arise in immunocompromised persons, such as HIV patients or congenitally infected newborns. This is because the immune system maintains the homeostasis in this host-parasite relationship.^{2,3} In fact, many components of the innate and adaptive responses are involved in the control of parasite proliferation, including antibodies (abs) which fix complement, facilitate phagocytosis of the parasite by opsonization (human IgG1/IgG3) or neutralize cell invasion. However, abs in

Summary

Diagnostic tests for toxoplasmosis are based on serological techniques due to their high sensitivity. Some IgG subclasses are related to clinical outcome in the congenital form. In this work, we determined the levels of IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired saliva and serum samples from 91 women by indirect ELISA using a crude extract of the RH strain. The levels of IgA, IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies and, to a lesser extent, IgG1 did not correlate between saliva and serum, that is, most cases that were positive for 1 Ig class in 1 sample were negative or very low in the other, and vice versa. We also observed that most samples of saliva that were positive for 1 IgG subclass were also positive for at least 2 of the other 3; this contrasted with findings in serum, wherein each person was positive almost exclusively for 1 subclass, as demonstrated before by us and other researchers. Although these findings are disappointing for the use in diagnosis, the richer response in saliva might indicate local exposure to *T. gondii* antigens without systemic infection; thus, saliva might be reflecting a local (protective?) response against this protozoan.

KEYWORDS

antibodies, IgA, IgG subclasses, saliva, *Toxoplasma gondii*

serum can also be neutral, such as IgG2, or related to adverse clinical effects, for example IgM, IgE and IgG4.^{2,4-6}

Diagnosis of both acquired and congenital toxoplasmosis is still based on serology, by detection of IgG, IgM and, to a lesser extent, IgA abs against parasite crude extract or recombinant antigens. Different methods have been adapted for the detection of toxoplasmosis infection phase, for confirmation of congenital infection and even to monitor the effectiveness of treatment.⁷⁻⁹ As saliva samples are more accessible and their collection is less invasive than serum, several studies have focused on the detection of IgG, IgM or IgA abs in this oral fluid, those being the IgG abs with a better diagnostic performance.¹⁰⁻¹⁶

	Journal Name	PIM
	Manuscript No.	12526
WILEY		Dispatch: 24-3-2018
No. of pages: 6		CE: Arockiaraj P
PE: Bhagyalakshmi		

1 Some years ago, specific abs of several IgG subclasses were stud-
2 ied using serum samples from patients with acquired infections.¹⁷⁻¹⁹
3 The main finding was that IgG1 abs were predominant and long-
4 lasting. More recently, we and other groups have found that specific
5 serum IgG subclasses are useful to confirm congenital infection and
6 may be associated with clinical problems in the newborns.²⁰⁻²²

7 To determine whether specific abs of different subclasses can be
8 found in saliva and reflect those of serum, we tested paired samples
9 from women. We found surprising results about the local response,
10 which we think deserve attention from scientists interested in mu-
11 cosal immune response against parasites.

12 2 | MATERIALS AND METHODS

13 2.1 | Ethics statement

14 This study was reviewed and approved by the Research and
15 Ethics Committees of the National Institute of Pediatrics of the
16 Mexican Ministry of Health (IRB-NIH numbers IRB00008064 and
17 IRB00008065), with registration number 078/2012. The National
18 Institute of Perinatology also approved this sample collection,
19 (212250-22571). Written informed consent was obtained from all
20 participants.

21 2.2 | Samples

22 For the detection of IgA, IgG and the 4 IgG subclasses of anti-*T. gon-*
23 *dii* abs, we recruited 91 women (mean age 30 ± 6 years), of whom 72
24 were pregnant, 53 in the first trimester (74%), eleven in the second
25 (15%) and 8 in the third (11%). We included the 4 groups because no
26 differences were observed for any antibody in any sample among
27 them (not shown). From the 91 women tested, 50 (54.9%) were posi-
28 tive for IgG antibodies in serum, 4 with low avidity (4.4%) according
29 to cut-offs previously determined for the conditions of this work²³;
30 the frequency of positives was larger among pregnant women, that
31 is 47 (65.3%).

32 Saliva samples (3.0 mL) were obtained using sterile polypropyl-
33 ene transfer pipettes and collected in 15.0-mL Falcon tubes which
34 contained 3 × 10⁻⁴ g of a protease-inhibitor cocktail (Sigma P2714;
35 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were immediately centri-
36 fugal at 3500 rpm for 10 minutes. Supernatants were aliquoted and
37 stored at -20°C until testing. Three-millilitre blood samples were
38 obtained by venipuncture; serum was separated by centrifugation at
39 1200 rpm, aliquoted and frozen at -20°C until analysis.

40 2.3 | Indirect ELISAs

41 Anti-*T. gondii* class/subclass antibodies in serum were detected
42 using indirect ELISA, as previously reported.^{20,24} Detection was
43 adapted for saliva comparing several antigen concentrations and
44 sample dilutions. Final conditions were as follows: polystyrene
45 plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) coated with 5 µg/mL of
46 the RH strain crude extract of *T. gondii*, blocked with 1% BSA and

47 incubated with serum diluted in PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) to
48 1:500 for IgG, to 1:250 for IgG1 and to 1:125 for IgG2-4 and IgA.
49 Saliva samples were diluted 1:2 and 1:8 for IgG and IgA, respectively,
50 and undiluted for the 4 IgG subclasses. The reactions were devel-
51 oped with peroxidase-labelled goat anti-human IgG (gamma-chain
52 specific); IgA (alfa-chain specific; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO,
53 USA); or biotinylated monoclonal abs against each IgG subclass:
54 IgG1 (clone 8c/6-39), IgG2 (clone HP-6014), IgG3 (clone HP-6050)
55 and IgG4 (clone HP6025) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA),
56 at previously established optimal dilutions in direct ELISAs. For all
57 IgG subclasses, a final step was performed with HRP-Streptavidin
58 (Sigma Chemical Co.) diluted 1:10 000. The enzymatic activity was
59 revealed with O-phenylenediamine/H₂O₂ in citrate buffer (pH
60 5.0) and stopped with 0.1N sulphuric acid. The absorbance values
61 were determined at 492 nm in a micro-ELISA auto-reader using the
62 Modulus™ Microplate Reader (Promega, Madison, WI, USA). The cut-
63 off was determined per plate and sample type by the mean plus 3
64 standard deviations of 6 previously tested negative samples. Then,
65 the Reactivity Index (RI) was calculated dividing the mean absorb-
66 ance of duplicates of each sample by the cut-off value for each im-
67 munoglobulin. An RI ≥ 1.0 was considered positive. Correlations
68 between samples and between classes/subclasses in each sample
69 were calculated by Spearman's Rho coefficient. A *P* value ≤ .05
70 was considered significant. The analysis was performed using Excel
71 and SPSS v.21 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for
72 Macintosh, Version 21.0; Armonk, NY: IBM Corp). The diagnostic pa-
73 rameters of each class/subclass in each sample were calculated with
74 ROC curves using serum IgG abs as a reference.

75 3 | RESULTS

76 Serum/saliva correlations for each antibody class/subclass are
77 shown in Figure 1. Our findings indicated no correlation between
78 serum and saliva abs. For IgG and IgG1, several individuals had anti-
79 bodies in both samples, and few of them were positive only in saliva
80 or serum; however, no significant correlation was found between
81 these samples either. Regarding IgG2, IgG3, IgG4 and IgA, most
82 cases were positive in saliva but negative (or at very low level) in
83 serum or vice versa, with some exceptions for IgG3 and IgG4.

84 When we analysed antibody classes in serum, we only found a
85 positive correlation between IgG1 and IgG (Figure 2). We also found
86 that many samples presented higher IgG RI compared to those of any
87 IgG subclass or IgA. Moreover, except for IgG1, no correlation among
88 subclasses and IgG or IgA was observed in serum. Saliva showed no
89 correlation between IgG or IgA, or between any IgG subclass, but in
90 contrast to serum, we found 1 group of individuals positive for sev-
91 eral antibody classes and another, larger group positive for the IgG
92 subclasses and negative (or with low RI) for total IgG abs.

93 When we compared IgG subclasses among them, we found dif-
94 ferent patterns in serum and saliva (Figure 3). In the serum samples,
95 we found a response almost exclusive to 1 subclass, except for IgG3
96 tested against IgG1 or IgG2; conversely, in saliva, IgG2, IgG3 and

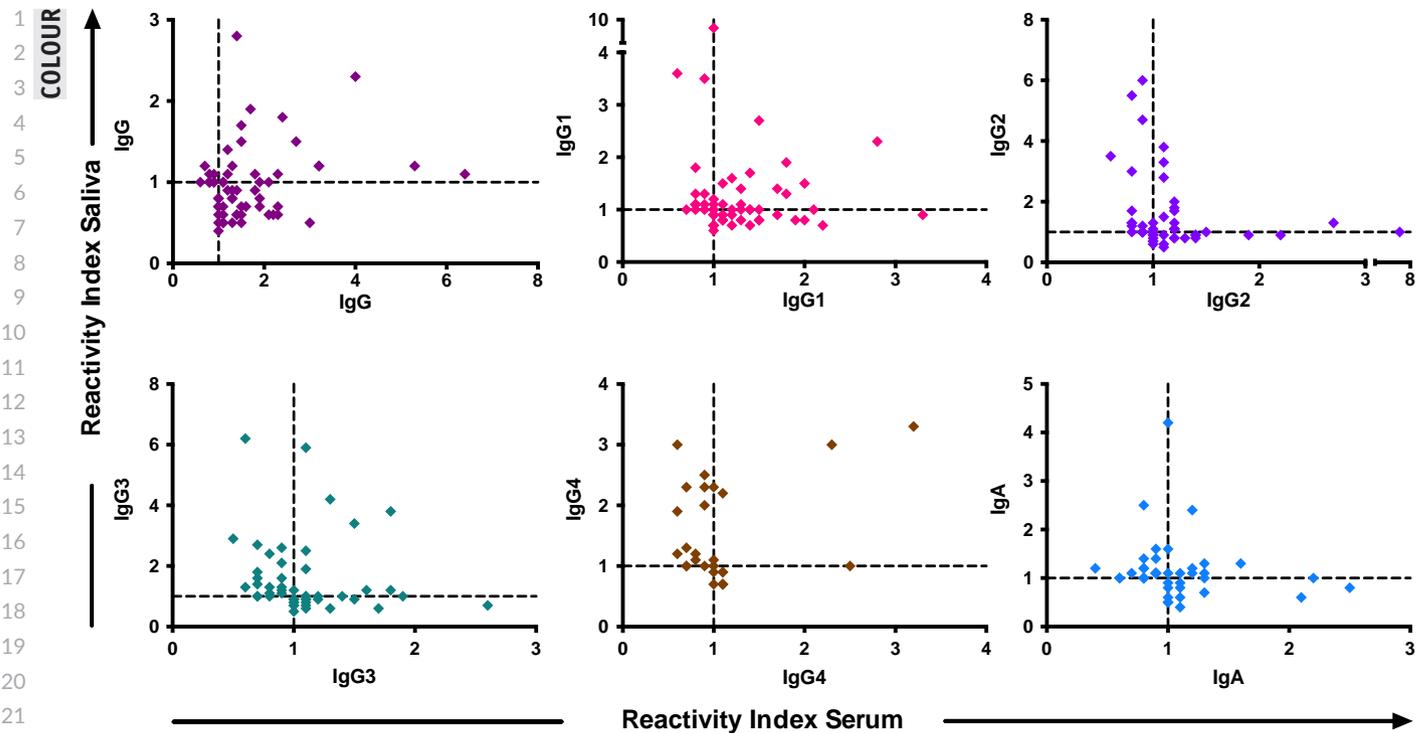


FIGURE 1 Scatter plots showing the correlation between serum and saliva samples for IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 anti-*T. gondii* antibodies. Dashed lines depict cut-off values. Double-negative samples are excluded from the correlation analysis. Confidence intervals and regression lines are not shown, as no significant correlation was found

IgG4 were highly correlated among the samples. Correlations between IgG1 and the other 3 subclasses in saliva identified 3 distinct groups, one which presented all subclasses and the other 2 representing exclusive responses.

Because of these findings, the diagnostic performance of different IgG antibody subclasses both in serum and saliva was low when compared to total IgG abs in serum (Figure S1). IgG1 abs had a sensitivity (Se) of 0.67 and a specificity (Sp) of 0.71 in serum and 0.40 Se and 0.85 Sp in saliva. No other antibody gave values of Se and Sp higher than 0.50 in saliva.

4 | DISCUSSION

In the present study, we evaluated saliva as an alternative, non-invasive sample to detect IgA, IgG and the 4 IgG subclasses of anti-*T. gondii*-specific abs, as we have previously observed that their serum pattern in maternal/offspring pairs may reflect the clinical status of congenitally infected newborns, as it has been corroborated by others.²⁰⁻²² Additionally, the predominant Ig class is associated with prognosis in acquired toxoplasmosis.⁴

Previous reports have shown that anti-*T. gondii* IgG, IgM and IgA abs are present in saliva. In some studies, the salivary IgA and IgG levels reflect those in serum, but they show low sensitivity and specificity values, as in the present study.¹⁰⁻¹⁶ To our knowledge, searches of anti-*T. gondii* IgG subclasses have not been performed in saliva. We hoped they could help diagnose or suggest prognosis,

but we found a rather different panorama, as they performed badly, mainly because most positive cases for specific IgG2, IgG3 and IgG4 abs in saliva were negative in serum and did not correlate to IgG abs either; thus, they exhibited very low diagnostic parameters.

These results captured our attention when we looked at them from a different perspective: as *Toxoplasma gondii* is acquired orally—except for congenital or artificial (transplant or accidental) infections—the presence of antibodies in saliva may be the result of local exposure to the parasite without systemic infection, which could explain those cases in the present study which were negative in serum but positive in saliva. Once ingested by the hosts, sporozoites or bradyzoites are released from oocysts or tissue cysts in the gastrointestinal tract, and infect enterocytes quickly, from where they disperse within the body and induce systemic innate and adaptive immune responses.²⁵ Then, the local dendritic cells produce IL-10, IL-12 and IFN- γ , which stimulate T helper and IgA-producing and IgG-producing plasma cells, both locally and systemically.²⁶⁻²⁹ Different studies have shown specific antibodies in the intestinal mucosa, milk and tears, suggesting the idea that these local responses have a protective role.^{25,30} In this context, several murine models have demonstrated that the nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) and the gut-associated lymphoid tissue (GALT) promote an effective protection against *T. gondii* antigens locally and systemically.^{27,31} In humans, NALTs, such as adenoids and palatine tonsils, have been considered more important than GALT as the sites for induction of B cells, which produce antibodies destined for the salivary

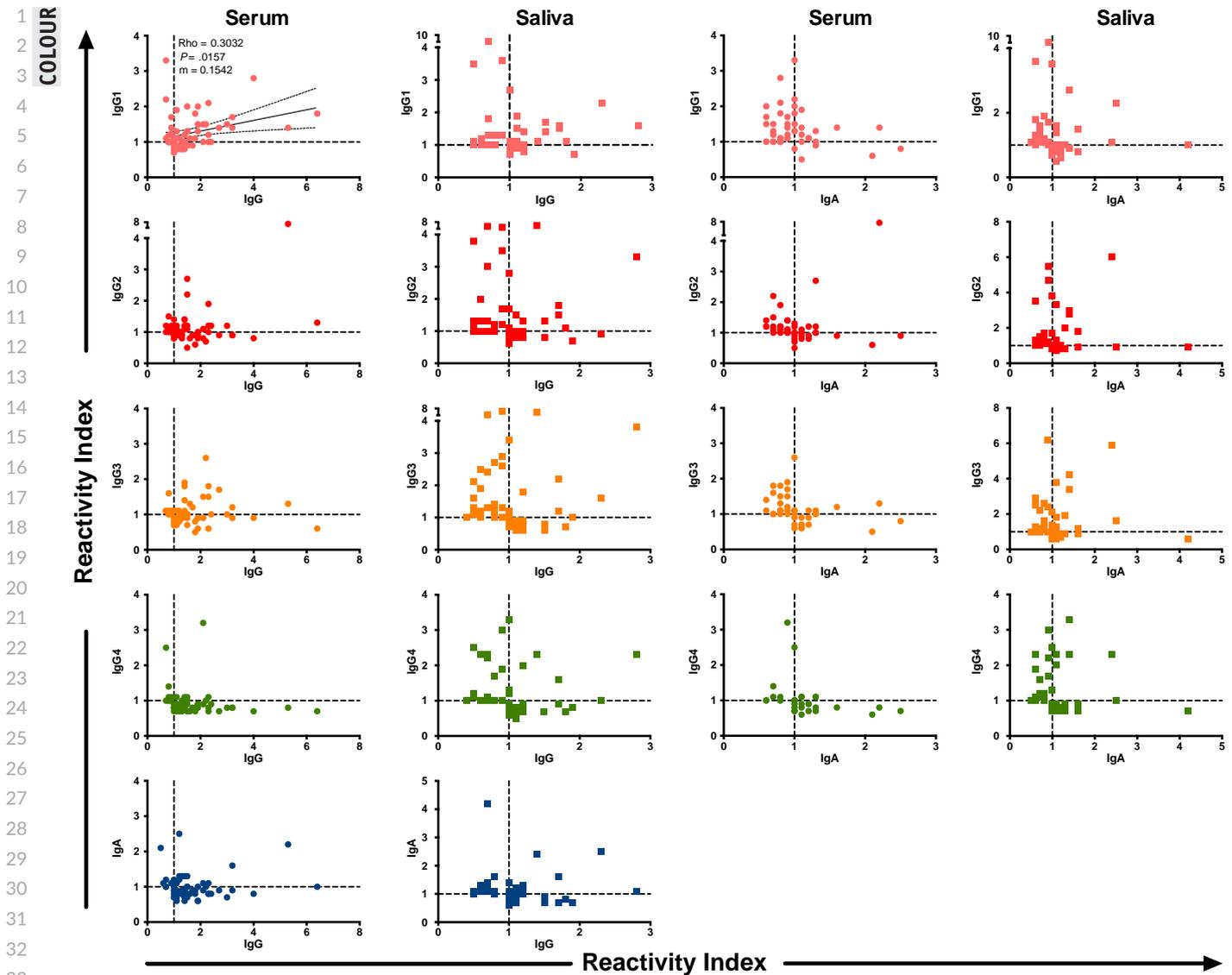


FIGURE 2 Correlations between anti-*T. gondii* IgG or IgA and each of the 4 IgG subclasses in serum or saliva. The vertical and horizontal dashed lines within each graph represent the cut-off. Double-negative samples are excluded from the correlation analysis. Statistically significant Rho values, as well as regression and CI_{95%} lines, are shown in the case in which statistical significance was found

glands.³² Additionally, it has been reported that direct immunization increases local B cell response in palatine tonsils and adenoids, but not in intestinal mucosa, reflecting the importance of a local response for limiting systemic infection.³³ Acquired toxoplasmosis occurs after ingestion of viable infective *T. gondii* in undercooked food or water, but it is feasible to encounter non-viable parasites in heat-treated meals: cysts of *T. gondii* become non-infective to mice due to temperature treatment, but they can keep immunogenic capacity.³⁴ In this regard, Zorgi and colleagues reported that non-viable *T. gondii* induced a low humoral immune response at the local level when injected through the oral cavity.³⁵ Our results suggest that antibodies in saliva were of low level, because the sample had to be used undiluted for the IgG subclasses, and at low dilutions for IgG and IgA, compared to serum. Whether they are produced after exposure to non-viable

or very low parasite burden of non-virulent strains and controlled at the local level remains to be elucidated.

IgG1 and IgG3 abs are potent triggers of effector mechanisms, such as complement activation and opsonization, and interact efficiently with most FcγRs, while IgG2 and IgG4 may neutralize the entrance of the parasite to the epithelial cells. Therefore, the presence of these subclasses in the oral fluid may provide a first line of defence, which reduces the need for pro-inflammatory systemic immunity to eliminate invading infectious agents and other exogenous antigens.^{36,37} In general, our results show a differential IgG subclass profile between saliva and serum, not previously explored; it seems there is richer response in saliva, because several antibody subclasses co-exist at similar levels, as opposed to serum. These results may suggest a major role of the oral immune system, which may limit the systemic infection by *T. gondii*, a study area that deserves more attention.

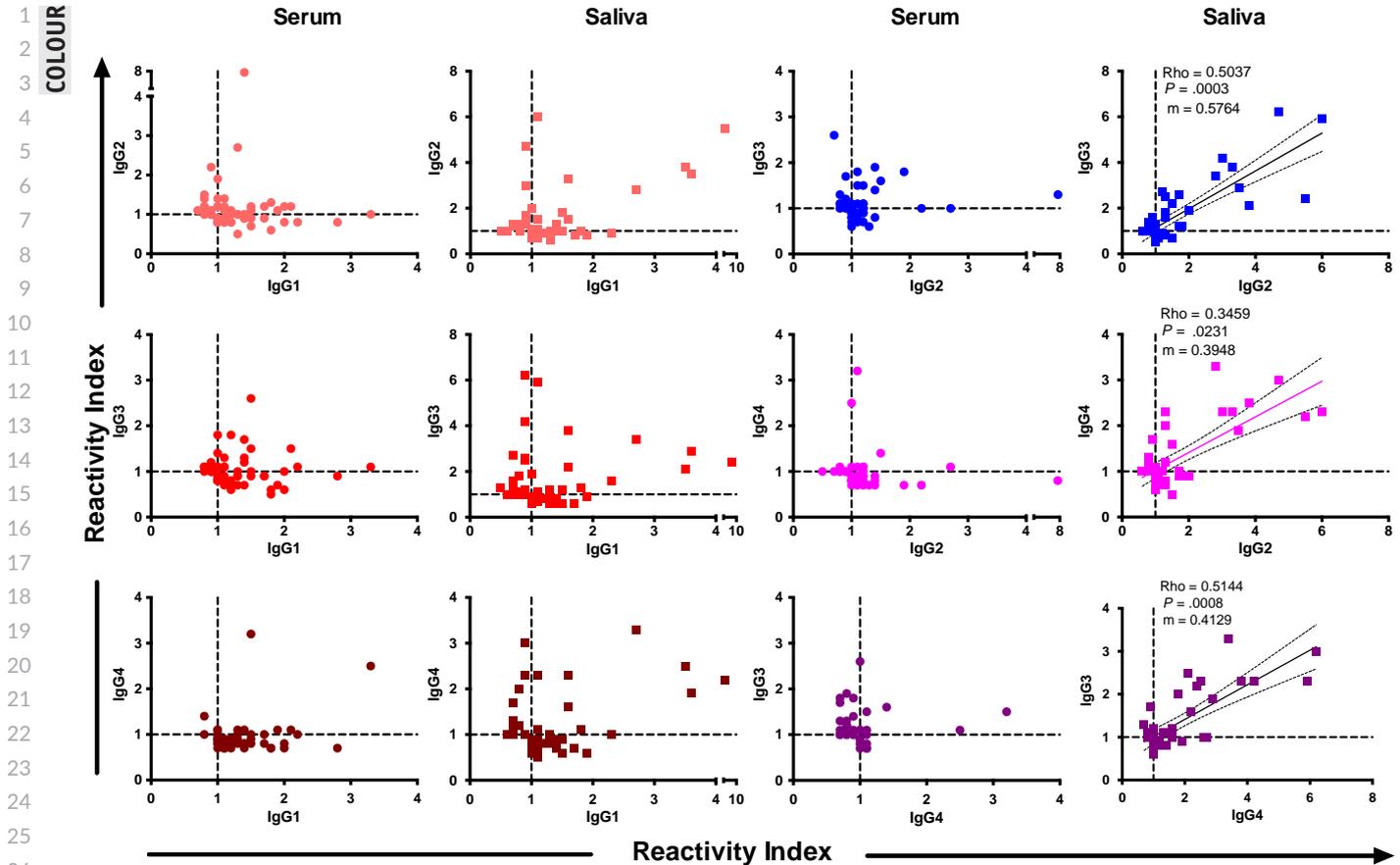


FIGURE 3 Correlations among the 4 anti-*T. gondii* IgG subclasses in serum or saliva samples. Dashed lines represent the cut-off points. Statistically significant Rho values, as well as regression and CI_{95%} lines, are shown in the corresponding graphs. The rest did not show significant correlation among antibodies. Double-negative samples are excluded from the correlation analysis

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Rafael López-Reboseño for his excellent technical assistance and to Dr. Valeria Gómez-Toscano for providing clinical advice to individuals who participated. This work was partially financed by the Institutional grant number 078/2012 and external funds from CONACyT, project 181175.

ORCID

F. Gómez-Chávez  <http://orcid.org/0000-0002-5050-2143>

D. Correa  <http://orcid.org/0000-0002-3354-4421>

REFERENCES

- Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:264-296.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*. 2011;240:269-285.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2001;56:296-305.
- Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol*. 2007;29:651-660.
- Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, et al. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun*. 2010;11:363-373.
- Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:766-778.
- Beghetto E, Nielsen HV, Del Porto P, et al. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. *J Infect Dis*. 2005;191:637-645.
- Rodrigues IM, Castro AM, Gomes MB, Amaral WN, Avelino MM. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:434-440.
- Rodrigues IM, Costa TL, Avelar JB, Amaral WN, Castro AM, Avelino MM. Assessment of laboratory methods used in the diagnosis of congenital toxoplasmosis after maternal treatment with spiramycin in pregnancy. *BMC Infect Dis*. 2014;14:349.
- Hajeer AH, Balfour AH, Mostratos A, Crosse B. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. *Parasite Immunol*. 1994;16:43-50.
- Loyola AM, Durighetto AF Jr, Silva DA, Mineo JR. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *J Oral Pathol Med*. 1997;26:187-191.
- Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, Naguleswaran A, Hemphill A. Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *J Parasitol*. 2005;91:561-563.

13. Chahed Bel-Ochi N, Bouratbine A, Mousli M. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G antibodies in human sera and saliva. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20:468-473.
14. Sampaio BF, Macre MS, Meireles LR, Andrade HF Jr. Saliva as a source of anti-*Toxoplasma gondii* IgG for enzyme immunoassay in human samples. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:O72-O74.
15. Chapey E, Meroni V, Kieffer F, et al. Use of IgG in oral fluid to monitor infants with suspected congenital toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22:398-403.
16. Singh MP, Dubey ML, Sud A, Malla N. Antibody response to *Toxoplasma gondii* in saliva samples from human immunodeficiency virus-infected patients. *Br J Biomed Sci.* 2016;62:81-84.
17. Ee TY, Singh M, Yap EH. The determination of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in different IgG subclasses of human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1989;20:71-79.
18. Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2031-2038.
19. Santana SS, Silva DA, Vaz LD, et al. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunol Lett.* 2012;143:193-201.
20. Cañedo-Solares I, de la Luz Galván-Ramírez M, Luna-Pastén H, et al. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:469-474.
21. de Souza-e-Silva CH, Vasconcelos-Santos DV, de Andrade GQ, et al. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:13-16.
22. Silva CH, Andrade GQ, Januario JN, et al. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:342-347.
23. Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Figueroa-Damián R, et al. Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *J Perinatol.* 2009;29:668-672.
24. Caballero-Ortega H, Castillo-Cruz R, Murieta S, et al. Diagnostic-test evaluation of immunoassays for anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in a random sample of Mexican population. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:642-647.
25. Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol.* 2006;8:535-544.
26. Johnson LL, Sayles PC. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of host-protective mechanisms against *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 1997;186:1799-1802.
27. Rodrigues MM, Wang H-L, Zhang T-E, et al. Partial protective effect of intranasal immunization with recombinant *Toxoplasma gondii* Rhopty protein 17 against toxoplasmosis in mice. *PLoS One.* 2014;9:e108377.
28. McLeod R, Frenkel JK, Estes RG, Mack DG, Eisenhauer PB, Gibori G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol.* 1988;140:1632-1637.
29. McLeod R, Mack DG. Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1986;136:2640-2643.
30. Charde T, Bourguin I, Mevelec MN, Dubremetz JF, Bout D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun.* 1990;58:1240-1246.
31. Charde T, Velge-Roussel F, Mevelec P, Mevelec MN, Buzoni-Gatel D, Bout D. Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunology.* 1993;78:421-429.
32. Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003;67(Suppl 1):S69-S76.
33. Quiding-Jarbrink M, Granstrom G, Nordstrom I, Holmgren J, Czerkinsky C. Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils. *Infect Immun.* 1995;63:853-857.
34. Grunvald E, Chiaramonte M, Hieny S, et al. Biochemical characterization and protein kinase C dependency of monokine-inducing activities of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1996;64:2010-2018.
35. Zorgi NE, Costa A, Galisteo AJ Jr, do Nascimento N, de Andrade HF Jr. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. *Immunol Lett.* 2011;138:187-196.
36. Silin DS, Liao CW, Lyubomska OV, Weng CN. Immunity development following oral vaccination against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a mouse model. *Int J Biotechnol.* 2007;9:381-390.
37. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol.* 2004;59:1-15.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Cañedo-Solares I, Gómez-Chávez F, Luna-Pastén H, et al. What do anti-*Toxoplasma gondii* IgA and IgG subclasses in human saliva indicate?. *Parasite Immunol.* 2018;e12526. <https://doi.org/10.1111/pim.12526>