

**ESTANDARIZACIÓN DEL INMUNOENSAYO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE
IgG anti-*Toxoplasma gondii* EN RATÓN**

NÉSTOR IVÁN CARDONA PÉREZ

**Trabajo de grado para optar al título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL**

Director

JORGE ENRIQUE GOMEZ-MARIN PhD

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
CENTRO INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
GRUPO DE ESTUDIO EN PARASITOLOGÍA MOLECULAR (GEPAMOL)
ARMENIA, QUINDÍO
Mayo de 2005**

RESUMEN

Se describe la estandarización de un inmunoensayo (ELISA) para la detección de IgG contra *Toxoplasma gondii* en ratones. Esta prueba tiene interés como herramienta en el estudio de cepas y en el diagnóstico de la toxoplasmosis en muestras de origen humano. Se determinaron las mejores condiciones para la realización de la prueba (diferentes agentes bloqueadores, diferentes concentraciones de antígeno y concentración óptima de conjugado). No hubo diferencias significativas en cuanto a la función de los agentes bloqueadores por lo que se decidió trabajar con tampón de recubrimiento (buffer coating) con albúmina bovina al 1%. El valor óptimo de concentración de antígeno fue de 20µg/ml y para el conjugado la dilución óptima fue de 1:30.000. El punto de corte fue estimado como el promedio de los sueros negativos + 2 desviaciones estándar (0,135). Todos los sueros negativos presentaron valores de absorbancia a 410 nm menores al punto de corte. No se encontraron diferencias en la detección de anticuerpos contra diferentes cepas de *T.gondii*. Los resultados muestran que la prueba ELISA es altamente sensible y específica y es de gran utilidad para la optimización de los procedimientos que se realizan en animales de laboratorio.

1 INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una infección producida por un parásito protozoario intracelular obligado denominado *Toxoplasma gondii*, el cual infecta al hombre y a la mayoría de animales de sangre caliente, tanto domésticos como salvajes. Este microorganismo fue descubierto en células mononucleares de bazo e hígado en un roedor del norte de África (*Ctenodactylus gondii*) por Nicolle y Manceaux en 1908¹.

Los resultados de varios estudios de seroprevalencia le han adjudicado a *T. gondii* gran importancia por su frecuencia convirtiéndolo en un problema de salud pública importante, por ello es importante el esclarecimiento de su ciclo evolutivo, su epidemiología y de su inmunología. Los valores serológicos positivos hallados hasta el momento, demuestran que aproximadamente la mitad de la población mundial en algún momento de su vida ha sido infectada por este protozoo². En humanos sanos la infección por *Toxoplasma* generalmente no produce sintomatología e induce una inmunidad protectora perdurable contra la reactivación; sin embargo, puede ser una seria enfermedad cuando se adquiere transplacentariamente (toxoplasmosis congénita) o cuando se da reactivación en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos que padecen VIH³.

En la actualidad se disponen de muchas técnicas para realizar un diagnóstico de la toxoplasmosis, sin embargo estas presentan limitaciones en el momento de diferenciar una infección toxoplásmica primaria de una infección crónica. El diagnóstico serológico de la primoinfección se ha basado tradicionalmente en la demostración de IgG e IgM específica anti-*toxoplasma*. En el caso de la IgG es realmente difícil poner de manifiesto esta situación debido a la rápida aparición de estos anticuerpos y al carácter asintomático de la mayoría de las infecciones toxoplásmicas primarias. En el caso de la IgM se presentan problemas de

especificidad (falsos positivos), debido a IgM nativas en un 0,1 % o al encontrarse presente no solo en las primeras semanas de la infección, si no que también hasta en un 5% de los pacientes esta inmunoglobulina tiene la tendencia a persistir por largos periodos de tiempo (meses e incluso años) ⁴.

Respecto a la producción de inmunoglobulinas en animales EISEM *et al* en 1964 ⁵ realizaron estudios sobre la maduración de los anticuerpos tipo IgG y reportan que en los primeros meses de una infección el hospedero responde con la producción de anticuerpos de baja afinidad funcional. Esta afinidad tiene un incremento directamente proporcional al tiempo de la infección.

El beneficio al estandarizar la técnica ELISA IgG en ratón es determinar si se ha logrado una inoculación exitosa de *Toxoplasma gondii* en el animal, permitiendo así evidenciar la producción de IgG cuando se inoculan en el ratón cepas potencialmente crónicas a dosis muy bajas y que tienden a no producir sintomatología; tal es el caso de aquellas a partir de muestras humanas como líquido cefalorraquídeo o placenta y de tejidos de animales como cerebro y corazón de gatos, aves y otros animales silvestres.

2 ESTADO GENERAL DEL TEMA

2.1 Antecedentes

El parásito *Toxoplasma gondii* fue descubierto en 1908 por Nicolle y Manceaux, en el roedor africano *Ctenodactylus gundi*, usado en el Instituto Pasteur de Túnez en investigaciones sobre Leishmaniasis, esto fue poco antes de que Splendore informara el hallazgo del mismo en un conejo de laboratorio ante la Sociedad Científica de Sao Paulo Brasil ⁶.

La existencia de la toxoplasmosis humana se determinó cuando en 1939, Wolf, Cowen y Page identificaron a *T. gondii* en un recién nacido y desde entonces, se aceptó la idea de la transmisión congénita de la enfermedad. En 1942 estos mismos autores llamaron la atención hacia la posibilidad de que la enfermedad causara una interrupción en el embarazo al conocer antecedentes de abortos en enfermas que habían tenido hijos con toxoplasmosis congénita⁷.

Hutchinson en 1965, descubre que las heces de felinos producen toxoplasmosis en animales de laboratorio. Cuatro años después, Siim y Col (1969) encuentran en heces de gatos infectados con ooquistes que a los dos o tres días originan dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno.

Frenkel *et al* en 1970, lograron establecer su verdadera forma de transmisión en la naturaleza, al encontrar que el parásito era indistinguible de *Isospora* del gato, se localiza en el tracto digestivo de los félidos y sus formas infectantes son excretadas en las heces de estos animales. Así se estableció que los parásitos correspondían a un mismo género y especie⁸.

Wallace (1973) y Dubey (1976) indican que menos del 50% de los gatos eliminan ooquistes después de la ingestión de esporozoitos o taquizoitos, mientras que todos eliminan ooquistes luego de la ingestión de bradizoitos.

Dubey y Frenkel en 1976 y 1977, observan que cuando los gatos ingieren cualquiera de los tres estados infectantes van a eliminar ooquistes, después de diferentes periodos de prepatencia para cada uno de ellos: 3 – 5 días después de la ingestión de quistes, 5 – 10 días después de la de pseudoquistes y 20 o más días después de la de ooquistes.

2.2 *Toxoplasma* y *Toxoplasmosis*

2.2.1 *Taxonomía*

El nombre del género es derivado de la palabra *toxon*, que significa en griego arco y hace referencia a la forma de medialuna que presenta el taquizoíto. El nombre de la especie se deriva del roedor *Ctenodactylus gondii* a partir del cual *T. gondii* fue aislado por primera vez. *Toxoplasma gondii* pertenece al phylum Apicomplexa, clase Sporozoa y subclase Coccidia. Miembros en el mismo orden de *T. gondii* incluyen *Isospora*, *Eimeria*, *Neospora* y *Sarcocystis*. *T.gondii* es la única especie en el genero *Toxoplasma*⁹.

2.2.2 *Ciclo de vida*

T.gondii es un parásito intracelular obligado que tiene un complejo ciclo que incluye estadios de fase de vida tanto sexual como asexual, cada uno con diferentes formas (Grafica 1). La principal forma por la cual es transmitida es el quiste tisular (que contiene los bradizoítos) y el ooquiste (que contiene los esporozoítos)⁹. La potencial importancia de la ingestión de alimentos y agua contaminadas que contienen ooquistes es una importante ruta de infección en humanos, lo cual fue confirmado por Wong y Remington, 1993¹⁰.

La infección se da principalmente vía oral por la ingestión de carne cruda o no cocinada suficientemente que contiene quistes tisulares y a través del agua o cualquier otro tipo de alimento contaminados con ooquistes. Seguida de la ingestión, las paredes externas de los quistes u ooquistes se desintegran a causa de la degradación enzimática, y se inicia la fase infectiva al ser liberados los bradizoítos y esporozoítos dentro del lumen intestinal. Estos invaden y se

multiplican rápidamente en las células circundantes, donde se convierten en taquizoítos. Luego se da la distribución de los taquizoítos de *T. gondii* por el rompimiento de las células infectadas, seguida por la invasión de células vecinas, las cuales viajan por vía sanguínea y linfática. Ocurrido esto se da la amplia diseminación del parásito y *T. gondii* invade virtualmente todas las células y tejidos del cuerpo.

El gato es el hospedero definitivo en cuyo intestino se da el ciclo sexual. Este ingiere tejidos con formas quísticas, los que luego de su ruptura liberan bradizoítos. Estos inician la invasión celular y se diferencian en gametos masculinos y femeninos dentro de los enterocitos felinos, allí se da la fusión de los macro y microgametos lo que resulta en la formación del cigoto. Alrededor del cigoto se forma una pared protectora y a partir de este momento recibe el nombre de ooquiste, el cual es secretado al ambiente en las heces. En otros tejidos del gato y otros animales la protección inmune esta asociada con el cese de la replicación e invasión del taquizoíto y la formación de quistes tisulares⁹.

Otras vías de infección en humanos se han dado por transfusiones sanguíneas, transplante de órganos y accidentes en el laboratorio.

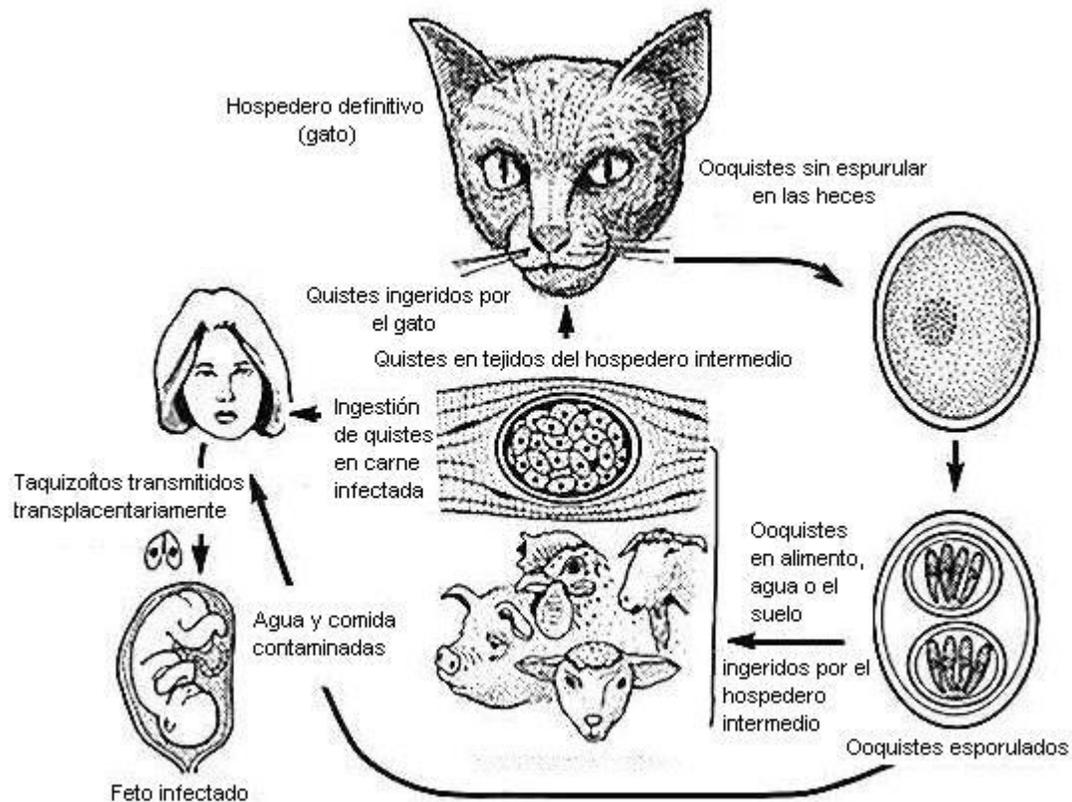


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (tomado de Dubey JP, 1986.)

Ooquistes

Los ooquistes esporulados presentan forma ovoidea y miden aproximadamente 10x12 μm , seguida por la excreción al ambiente. Los ooquistes no son infecciosos hasta que ocurre la esporulación, la cual se da entre 1-5 días dependiendo de la aireación y la temperatura. La esporulación presenta tres divisiones celulares que resultan en ocho esporozoítos infectivos. La viabilidad de los ooquistes es mayor con niveles altos de humedad, así en superficies húmedas pueden permanecer viables hasta por 18 meses. Cuando son ingeridos, los ooquistes se rompen a causa de las enzimas digestivas del hospedero y los esporozoítos son liberados

en el intestino. Dubey *et al.* reportaron que el tiempo de la liberación de los ooquistes en gatos es de 3-5 días luego de la ingestión experimental de carne contaminada con quistes tisulares y de 20-34 días luego de la ingestión directa de ooquistes. Los ooquistes son liberados por 1-2 semanas en un número de hasta 10 millones por día.

La importancia de la comida y el agua contaminadas con ooquistes como substancial ruta de infección en humanos, fue confirmada también por Kasper y Ware, quienes demostraron la presencia de anticuerpos estadio-específicos contra antígenos de ooquistes y esporozoitos en sueros de pacientes infectados y en etapa aguda en una infección asociada con agua. Esta forma de infección se da también por la ingestión de vegetales contaminados con ooquistes.

Taquizoítos

Esta forma asexual es el estadio invasivo de *T. gondii* y mide aproximadamente 7x3 μm . Aunque son células eucarióticas con aparato de Golgi, ribosomas y mitocondrias, necesitan de un hábitat intracelular para sobrevivir y multiplicarse. Pueden infectar células fagocíticas y no fagocíticas y células nucleadas. Su multiplicación se da endocelularmente por endodiogénia, un proceso durante el cual dos células hijas se forman dentro de una célula madre.

Ultraestructuralmente (Grafica 2) los taquizoítos están cubiertos por tres unidades membranales, las cuales forman una película. La membrana exterior es continua, mientras que las dos internas son estrechamente opuestas, discontinuas y terminan en los bordes tanto anterior como posterior en estructuras conocidas como anillos polares. El citoesqueleto está compuesto de 22 microtubulos que estiran el anillo polar anterior a lo largo de todo el parásito. En el extremo anterior

se encuentra el conoide, esta estructura se proyecta durante la entrada del parásito a la célula hospedera⁹. Las roptrias son aproximadamente ocho organelos excretorios como sacos alargados de 2,5 µm que van por el interior dentro del conoide con salida al exterior. Los ductos alargados de las roptrias desembocan en la superficie del taquizoíto^{11,12}. Estos organelos pueden excretar productos con actividad lítica que facilitan y están asociadas a la invasión. Estas sustancias pueden causar vacuolización puntual y desintegración de la membrana celular. Diez proteínas de las roptrias de *T. gondii* se han identificado, donde se destacan la proteína ROP1 de 61 kDa previamente conocida como factor facilitador de penetración o “penetration enhancing factor” (PEF) con actividad lítica contra la membrana celular de la célula hospedera, activa a pH 7,6 y a temperatura 37 °C^{13, 14} y ROP2 de 54 kDa la cual esta asociada con la vacuola parasitofora (VP). La liberación del contenido de las roptrias puede ser coadyuvada por una fosfolipasa Ca⁺⁺ - dependiente^{11, 16}.

Los micronemas son organelos situados cerca de las roptrias y se cree que tienen igual función secretoria⁹. Los micronemas son pequeños organelos apicales encontrados en los estados invasivos de los Apicomplexa y se cree que juegan un papel importante en la exocitosis de su contenido durante la invasión¹⁷. Tres proteínas diferentes han sido descritas en el micronema de *T. gondii*: MIC1 de 60 kDa, MIC2 de 120 kDa y MIC3 de 90 kDa¹⁸.

Los gránulos densos son organelos distribuidos a lo largo del citoplasma del taquizoíto. Su contenido es liberado dentro de la red reticular de la vacuola parasitofora y se ha demostrado que se localizan en la membrana de la misma. Las proteínas de los gránulos densos también son liberadas al medio externo como antígeno excretorio/secretorio o ESA (Tabla 1)^{19, 20}. Los ESA son antígenos que se han encontrado en cultivos celulares infectados con *T. gondii*. Estas

proteínas son altamente inmunogénicas y están implicadas tanto en la generación de anticuerpos como en la respuesta celular⁹.

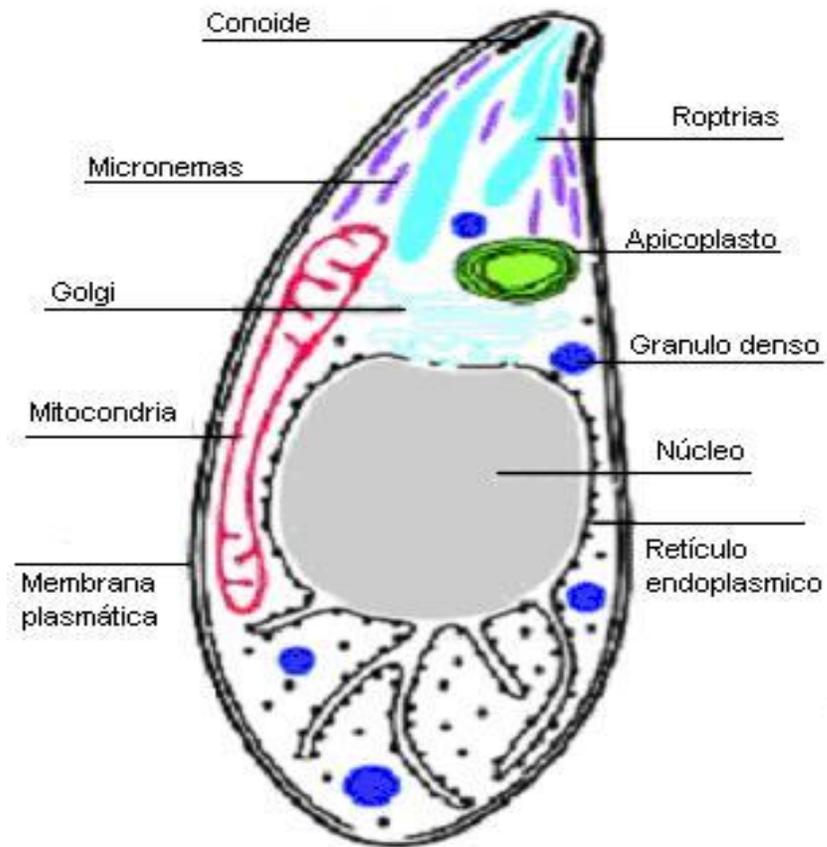


Figura 2. Taquizoíta de *Toxoplasma gondii*

Tabla 1. Proteínas asociadas a los principales organelos de *T. gondii*

<i>Proteínas</i>	<i>Gen</i>	<i>Tamaño kDa</i>	<i>Expresión en el taquizoíto</i>	<i>Expresión en el bradizoíto</i>	<i>Expresión en el esporozoíto</i>
P22	SAG2	19.0	+	-	?
P23	----	----	+	?	?
P30	SAG1	32.9	+	-	-
P35	SRS3	36.2	+	?	?
P43	SAG3	41.8	+	+	?
SRS1	SRS1	44.2	+	-	?
SRS2	SRS2	39.5	+	?	?
P36	BSR4	42.3	-	+	?
P18	SAG4	18.5	-	+	?
SRS4	SRS4	----	?	?	?
SAG5	SAG5	39.1	?	?	?

Tomado de Boothroyd *et al.*1998

Bradizoítos

Los bradizoítos dentro del quiste tisular son la principal forma del organismo que persiste en la infección crónica. El mecanismo envuelto en la transformación del taquizoíto hacia bradizoíto es aun desconocido⁹.

Los bradizoítos expresan antígenos estadioespecíficos pero no expresan niveles detectables de las proteínas mayores de superficie del taquizoíto p22 y p30, por lo que se ha planteado la clonación de genes que expresan para antígenos específicos del bradizoíto. Estos antígenos son objeto de estudio intensivo debido a que son posibles candidatos vacunales. A diferencia de los taquizoítos, los bradizoítos contienen vacuolas citoplasmáticas y son relativamente resistentes al ácido hidroclicórico, la pepsina y a la tripsina. Esta resistencia les confiere la habilidad de resistir el proceso digestivo a pesar de la inmediata ruptura del quiste por la acción de estas enzimas⁹.

Quistes tisulares

El control de *T. gondii* en animales infectados esta asociado con el cese de la replicación e invasión del taquizoíto y la formación de quistes tisulares. Estos quistes varían considerablemente en tamaño, 10-100 μm aproximadamente, pueden contener varios miles de bradizoítos y probablemente persisten en los tejidos del hospedero durante toda su vida.

Existe evidencia de que los bradizoítos pueden escapar sin que se complete la ruptura del quiste. Estos bradizoítos pueden proceder a invadir células vecinas y por esta razón se forman los quistes hijos comúnmente observados en ratones con infección crónica¹⁰.

La membrana externa del quiste tisular es derivada de componentes de la célula hospedera y del parásito. Los quistes tisulares pueden ser detectados a partir de 6 a 12 días postinfección en animales de laboratorio y por lo general su demostración es fácil en el miocardio, el músculo estriado y el sistema nervioso central (SNC).

Freyre *et al.*¹⁰ sugirieron que los quistes en el cerebro residen solamente intracelularmente y que su ruptura intermitente es un evento raro en ratones inmunocompetentes y no son afectados por el envejecimiento del hospedero o la duración de la postinfección.

2.3 EPIDEMIOLOGÍA: Importancia de la Toxoplasmosis

La importancia de este parásito en Colombia de acuerdo con el Estudio Nacional de Salud realizado en 1982, muestra que el 47% de la población posee anticuerpos contra *Toxoplasma* y que la prevalencia aumenta con la edad. Por lo común su adquisición pasa inadvertida para el individuo con adecuado estado inmunitario. Se puede apreciar por las estimaciones basadas en los estudios sobre frecuencia de adquisición durante el embarazo, que cada año por lo menos entre 2 a 12 por cada mil nacidos vivos tendrían toxoplasmosis congénita en Colombia²¹.

En el Departamento del Quindío se estudiaron 937 mujeres embarazadas entre noviembre de 1991 y junio de 1992. Se encontraron 15 casos positivos por ISAGA-IgM. La estimación de nuevos casos para el total de embarazadas en el Quindío (aproximadamente 8.000) fue de 30 a 120 de acuerdo con el resultado de ISAGA-IgM y de 57 a 85 usando un modelo matemático²².

En Colombia, la prevalencia de anticuerpos anti-toxoplásmicos en gatos domésticos es de 62%. En el Quindío, Loango y Sierra en 1995, determinaron una prevalencia de anticuerpos IgG anti-*toxoplasma* en 89,3% de los gatos y en las heces se evidenció presencia de ooquistes esporulados compatibles con coccidias (*Isospora* o *Toxoplasma*) en el 66,6% de los gatos analizados. Desafortunadamente no se pudo confirmar si se trataban de ooquistes de *T. gondii* por que no hubo medición de los quistes ni bioensayos. Es de resaltar que el 53,4% de las personas estudiadas manifestaron contacto estrecho con los gatos y se encontró una seroprevalencia de 78,2% en estas personas. Estos hallazgos sumados a la tasa de toxoplasmosis congénita en la ciudad de Armenia evidencian una elevada circulación del parásito en la ciudad²³.

2.4 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Hasta la aparición de las técnicas de biología molecular, el diagnóstico etiológico de la toxoplasmosis se basó, casi exclusivamente, en la detección de anticuerpos específicos en suero, reservándose las técnicas de inoculación al ratón y el cultivo celular para las infecciones graves o potencialmente peligrosas, como la infección aguda en la embarazada, la toxoplasmosis cerebral y la infección congénita²⁴.

2.4.1 Isotipos de anticuerpos específicos durante la infección

Anticuerpos IgG

La presencia de anticuerpos IgG implica que ha habido contacto entre el paciente y el parásito en algún momento de la vida. La infección aguda o relativamente reciente suele acompañarse con títulos elevados, pero en modo alguno se trata de un criterio diagnóstico definitivo. Si existe la evidencia de una seroconversión o de un aumento significativo del título de IgG entre dos muestras separadas 3-4 semanas, es diagnóstica de infección reciente. En las embarazadas y en los pacientes con inmunodeficiencia grave, el principal valor de las IgG consiste en la discriminación de individuos seronegativos²⁴.

Anticuerpos IgM

Clásicamente, su detección fue considerada como el marcador de la fase aguda de la enfermedad. La evidencia de que los títulos de IgM anti-*Toxoplasma* pueden permanecer detectables durante muchos meses, o incluso años, después de producida la infección primaria ha cambiado sustancialmente este concepto. En

este sentido, el principal valor de las IgM radica en que su ausencia prácticamente descarta la infección reciente. La presencia de IgM, por el contrario, implica la necesidad de proseguir el estudio de un paciente determinado²⁴. La IgM se hace positiva entre una y dos semanas luego de ocurrida la infección.

Anticuerpos IgA

Considerado también como un marcador de fase aguda, se ha comprobado que, si bien al igual que la IgM puede también permanecer positivo varios meses después de la primoinfección, el porcentaje de IgA residuales es mucho menor que el de las IgM²⁴. La aparición de la IgA en respuesta a la infección usualmente es entre la primera y segunda semana del comienzo de la infección, su pico máximo y vida media son parecidos a la IgM⁴.

Anticuerpos IgE

Algunos estudios iniciales sugieren que las IgE anti-*Toxoplasma* aparecen pronto, al inicio de la enfermedad²⁴, siendo el tiempo de aparición de la IgE igual al de la IgA. Al parecer la vida media de las IgE es más corta por lo que desaparecen más rápidamente que los anticuerpos de las clases IgM e IgA, pero permanecen positivas hasta las cuatro semanas posteriores a la infección, por lo cual puede ser útil en el diagnóstico de infección aguda.

2.4.2 METODOS DE MEDICION DE ANTICUERPOS

2.4.2.1 Inmunofluorescencia Indirecta IFI

Esta técnica es muy competente y tiene una alta sensibilidad, además de ser muy rápida para detectar e identificar anticuerpos tipo IgG. Este método permite visualizar la fase de la reacción antígeno anticuerpo. La inmunofluorescencia indirecta tiene dos pasos: en el primero es necesario incubar el antígeno en substrato con anticuerpo contra el mismo y en el segundo se utiliza un anticuerpo secundario anti-IgG marcado con fluoresceína el cual reaccionara con los anticuerpos presentes en el suero que se adhieren al parásito. Se realizan diluciones seriadas del suero a partir de 1:2 y se consideran sugestivos de una infección reciente títulos positivos iguales o mayores de 1:1024 ⁴.

2.4.2.2 Prueba de Sabin y Feldman (1948)

Denominada también prueba de colorante Dye-Test o test de lisis. Consiste en una reacción citoplasmática en la que los anticuerpos de un suero en estudio, en presencia de un factor accesorio, ejercen un efecto citotóxico sobre los parásitos. El efecto se demuestra con la adición de un colorante vital como lo es el azul de metileno alcalino. Los parásitos no modificados no se muestran teñidos o coloreados, mientras que los modificados adoptan una forma redondeada y se tiñen intensamente. Este procedimiento es muy sensible y puede detectar anticuerpos específicos. La prueba resulta positiva desde las fases iniciales de la infección y permanecen positivas durante toda la vida, lo cual favorece la detección de fases agudas. Pese a ser la prueba patrón tiene algunas complicaciones como la utilización de *Toxoplasma* vivo y la exigencia de un factor complementario (properdin + Mg) de difícil adquisición³⁷.

2.4.2.3 Aglutinación Diferencial (Ac/Hs)

La técnica de Ac/Hs compara los títulos obtenidos con taquizoítos fijados en formalina (antígeno Hs) con aquellos fijados en acetona o metanol (antígeno Ac). La preparación Ac contiene antígenos estadioespecíficos del ciclo vital del parásito que son reconocidos por anticuerpos IgG en la fase precoz de la infección. Esta prueba ha demostrado ser muy útil en la diferenciación de las infecciones agudas y crónicas. Este método es utilizado solo para adultos cuyos sueros contienen tanto IgM como IgG y en quienes es necesario definir si existe una infección reciente⁴.

2.4.2.4 Técnica inmunoenzimática ELISA

La técnica ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Además se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA a la obtenida en el RIA (radioinmunoensayo).

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico

clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

2.4.2.4.1 Dispositivos empleados en ELISA

Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes, a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico lo que facilita el aumentar su capacidad de absorción de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, tales como espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA. Actualmente se están desarrollando dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1536 pocillos, adecuados para los sistemas de tamizaje (screening) masivo de los sistemas robotizados (HTS, 'High throughput system')

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son la que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

2.4.2.4.2 Fases de un ensayo ELISA

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

- *Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina).* El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos o sándwich. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno.

- *Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos (Figura 3).* La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.

- *Formación de una o más capas de inmunocomplejos (Figura 3).* En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una mezcla de antígeno y anticuerpo marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.

- *Revelado de la reacción enzimática (Figura 3).* Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría.

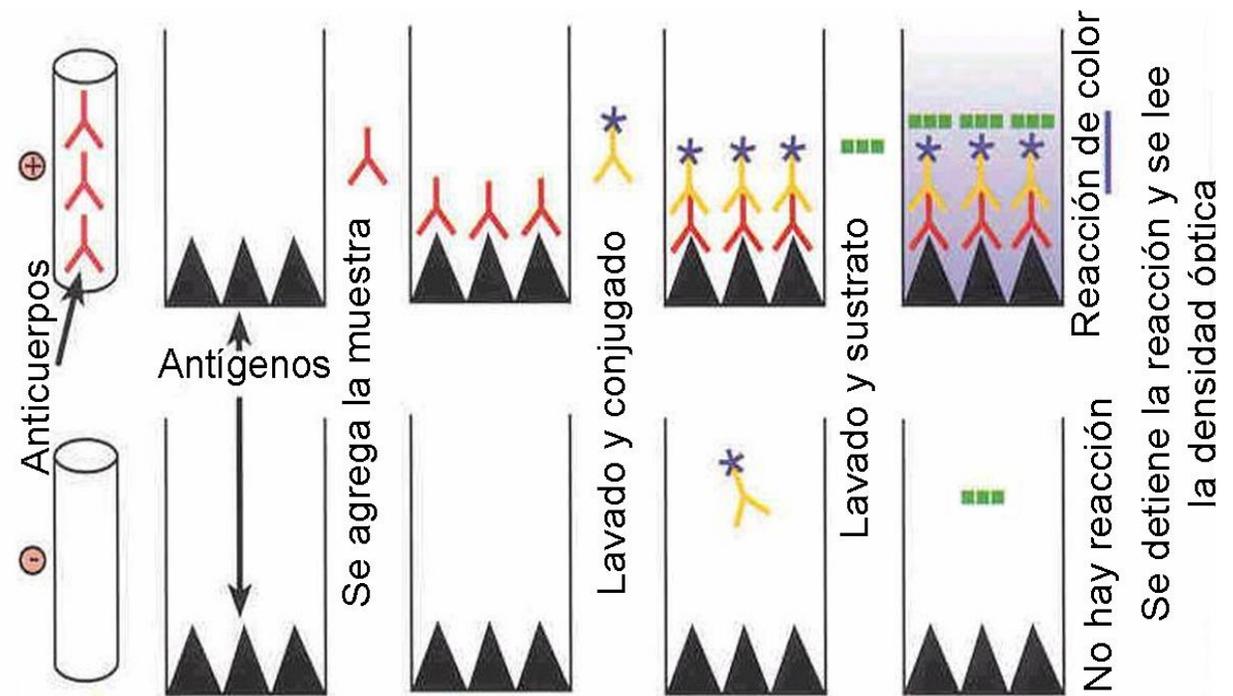


Figura 3. Diagrama de pasos en un ELISA indirecto.

2.4.2.4.3 Tipos de ensayos ELISA

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por Ej. en el clonaje de anticuerpos monoclonales), o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes:

- *ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas)*: Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones encuentra el antígeno en las que se sospecha se. Se incuban con anticuerpos marcados que indican la

presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien si se le ha añadido).

- *ELISA indirecto*: Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran cantidad de antígenos.

- *ELISA 'sándwich' (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos)*: Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

2.5 PRUEBAS DIRECTAS (DETECCIÓN DEL PARASITO)

2.5.1 Inoculación en ratón

El aislamiento de *Toxoplasma* en la sangre o líquidos corporales establece que la infección es aguda. En el recién nacido, el aislamiento del *Toxoplasma* en la placenta siempre es diagnóstico de infección congénita. El microorganismo puede ser aislado por inoculación de especímenes (líquidos corporales, capa leucocitaria de sangre centrifugada, heparinizada o tejido procesado) en la cavidad peritoneal de ratones. Las muestras tisulares deben ser trituradas en solución fisiológica y posteriormente filtradas para eliminar los fragmentos tisulares grandes. El líquido peritoneal de los ratones se debe examinar después de 6-10 días de la inoculación o antes si mueren. Se deben investigar anticuerpos anti-*Toxoplasma* en los ratones. Si hay anticuerpos, el diagnóstico definitivo exige la demostración del microorganismo, por lo general en quistes cerebrales, de hígado o bazo de los ratones seropositivos. Si no se observan los quistes, se hace necesaria la subinoculación de una suspensión de tejido cerebral, hepático y esplénico en nuevos ratones⁴.

2.4.2 Cultivo celular

Del mismo modo se puede recurrir al cultivo de células tisulares para aislar el parásito donde se forman placas que facilitan el reconocimiento de este. El cultivo celular es un método muy difundido y arroja resultados en poco tiempo (3-6 días), sin embargo su principal problema es el presentar una menor sensibilidad que la inoculación en ratón⁴.

2.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Por técnica de PCR se puede detectar ADN toxoplásmico a partir de muestras de humor acuoso, tejidos, sangre, líquido amniótico e incluso orina²⁵ de pacientes con sospecha de enfermedad activa. La PCR es una técnica que fue descrita por primera vez por Mullis y Cols en 1986²⁶. La técnica es una de las más versátiles de la biología molecular y hace posible la detección de virus y microorganismos en fluidos orgánicos. Se ha adaptado para la detección de *Toxoplasma gondii* la cual busca amplificar rápida y fácilmente un gen o fragmento de este o de cualquier segmento de DNA²⁷. Para poder ponerla en práctica se requiere que se conozca la secuencia a ambos lados de la región de DNA de interés y permite que la región entre ellas dos defina el sitio de amplificación. El DNA extraído se desnaturaliza por calentamiento, se alinean a las bandas sencillas dos cortas secuencias denominadas “primers” o iniciadores, los cuales son complementarios a las bandas opuestas en ambos lados de la región blanco. La DNA polimerasa sintetiza una banda sencilla desde el extremo 3’ de cada “primer”. El número de copias de la secuencia crece exponencialmente²⁸.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio se utilizan ratones y ratas debido a que el proceso de infección por *T. gondii* es similar al que se da en humanos³. El modelo animal utilizado para estudiar la infección producida por las diferentes cepas de *T. gondii* es el ratón, pero muchas veces estos no enferman dependiendo del tipo de cepa que se inocule o el estado de virulencia de la misma (por ejemplo: cepas mantenidas por congelación durante largos periodos luego de los cuales presentan atenuación). Por esta razón la infección por medio de inoculación de ratones requiere ser comprobada mediante pruebas serológicas si los ratones no mueren. Esto lleva a la necesidad de estandarizar un ELISA, ya que esta es una prueba inmunológica de alta sensibilidad lo que permite determinar si el proceso de infección fue exitoso o no.

Estudios previos han establecido que la importancia de los anticuerpos en la mediación de la respuesta inmune hacia *T. gondii* depende del modelo de estudio³. En el 2000 Jaimes y León, reportan por la técnica de inmunofluorescencia indirecta basada en el principio de avidéz, una alta concentración de IgG a los 45 días postinoculación en suero de ratones a partir de infección con 40.000 taquizoítos⁴. En el 2001 López *et al.*, también en un modelo murino, reportan títulos de IgG por inmunofluorescencia indirecta según la dosis del inóculo de *T. gondii*, siendo estos más elevados con una dosis de 25 taquizoítos y menores con una dosis de 10 taquizoítos. Lo anterior demuestra una relación directamente proporcional entre la dosis de taquizoítos y el inverso de los títulos de anticuerpos IgG en el ratón²⁹.

Es de gran interés el análisis de la cinética y el perfil isotópico de la respuesta inmune hacia la infección experimental con *T. gondii*, ya sea para la optimización del inmunodiagnóstico o para el entendimiento de los mecanismos de protección³.

Esta técnica sería de inmenso valor para ser utilizada en laboratorios de referencia que requieran analizar muestras tales como líquidos corporales, placenta o biopsia de tejidos.

La estandarización de esta técnica permitirá contar con una herramienta en nuestro medio para el diagnóstico y la investigación en toxoplasmosis, ya que en muchas ocasiones se reciben muestras de líquido amniótico de pacientes infectadas o con sospecha de toxoplasmosis y solo se pueden analizar por PCR, además algunas veces pueden existir muestras negativas para PCR por lo que la inoculación en ratón y su posterior inmunodetección por ELISA se hacen necesarios para diagnosticar la infección y así mejorar el tratamiento del niño próximo a nacer.

4 JUSTIFICACIÓN

Se pretende la estandarización de la prueba ELISA ya que esta es una técnica altamente sensible, específica y versátil y ampliamente utilizada para el diagnóstico de numerosas enfermedades³⁰. Además la técnica ELISA permite procesar gran número de muestras y requiere de pequeñas cantidades de las mismas.

Esta prueba es necesaria para detectar infección con muestras humanas en estudios de caracterización de cepas, ya que estas tienen la tendencia de volverse crónicas en el ratón y no dan síntomas en el animal; por lo tanto, se hace necesario utilizar una prueba serológica que verifique la infección en el ratón²⁹. También es importante para el diagnóstico de toxoplasmosis clínica a partir de líquido amniótico o líquido cefalorraquídeo ya que en ocasiones la inoculación en ratón es más sensible que la PCR.

Esta estandarización permitirá incluir el inmunoensayo ELISA como prueba diagnóstica en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), ya que cuando se usa la inoculación en ratón, el diagnóstico de muestras de líquido amniótico pasa de una sensibilidad del 80% al 90%³¹.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Estandarizar un ELISA indirecto para la detección de IgG contra *Toxoplasma gondii* en ratones (*Mus musculus*).

5.2 Objetivos específicos

- Determinar el mejor bloqueador para uso en ELISA IgG anti-*Toxoplasma* en ratón.

- Cuantificar la concentración óptima de antígeno para la realización de un ELISA IgG anti-*Toxoplasma* en ratón.

- Establecer la concentración de anticuerpo secundario (conjugado) óptima para la realización de un ELISA IgG anti-*Toxoplasma* en ratón.

6 METODOLOGÍA

6.1 Ratones

Se utilizaron 40 ratones blancos suizos (hembras) de la cepa Balb/C proporcionados por el bioterio de la Universidad Nacional de Colombia con 4-5 semanas de nacidos y con un peso aproximado de 20 gramos.

6.2 Parásitos

Se inocularon vía intraperitoneal ratones blancos suizos hembras de la cepa ICR con *Toxoplasma gondii* cepa RH (donada por la Dra. Sánchez, Universidad Los Andes, Bogotá) a una dosis de 100.000 taquizoítos vivos resuspendidos en un volumen total de 0,2 ml de solución salina estéril y antibiótico. Los taquizoítos se recuperaron 3-4 días luego de la muerte espontánea del ratón, practicando lavado peritoneal por medio de instilación de 5 ml de solución salina al 0,8% estéril conteniendo antibiótico (penicilina 1000 unidades/ml y gentamicina 10 µg/ml). Se hicieron observaciones al microscopio óptico y tinción con azul tripan para verificar la presencia y viabilidad de los taquizoítos.

6.3 Obtención de antígeno total soluble de *Toxoplasma gondii*

Se partió de un número de 10^8 taquizoítos de *T. gondii*, los se lavaron dos veces por centrifugación a 2.500 rpm por 15 minutos con solución salina 0,85% con la concentración de antibiótico descrita. El sedimento se resuspendió en 5 ml de solución salina 0,85% estéril y se filtro a través de una membrana estéril de

policarbonato con una porosidad de 3 μm , y se verifico por microscopía que el preparado estuviera libre de células de ratón. El filtrado se centrifugo a 3.500 rpm por 15 minutos, el sedimento en forma de botón obtenido se resuspendió en 1,0 ml de solución salina estéril y se realizo conteo en un hemocitómetro o cámara de Neubauer. A continuación se procedió a realizar rompimiento de membrana de los taquizoítos de *T. gondii* mediante 5 ciclos de congelación/descongelación y 5 ciclos de sonicación a 18.000 Hz por 30 segundos cada uno. Se verificó por medio de microscopia la lisis del parásito. Se centrifugó a 10.000 rpm por 60 minutos, se recuperó el sobrenadante al cual se le determinó concentración de proteínas mediante la técnica de Lowry. A este producto se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasa (PMSF 1mM EDTA 0.5 mM Pepstatina A 1 mM) para evitar la lisis del antígeno y se almacenó a -70°C hasta su utilización³².

6.4 Muestras

Las muestras de suero se obtuvieron a partir de ratones antes de ser inoculados (controles negativos) y luego de 1 mes de postinoculados a una dosis de 100.000 taquizoítos de *T. gondii* (controles positivos) de la cepa RH y vía oral con quistes tisulares de la cepa Prugnialud (donada por la Dra. Dardé, Limoges, Francia) a una dosis de 150 quistes en 100 μL de tejido cerebral homogenizado. La extracción de sangre se hizo practicando un corte apical en la cola del ratón. La sangre se recogió en viales de 1 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 rpm para la obtención del suero.

6.5 ESTANDARIZACIÓN DEL INMUNOENSAYO ELISA

Todos los sueros (positivos y negativos) se diluyeron 1:100 en PBS Tween 20 0,05%. Se prepararon por separado diluciones del antígeno de *T. gondii* de la

cepa RH (1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml) utilizando como diluyente tampón de recubrimiento (buffer coating) (Ver anexos, Figura 4).

Los pozos de las placas (COSTAR®) se colocaron en cámara húmeda y se llevaron a incubación por 2 horas a temperatura ambiente y luego por 16 horas durante toda la noche a 4°C. Se lavaron los pozos por un ciclo (5 veces) con PBS Tween 20. Se bloqueó la superficie de cada pozo con 350 µl de las cuatro condiciones diferentes para cada concentración de antígeno así (Ver anexos, Figura 5):

- a) Buffer coating leche al 5% (Ver anexo 12.2).
- b) Tween 20 al 0,05% (Ver anexo 12.2).
- c) Buffer coating albúmina al 1% (Ver anexo 12.2).
- d) PBS solo (Ver anexo 12.2).

Se lavó de nuevo 5x PBS Tween 20. Se agregaron 100 µl de los sueros con dilución 1:100 a los pozos correspondientes (Ver anexos, Figura 6). Se incubó por una hora a 37 °C. Se hizo un nuevo lavado con PBS Tween 20. Se agregó el conjugado anti-ratón IgG completo para fosfatasa alcalina (SIGMA, St. Louis, MO) a una dilución de 1:30.000 en PBS Tween 20 en cantidad por pozo 100 µl de la dilución. Se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se hizo lavado y se adicionó 100 µl de sustrato para fosfatasa alcalina (p-nitrophenyl phosphate, SIGMA, St. Louis, MO) en cada pozo. Se incubó por 30 minutos y se adicionaron 100 µl de NaOH 8N como solución de parada. Luego se procedió a leer a 410 nm en un lector de ELISA (DYNATECH 5000).

6.6 PRUEBA DE REACCIÓN CRUZADA

Se trabajó para el desarrollo de la prueba de reacción cruzada con sueros de ratones inmunizados con proteína completa de cisticerco de *Taenia solium* (donado por el Dr. Castaño, Universidad del Quindío) e infectados con *Plasmodium berghei* (donado por Dr. Herrera y Dr. Valderrama, Universidad del Valle) utilizando las mismas condiciones de estandarización antes mencionadas. Para la obtención de sueros se inoculó un ratón intraperitonealmente con 100 μ L de sangre con *P. berghei*. A los 3 días postinoculación se realizó un examen de gota gruesa con el fin de verificar la presencia del parásito en sangre, y así sucesivamente hasta completar 1 mes.

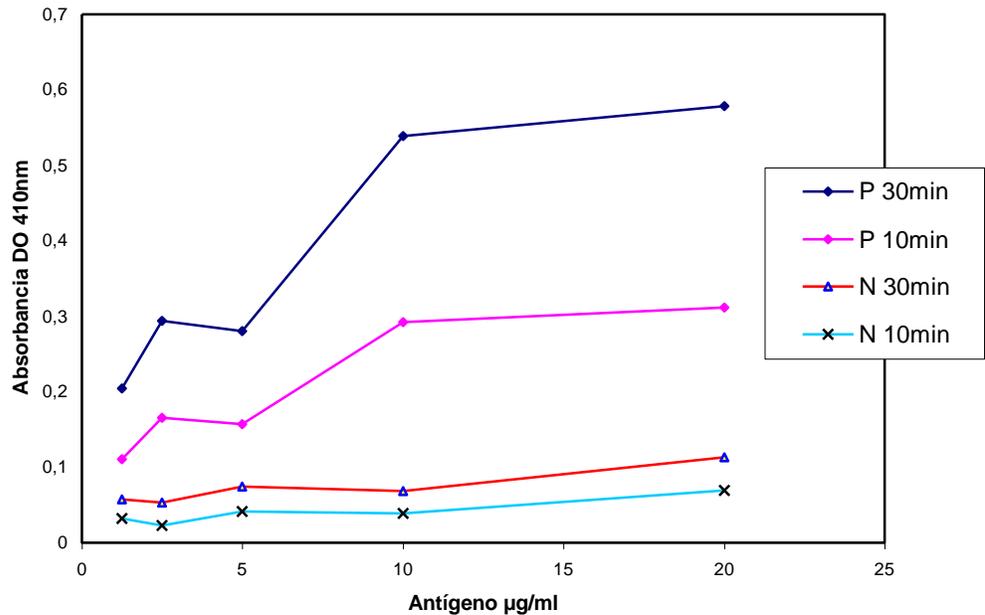
Para cisticerco se inocularon ratones con una primera dosis de 500 μ L de Proteína Completa de cisticerco (PC) + 500 μ L de adyuvante completo de Freund. La segunda dosis se realizó a los 10 días postinoculación con 300 μ L de PC + 300 μ L de adyuvante completo. La tercera dosis se realizó a los 20 días postinoculación con 150 μ L de PC + 150 μ L de adyuvante incompleto. La cuarta dosis se realizó a los 30 días postinoculación con 100 μ L de PC + 100 μ L de adyuvante incompleto de Freund.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados para la concentración de antígeno y revelado con el sustrato

A concentraciones de 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$ no se encontraron variaciones significativas en la densidad óptica (DO), mientras que a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ los valores de DO fueron los más altos (Figura 1). Con relación al tiempo de revelado del anticuerpo secundario con el sustrato, se presentaron mayores valores de DO después de 30 minutos (Grafica 1).

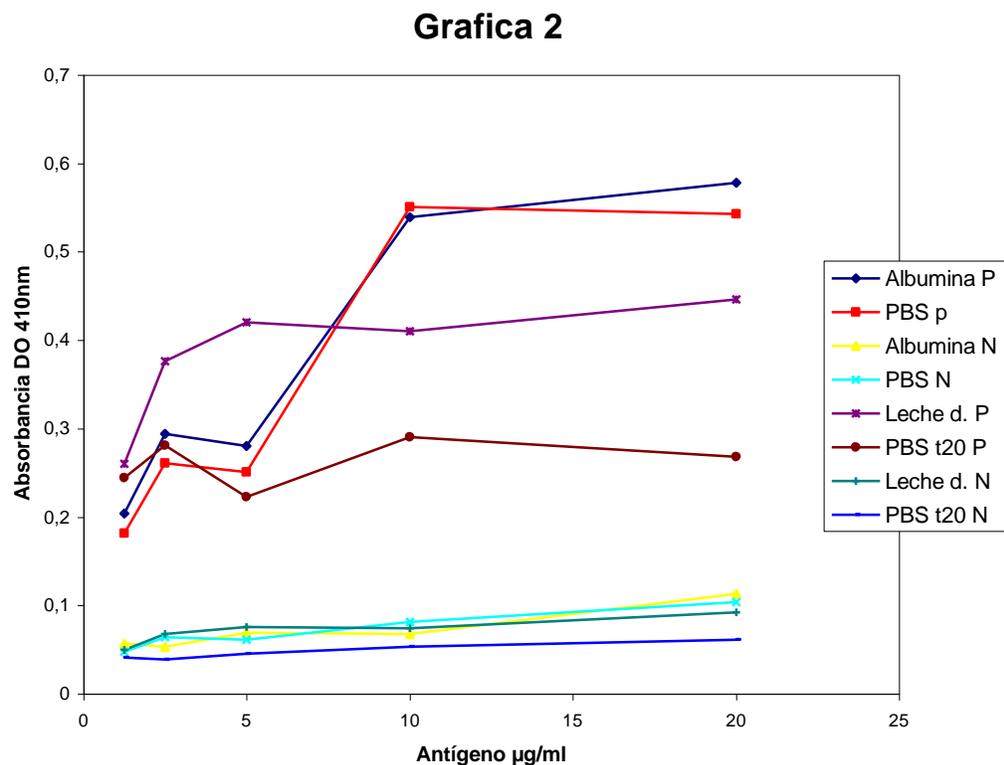
Grafica 1



Grafica 1. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA IgG a los 10 y 30 minutos para sueros positivos (P) y sueros negativos (N) según concentración de antígeno con relación a la D.O. Se observa que los mayores valores de absorbancia (azul) se dieron luego de 30 minutos de revelado con el sustrato. Cut-off: 0,135.

7.2 Resultados para el efecto de los diferentes bloqueadores

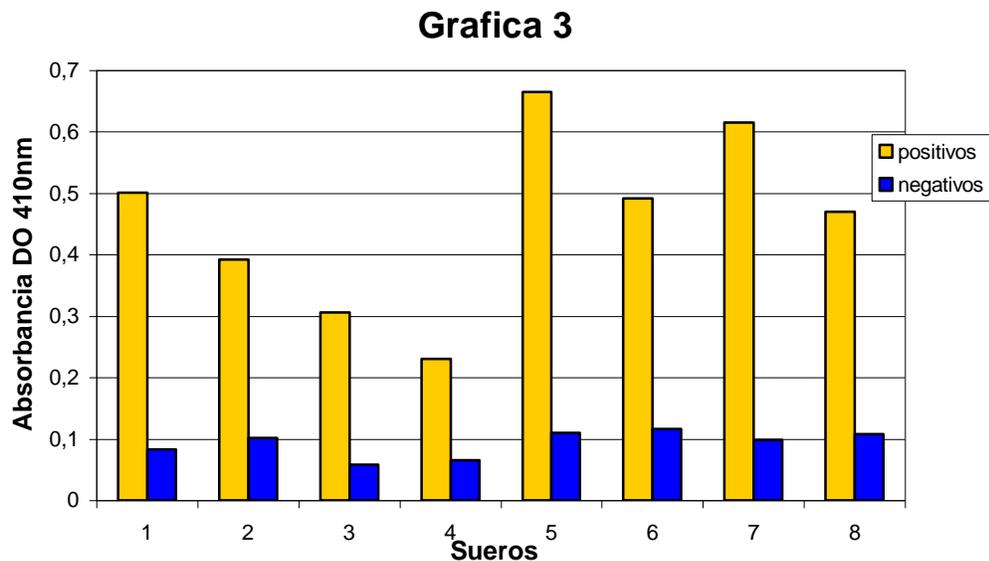
El efecto de cada uno de los agentes bloqueadores permitió la diferenciación entre sueros positivos y negativos. Los mayores valores de DO luego de 30 minutos de revelado con el sustrato se dieron con el tampón de recubrimiento con albúmina bovina al 1%, (Grafica 2).



Grafica 2. Comparación entre bloqueadores según valores de absorbancia obtenidos por ELISA IgG para sueros positivos y negativos. Se observa la clara discriminación de sueros positivos (P) y sueros negativos (N).

7.3 Determinación del punto de corte

Los datos obtenidos en las pruebas ELISA fueron la densidad óptica (DO) para cada muestra de suero analizada. Se interpretaron los resultados de acuerdo a la DO. El punto de corte (cut-off) se calculó como el promedio de los sueros negativos \pm 2 desviaciones estándar (10 sueros negativos en concentración 20 $\mu\text{g/ml}$). El cut-off obtenido fue de 0,135 (Grafica 3). Se consideraron como positivos aquellos sueros que presentaron valores de DO por encima del cut-off. Los sueros-control negativos o verdaderos negativos fueron los sueros de ratón tomados preinoculación de *T. gondii*. Los sueros-control positivos o verdaderos positivos fueron los sueros de ratón tomados 4 semanas postinoculación de *T. gondii*.



Grafica 3. Valores de absorbancia obtenidos por ELISA IgG para sueros positivos y negativos con respecto al cut-off (0,135) con dilución de antígeno 20 $\mu\text{g/ml}$.

7.4 Prueba de reacción cruzada

La reactividad de los sueros de ratones infectados con *Plasmodium berghei* (DO: $0,057 \pm 0,006$) e inmunizados con cisticerco de *Taenia solium* (DO: $0,042 \pm 0,003$) al antígeno de *Toxoplasma gondii* a través del test de ELISA indirecto estuvo por debajo del punto de corte para la correspondiente prueba (DO: 0,154). Se probaron todos los sueros por duplicado. El promedio de los resultados de densidad óptica para los sueros negativos fue de $0,078 \pm 0,034$. Se utilizó como control positivo el suero de 1 ratón infectado con cepa Prugniaud de *Toxoplasma gondii* cuyo promedio de densidad óptica fue de 0.176.

8. DISCUSIÓN

El estadio de taquizoíto de *Toxoplasma gondii* es su forma rápida de crecimiento y por eso es quizás la forma mas ampliamente estudiada gracias a su fácil obtención ya sea por medio de pases intraperitoneales en ratones o en cultivos celulares y por ser uno de los estadios de invasión de importancia en la enfermedad aguda. Por lo tanto en este trabajo se utilizaron taquizoítos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH obtenidos por pases intraperitoneales en ratones blancos suizos, al igual que lo descrito por otros autores¹⁵ y quistes tisulares de la cepa Prugniaud obtenidos por homogenización de cerebro de ratón. No hubo diferencia significativa en los niveles de anticuerpos entre sueros de ratones inoculados con la cepa RH (DO: 0.35 ± 0.11) y con la cepa Prugniaud (DO: 0.36 ± 0.10).

En las enfermedades infecciosas y en particular en las parasitarias lo primordial es establecer el agente etiológico y ello se logra mediante su identificación⁴. En la toxoplasmosis puede detectarse el parásito por inoculación en ratones³³ o en cultivos celulares³⁴; siendo el cultivo en ratón un complemento necesario para el diagnóstico de toxoplasmosis clínica tanto en forma congénita como en el inmunosuprimido^{31,35} a partir de muestras de líquido amniótico o líquido cefalorraquídeo. Cuando se utiliza la técnica de PCR esta resulta ser más sensible que la inoculación en ratón, pero cuando el PCR resulta negativo se debería utilizar la inoculación en ratones, pues en ocasiones es la única prueba que da resultado positivo en un niño infectado²⁹. Cuando se utiliza la inoculación en ratón con fines confirmatorios es necesario utilizar una prueba serológica que verifique la infección en el animal con el fin de optimizar los procedimientos de investigación

en el laboratorio clínico. Se debe tener en cuenta que en ratones la aparición de anticuerpos detectables tiene lugar 4 semanas después de la inoculación²⁹.

La técnica ELISA varía ampliamente de laboratorio a laboratorio, por lo que no hay una estandarización definida en su metodología. En nuestras condiciones los valores de absorbancia mas altos se obtuvieron utilizando concentraciones de antígeno de 20 µg/ml. Sin embargo concentraciones menores permitieron diferenciar entre sueros positivos y negativos. Esto muestra que la técnica tiene buena sensibilidad aun con bajas concentraciones de antígeno. El antígeno utilizado para la prueba ELISA IgG fue de fácil ejecución y de buen rendimiento. El procedimiento de preparación de antígeno tratado por congelación y sonicación presentó resultados satisfactorios, se obtuvo una concentración de proteínas de 1mg/ml.

No hubo diferencia significativa entre agentes bloqueadores por lo que se decidió utilizar el tampón de recubrimiento con albúmina bovina al 1%, este permitió la diferenciación de positivos y negativos luego de 30 minutos de revelado con el sustrato. El inmunoensayo permitió una clara discriminación de sueros negativos y sueros positivos.

La técnica de ELISA tiene una gran ventaja por su simplicidad, sensibilidad y especificidad. La estandarización de la prueba ELISA IgG para diagnóstico serológico de toxoplasmosis en ratón fue realizada con la tentativa de obtener una prueba altamente sensible y específica de aplicación práctica para muchos laboratorios. Se espera que contribuya a determinar si el proceso de inoculación fue exitoso o no y si hubo seroconversión a partir cepas potencialmente crónicas, lo cual es un paso importante para lograr aislamientos exitosos de las mismas en nuestro medio ya sea a partir de muestras humanas o animales.

9. CONCLUSIONES

- Se estandarizaron con éxito las condiciones requeridas de bloqueadores, concentración de antígeno y concentración de anticuerpo secundario (conjugado) para la realización de un ELISA indirecto para detección de IgG anti-*Toxoplasma* en ratones (*Mus musculus*).
- Se demostró que gracias a su simplicidad, sensibilidad y especificidad la técnica de ELISA presenta una gran ventaja en el diagnóstico serológico de toxoplasmosis en ratón.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar un experimento con números de parásitos más bajos a los utilizados en la estandarización con el fin de determinar la cinética de producción de IgG con diferentes inóculos del parásito y además entre diferentes clones de cepas.
- Optimizar el nivel de detección del inmunoensayo para que el diagnóstico se lleve a cabo a partir de sensibilización de fase sólida con péptidos sintéticos, procedimiento que sería de gran ayuda en el estudio y caracterización de cepas de *Toxoplasma gondii*.

11. REFERENCIAS

1. **NICOLLE, C and MANCEAUX, L.** 1909. Sur un protozoaire nouveau de Gondi, *Toxoplasma*. *Archives Institut Pasteur (Tunis)*. 2 :97-103.
2. **SHERRIS, J.C.** 1993. Esporozoos. Microbiología Médica. *Editorial Doyma. España*. Cap 52: 783-815.
3. **GODARD, I., DARCY, F., DESLEE, D., DESSAINT, J.P., CAPRON, A.** 1990. Isotypic Profiles of Antibody Responses to *Toxoplasma Gondii* Infection in Rats and Mice: Kinetic Study and Characterization of Target Antigens of Immunoglobulin A Antibodies. *Infection and Immunity*. 2446-2451.
4. **JAIMES SAAVEDRA M.R., LEÓN PLAZAS M.P.** 2000. Estandarización y evaluación de una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detección de IgG anti-*Toxoplasma* basada en el principio de avidéz. *Trabajo de grado. Bogota. Pontificia Universidad Javeriana*. 20.
5. **EISEN, H.N. SISKIND, G.W.** 1964. Variations of affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry*. 3:994-1008.
6. **FRENKEL J.K.**, (1980), Human Toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica., *J. Trop. Med. Hyg.*, 29(6), 1167-1180p.
7. **BOTERO D., RESTREPO M.**, (1998). Parasitosis Humana 3ª ed., Corporación para investigaciones biológicas, Medellín.

8. **FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. AND MILLER, N.L.** (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocyst. *Science*.167: 893-896.
9. **WONG S.Y. and REMINGTON J.S.** 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*. 7:299-316.
10. **FREYRE A.**, (1998). Los ciclos de *Toxoplasma* inducidos por infecciones con carne y con ooquistes. *Memorias segundo congreso internacional de toxoplasmosis. Universidad de los Andes.*, Santa fe de Bogotá. 1-6.
11. **SADAK A., TAGHY Z., FORTIER B., DUBREMETZ J.F.** 1988. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem Parasitol.* 29:203-211.
12. **SCHWARTZMAN J.D.** 1986. Inhibition of penetration-enhancing factor by *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect Immun.* 51:760-764.
13. **LYCKE E., NORRBY R.** 1966. Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultures host cells. *Br J Pathol* 47: 248-256.
14. **NORRBY R.** 1971. Immunological study on the host cell penetration factor of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 3:278-286.
15. **AGUILAR MENDEZ F.** 2001. Caracterización de la actividad proteasica en antígeno total soluble de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* cepa RH. *Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Bogota D.C.* 50.

16. **SAFFER L.D., LONG KRUG S.A., SCHWARTZMAN J.D.** 1989. The role phospholipase in host cell penetration in *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg.* 4:145-149.
17. **DUBEY J.P., LINDSAY D.S., SPEER C.,** 1998. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinic Microb Reviews.* 11(2):267-299.
18. **BONHOMME A., BOUCHOT A., PEZZELA N., GOMEZ J., LE MOAL H., PINON J.** 1999. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiology Reviews.* 23:551-561.
19. **CESBRON-DELAUW M.F.** 1994. Dense-Granule Organelles of *Toxoplasma Gondii*. Their Role in the Host-Parasite Relationship. *Parasitol Today.* Vol 10 n°8 1994.
20. **CHARIF H., DARCY F., TORPIER G., CESBRON-DELAUW M.F., CAPRON A.** 1990. *Toxoplasma gondii*. Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp Parasitol* 71:114-124.
21. **GÓMEZ J.E., LONDOÑO M.T., CASTAÑO J.C., PÉREZ J.C., RIOS M.P.,** 1993. Epidemiología de infección por *Toxoplasma gondii* en gestantes de Armenia, Quindío, Colombia. *Colombia Médica.* 24: 14-18.
22. **GÓMEZ J.E., MONTOYA M.T., CASTAÑO J.C.,** 1997. A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío, Colombia and application of mathematical models to estimate incidences using age-stratified data. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57: 180-186.

23. **LOANGO CH.N., SIERRA I.M., CASTAÑO J.C., MONTOYA M.T.** 1998. Estudios serológico y coprológico en gatos de dos barrios del sur de Armenia, Quindío, Colombia. *Colbaquin*, Vol 2(1).
24. **SIERRA M., BOSCH J., JUNCOSA T., MATAS L., MUÑOZ C., ANDREU A., BARRANCO M., DOPICO E., GUARDIA C., LITE J., SANFELIU I., VIÑAS LL.** 2001 Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. *SEIMC*, Barcelona, España.
25. **FUENTES I., RODRIGUEZ M., DOMINGO C.J., CASTILLO F., JUNCOSA T., and ALVAR J.** 1996. Urine simple used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *Journal of clinical Microbiology*. 34:2368-2371.
26. **MULLIS K.B., FALOONA F.A., SAIKI R.K., HORN G.T., ELRICH H.A.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 51:263-273.
27. **GROVER C.M., THULLIEZ P., REMINGTON J.S. and BOTHROYD J.C.** 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *Journal of clinical Microbiology*. 28:2297-2301.
28. **LEWIN B.** 1994. "Genes V". *Oxford University Press*. NY. 645-647.
29. **LÓPEZ M.C, CORREDOR A., REYES P., GIRALDO A., FONSECA D., GÓMEZ J.E,** 2001. Estandarización de una prueba de inmunofluorescencia indirecta para IgG anti-*Toxoplasma* en ratón. *Biomédica* 21:79-82.

30. **GUERRERO, J., CALDERÓN G.** 1985. Modelos experimentales para el estudio de la relación hospedero-parto. *1ra. UNMSM-IVITA-American society for microbiology.* 56-59
31. **FOULON W., PINON J.M., STRAY-PEDERSEN B., POLLAK A., LAPPALAINEN M., DECOSTER A, et al.** 1999. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnosis parameters. *Am J Obstet Gynecol* 181:843-7.
32. **CASTAÑO OSORIO J.C., MARTINEZ FUNDORA A.R., SANCHEZ R.M., PEREZ SARRACENT J.** 2003. Producción de anticuerpos monoclonales contra las proteínas mayoritarias de la membrana p30 (SAG1) y p22 (SAG2) de *Toxoplasma gondii*. *Revista de investigaciones Universidad del Quindío* Vol. 4 No. 12. 97-106.
33. **SWARTZBERG J.E. and REMINGTON J.S.** 1975. Transmission of *Toxoplasma*. *American Journal Disease Children.* 129:777-779.
34. **WALLON M., SUN X., GANDILHON F., MOJON M., PEYROA F., COZON G.** 1994. *Toxoplasma gondii* dans liquide amniotique comparaison de 2 lignées cellulaires putt l'isolement en culture. *La Presse Médicale.* 23 :1312.
35. **DIEGO JA, VASQUEZ JJ, PENIN P, FERNANDEZ J, SANCEZ S, GAMILLO C.** 1993. Use of murine subinoculation for the diagnosis an isolation of toxoplasmosis in HIV-infected patines with persistet lymphadenopathy. *Ann Trop Med* 87:179-84.

36. **SERRANO NC, CARDENAS ME.** 1999. Estado Actual del Diagnóstico de la Toxoplasmosis en la Mujer Embarazada y su Feto. *UNAB*. Vol 2 No.4.
37. **SABIN A.B., FELDMAN H.A.** Dyes as a microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*.108. 660-663.

12. ANEXOS

12.1 Esquemas de ensayos para diferentes condiciones de estandarización de la prueba ELISA IgG anti-toxoplasma en ratón



Figura 4. Disposición de las diluciones del antígeno a lo largo de la placa.

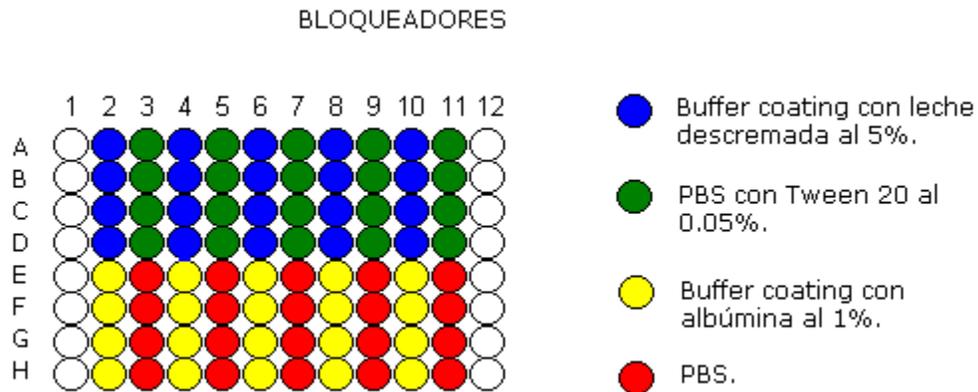


Figura 5. Disposición de cada una de las soluciones bloqueadoras a lo largo de la placa.

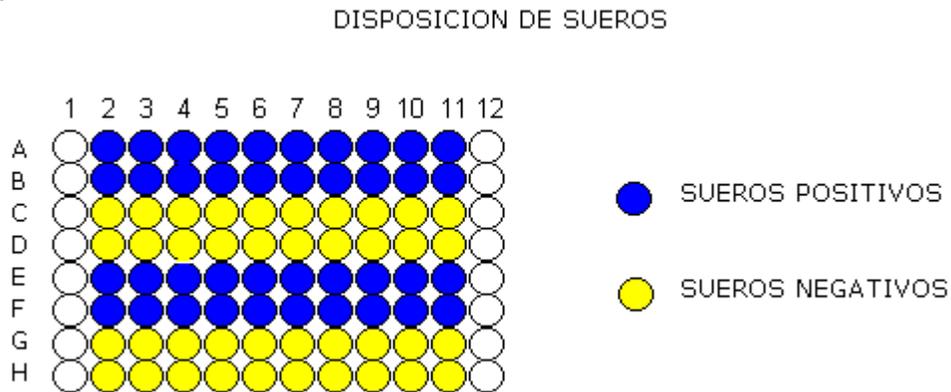


Figura 6. Distribución de sueros negativos y positivos a lo largo de la placa.

12.2 Preparación de soluciones de trabajo

- Preparación del tampón fosfato pH 7.2 (PBS)

Formula para 1 litro

NaCl 8 gr

KH₂PO₄ 0.02 gr

Na₂HPO₄ 1.25 gr

KCl 0.2 g

- Preparación de tampón de recubrimiento (Buffer coating)

Formula para 1 litro

CO₃Na₂ 1.59 g

CO₃HNa₂ 2.93 g

- Preparación de PBS tween 20 0.05 %

Tween 20 0.5 mL

PBS 1 L

- Preparación de buffer coating leche descremada

Leche descremada 5 g

Buffer coating 100 mL

- Preparación de buffer coating albumina 1%

Albumina bovina 1 g

Buffer coating 100 mL