



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Identificación de anticuerpos IgG e IgM  
y correlación del título de corte en una  
población abierta, con posible contacto  
con *Toxoplasma gondii*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**Patricia Elizabeth Estañol Díaz**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**  
**VOCAL:**                       **Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: José Cordero Hernández**  
**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: Julio Cesar Martínez Álvarez**  
**2° SUPLENTE:**               **Profesor: Beatriz Ruiz Villafan**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Anexo del laboratorio 1B, Edificio A, Departamento de Biología,  
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

## **ASESOR DEL TEMA:**

Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos \_\_\_\_\_

## **SUSTENTANTE (S):**

Patricia Elizabeth Estañol Díaz \_\_\_\_\_

Alegria  
Come un lampo di vita  
Alegria  
Come un pazzo gridar  
alegria  
Del delittuoso grido  
Bella ruggente pena,  
Seren  
Come la rabbia di amar  
Alegria  
Come un assalto di gioia

Alegria  
I see a spark of life shining  
Alegria  
I hear a young minstrel sing  
Alegria  
Beautiful roaring scream  
Of joy and sorrow,  
So extreme  
There is a love in me raging  
Alegria  
A joyous,  
Magical feeling

Alegria  
Come un lampo di vita  
Alegria  
Come un pazzo gridar  
alegria  
Del delittuoso grido  
Bella ruggente pena,  
Seren  
Come la rabbia di amar  
Alegria  
Come un assalto di gioia

Del delittuoso grido  
Bella ruggente pena,  
Seren  
Come la rabbia di amar  
Alegria  
Come un assalto di gioia

Alegria  
Como la luz de la vida  
Alegria  
Como un payaso que grita  
Alegria  
Del estupendo grito  
De la tristeza loca  
Serena  
Como la rabia de amar  
Alegria  
Como un asalto de felicidad  
Del estupendo grito  
De la tristeza loca  
Serena  
Como la rabia de amar  
Alegria  
Como un asalto de felicidad

There is a love in me raging  
Alegria  
A joyous magical feeling

**Cirque Du Soleil, Alegría.**

Just wild beat communication  
ame ni utare nagara  
iroasenai atsui omoi  
karada-juu de tsutaetai yo tonight!

nureta sono kata wo  
atatameru you ni daita  
furuete'ru yubisaki wa  
nani wo motomesama you no?

anata no manazashi mamoritai  
kanashimi tsuyosa ni  
kaeru ai wo shinjite

Just wild beat communication  
ame ni utare nagara  
iroasenai atsui omoi  
karada-juu de tsutaetai yo tonight!

**Gundam Wing“Just Communication”**

Agua de Tabasco vengo  
y agua de Tabasco voy.  
De agua hermosa es mi abolengo;  
y es por eso que aquí estoy  
dichoso con lo que tengo.

**Fragmento del poema “Cuatro cantos en mi tierra”  
Carlos Pellicer Cámara**

## Dedicatoria

Antes que nada a la Universidad Nacional Autónoma de México que es como mi segunda casa, porque ella me abrió sus puertas y me recibió cuando yo llegue a esta ciudad, también a la Facultad de Química, ah!!! mi querida facultad, que me enseñó el valor de un 6 con sabor a 10 y me hizo sentir tantas emociones en un solo instante (desde observar la reacción del Na en el medio ambiente en Química General I, hasta el grandioso mundo de los eritrocitos en Hematología), muchas gracias.

A mi asesor Abel Gutiérrez Ramos, que además de mostrarme el misterioso mundo de los parásitos, fue mi guía en este trabajo, para poder conseguir mi más grande sueño de niña e incluso un amigo que me apoyo en situación muy dolorosas y porque no un ejemplo a seguir, muchísimas gracias de todo corazón por su apoyo.

A mis queridos profesores que me mostraron realmente que no me había equivocado en estudiar eso, porque era una pasión que transmitían en cada una de sus clases que hacían que anhelara siempre la siguiente y no fuera una clase más del montón, Alexandro Bonifaz (Micología), Araceli Mendieta (Hematología), Luis Ángel Maldonado (Bacteriología), Perla Castañeda (Toxicología) y Homero Hernández (Biología Celular), muchísimas gracias por es amor a su clase.

A Anita, por su apoyo brindado mientras trabajaba en el laboratorio y por haber sido voluntaria para la toma de muestras y porque no también a todos esos voluntarios que sufrieron mucho por la toma de muestra y algunos sus venas también sufrieron, pero gracias porque sin todos ustedes esto no hubiera sido posible.

A la Dra. Elia Brosla, porque ahí estuvo conmigo siempre, me ayudo a levantarme, a salir de ese hoyo en el que me encontraba y enfrentar al mundo, gracias por ese apoyo incondicional, solo míreme ahora, por fin a cumplir ese pequeño sueño de niña.

A mis padres (papi, tú que me enseñaste ese amor a los animales y el rancho y tu mami que me enseñaste la importancia de la familia) que fueron mi apoyo (en todos los sentido) en este gran camino, que desde niña me decían “Mira mi pato, ahí esta nuestro titulo de la UNAM, la máxima casa de estudios, donde tu entraras hija y tendrás uno igual al de nosotros, que bonitísimo (citando a mi papá) momento será ese en tu vida”, me caí y ustedes me levantaron, llore y me consolaron, reír y me acompañaron, siempre están ahí para mí y mis hermanas a pesar de todo e incondicionalmente, gracias, en serio muchísimas gracias, los amo con toda mi alma.

Ah!!!! Que decir..... Quien sigue? Jejejejeje mis hermanitas :p esas dos personitas tan importantes, mmmmmmm..... Brenda (bien conocida por la familia como la cucho, pero para mí como tuchitomon, en honor a Digimon,

entre otros, pero shhhh.... Tranquila nadie los sabrá :p) eres la más pequeña, siempre mi hermanita, que aunque tienes un genio del demonio y explosiones emocionales tremendas, siempre está ahí tu apoyo, consejos (aunque pocos, pero los hay) y regaños, pero ahí estas para mí siempre hermanita, te quiero tuchitomon, ahora quien sigue..... tulio?.....ah!!! no Perla jejejejeje :p (conocida como la chiquitita por la familia y por mí como Perly, burlonamente) eres la mayor y por lo tanto más sabia (disfrútalo que lo plasme aquí en mi tesis eh!!! Porque que yo lo acepte nuevamente, nel!!! Hermana) uuhhhhh ..... cantidad de consejos tuyos que recibí, importantes que aunque no quisiera eran cierto, me ayudaste con este sueño, porque fuiste mi hombro en el primer semestre que no me iba tan bien y ahora eres un ejemplo, aunque no lo creas =D, quizás me burle luego de todo el montón de ocurrencias que tienes pero te quiero perla y yo se que lo sabes, a mi modo hermanita, pero te quiero y pues yo sé que no las abrazo mucho y les doy besos, pero las quiero mucho y son realmente importantes para mí, porque si una se equivoca ahí están las otras para ayudarla, gracias mis queridas saltamontes ☺.

A mis tías, primos y porque no también mis sobrinos, que hicieron mi vida en la ciudad más fácil, divertida y emocionante, gracias por ese apoyo y amor que me brindaron, sé que no es fácil cuidar a un trió de niñas desobediente, pero les quiero decir, que lo hicieron muy bien, gracias por enseñarme lo importante que es la unión familiar, muchas gracias.

Ufff.... Ya me eche una hoja y todavía no termino jejejejeje por algo decían que cuando escribo una carta parece más tratado que nada o no Dariel =D

A Luis Ángel, desde que saque unas copias que me rechazaste hasta hoy, siempre has estado ahí, riendo, durmiendo, llorando, dándolo todo, gracias, porque tu fortaleza me ayudo a seguir, incluso cuando creía que todo iba para mal, siempre estabas ahí para mí, solo para mí, no sé cómo agradecerte todo, en serio muchas gracias por haberme hecho sonreír siempre.

A Dariel, rayos sabes que complicado es esto..... te quiero mucho Dary, como lo dices somos como hermanos, porque ahí estuviste cuando estaba por los suelos, me diste esa seguridad que solo tu emanas, reímos por tantas tonterías, pero siempre en equipo, gracias por ayudarme a ser lo que soy :p.

A Fernanda, Dalila, Alejandra, Jacaranda, Abril† (yo se que en este momento tu estas ahí conmigo), Alma Delia, Gerardo, Mario, Fany, Ana Elisa, Ely, Marilin, muchas gracias amig@s porque siempre están ahí y desde el kínder estamos juntas y siempre lo estaremos, I@s quiero con el corazón.

A mis queridos amigos del CCH, Morquecho (amigais), Aracely, Diana, Marisol, Paola, Ruben, Uriel, Paco, que a pesar de no conocerlos me brindaron su amistad incondicional y ese lazo que nos une nunca se romperá, gracias.

A Beto, Francisco, Ulises, Jovani, Enrique y Blanca, porque aunque no lo crean ustedes fueron esos amigos que además de compartir todos la Q, somos como una gran familia, que ahí está para cada uno en las buenas y en las mala, que decir, gracias a unos conocí a los otros, tantas cosas que hemos vivido, que solo les puedo decir, gracias, los aprecio muchísimo y de otros SOY SU FAN.

A Alberto GL, eres un gran amigo, que quiero y aprecio muchísimo, fuiste mi equipo siempre, desde primer semestres incluso mi apoyo moral y ejemplo de ñoñes jejejeje no es cierto, perseverancia, siempre había algo nuevo que aprender de ti y eso era muy bueno, gracias por cada uno de los bonitos recuerdo y chistes tuyos, gracias por permitirme ser amiga tuya, te quiero.

A todo ese montón de amigos que hice en esta hermosa facultad, que por no aparecer tu nombre, no significa que no seas importante, solo que si alguien me faltara, no sería justo, por lo que mejor no escribo nombres, pero tu!!! El que está leyendo esto, déjame decirte que muchas gracias por esos lindos momento que disfrutamos, aunque sean segundos, muchas gracias.

Finalmente, porque no!!! Para darle un toque a esto, gracias a esas criaturitas que estuvieron ahí desde que yo llegue aquí y con sus cantos (gritos), maúllos, mordidas y arañazos hicieron y hacen mis días tan felices, gracias: El verde (paco), Pinky, Francia, Deiker, Kuro, La beba, Michael, La hermosa (caramelo), Iker, Coco, Las negritas, gatitos encontrados y regalados, **MILO Alejandro**, Pan, Toulus, Tulio Miguel Augusto III y Penelope Fritzenbalden (alias penny o pegui según mi tia ale).

# ÍNDICE

I. Introducción	10
II. Marco Teórico	11
Generalidades de <i>Toxoplasma gondii</i>	11
Morfología de <i>Toxoplasma gondii</i>	12
Ciclo de vida	14
Ciclo sexual	16
Ciclo asexual	18
Epidemiología	19
Epidemiología en México	19
Vías de Transmisión	20
Respuesta inmune contra <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Respuesta inmune celular	20
Respuesta inmune humoral	23
Manifestaciones Clínicas	24
Diagnóstico	25
Estudios de gabinete	25
Identificación histológica	26
Aislamiento del parásito	26
Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	26
Prueba de Sabin y Feldman	26
Inmunofluorescencia Indirecta (IF)	27

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	27
Prueba de avidéz	28
Western blot	28
Tratamiento	29
III. Planteamiento del Problema	30
IV. Objetivos	31
Objetivos Generales	
Objetivos Particulares	
V. Hipótesis	32
VI. Metodología	33
VII. Resultados	46
VIII. Discusión	61
IX. Conclusiones	64
X. Bibliografía	65

## 1. Introducción

*Toxoplasma gondii* es un protozoo patógeno de carácter intracelular, capaz de afectar todas las células de todos los tejidos, es muy pequeño e infecta tanto al ser humano como otros animales, siendo su reservorio natural los felinos, principalmente animales domésticos, este libera al parásito en su materia fecal en forma de ooquiste, después de realizar su ciclo sexual en el epitelio intestinal del mismo. Este parásito en el ser humano es causante de la enfermedad llamada Toxoplasmosis.

La infección en humanos es muy común y puede provenir de: a) ingesta de ooquistes (ingerir tierra contaminada, manejo inadecuado de los excrementos de gato) b) comer carne cruda o mal cocida infectada) c) trasplantes de órganos o transfusiones de sangre infectada (transmisión vertical) d) congénita (madre-hijo) e) por mal manejo de cepas de *Toxoplasma gondii*. Solo algunos individuos desarrollan enfermedad sintomática, el establecimiento de una infección e incluso la enfermedad depende de la dosis ingestada, la vía de infección y de la respuesta inmune del individuo, ya que de acuerdo al título de anticuerpos producidos por el organismo (IgG, IgM) es posible determinar si es un individuo infectado, no infectado o si ya se consideraría como una enfermedad, por la sintomatología presentada.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Generalidades de *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* es un protozoo intracelular obligado, fue descrito en 1908 por Nicolle y Manceaux quienes trabajaron en el Norte de África. La especie se designó por el nombre del roedor de donde fue aislado en el Norte de África (*Ctenodactylus gondii*). El género se deriva de la palabra griega *toxon*, que significa arco y se refiere a la forma de media luna que presenta el parásito en forma de taquizoítos, (Figura1).<sup>3</sup>

*Toxoplasma gondii* pertenece al phylum Apicomplexa, a la clase *Sporozoa* y a la subclase *Coccidia*, caracterizado por presentar terminación de punta en un extremo de su membrana externa y estructuras muy complejas en su interior (organelos). (Black 2000). Se encuentra relacionado taxonómicamente con el género *Plasmodium*, *Neospora*, *Cryptosporium*.<sup>9</sup>

Es capaz de invadir a gran variedad de mamíferos (hasta al humano), e incluso a las aves, ya que sus células son susceptibles de infección y multiplicación intracelular.<sup>14</sup>



Figura 1. Microscopia de barrido de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

### 2.1.1 Morfología de *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* tiene un gran número de organelos (Figura 2), principalmente los secretores de proteínas que ayudan a la invasión de la célula hospedera (micronemas, roptrias y gránulos densos), además de otras estructuras complejas que proporcionan una estructura íntegra a *Toxoplasma gondii* además de la dirección de la secreción proteica y permiten que *Toxoplasma gondii* se pueda desplazar en la invasión.<sup>3</sup>

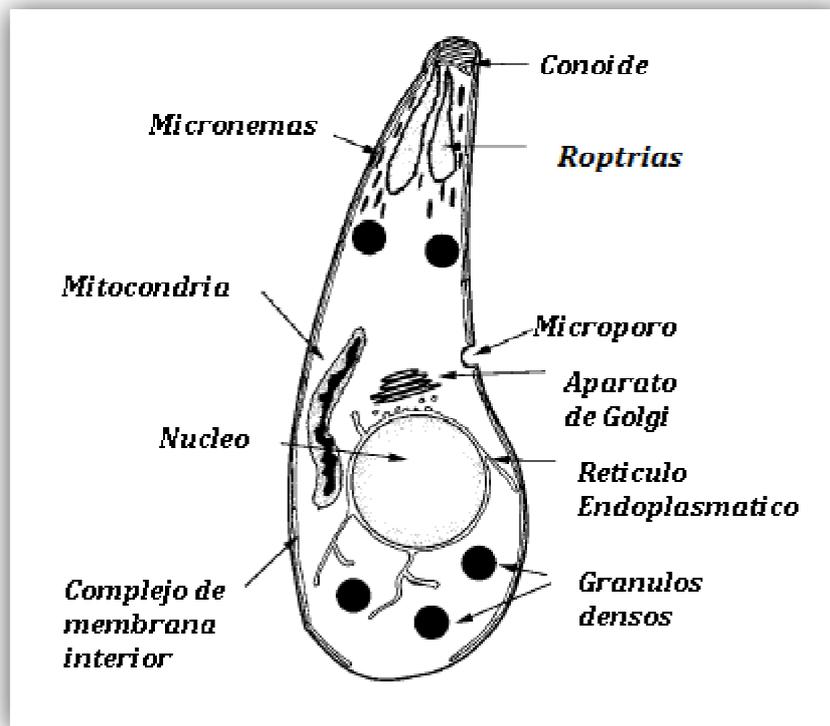


Figura 2. Organelos de *Toxoplasma*.<sup>3</sup>

La función de cada uno de los organelos es la siguiente: los Micronemas: realizan la liberación de su contenido enzimático en el proceso de ataque-invasión, las Roptrias: liberan su contenido proteico en el proceso de invasión de la célula hospedera,<sup>11</sup> los Gránulos densos: descargan su contenido enzimático cuando la invasión esta completa, la Mitochondria es la encargada de suministrar la energía necesaria para realizar todas las actividades, el Núcleo es el encargado de resguardar el material genético, el Complejo de Membrana Interior se encuentra después de la membrana plasmática y corre

desde la zona apical de *Toxoplasma gondii* hasta el otro extremo del mismo, el Retículo Endoplasmático almacena los reservorios de calcio que se libera durante la invasión,<sup>11</sup> el Aparato de Golgi es encargado de la modificación de proteínas, el Microporo: donde se realiza la endocitosis de los sustratos necesarios para el parásito y el Conoide es una estructura en forma de embudo de fibrillas y se encuentra en el centro apical del mismo.<sup>3</sup>

En la parte apical del parásito se encuentran además del conoide, otras estructuras, (Figura 3), que están asociadas con la localización de los micronemas y roptrias, además de ayudar en la organización de los microtúbulos en todo el *Toxoplasma*.<sup>3</sup>

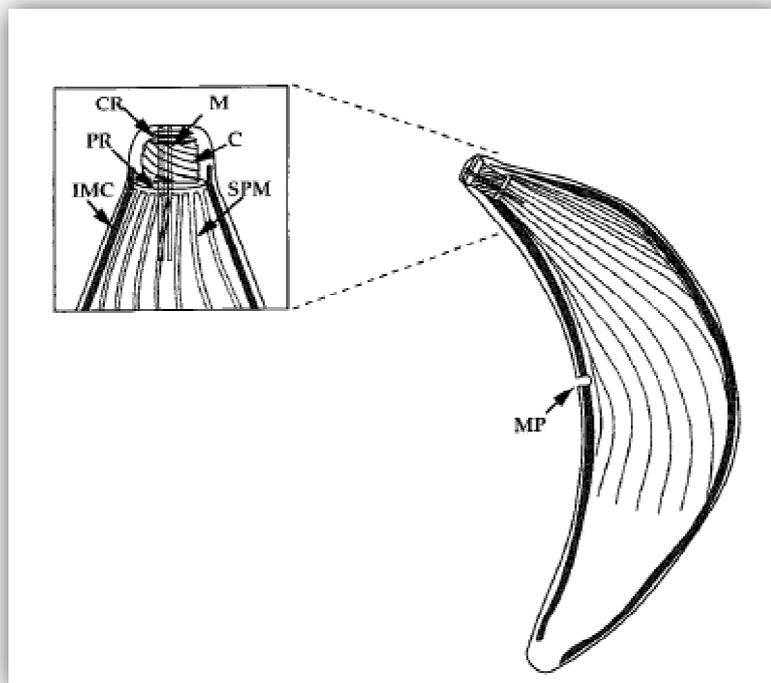


Figura 3. Citoesqueleto de *Toxoplasma gondii*, en el extremo izquierdo se amplía la imagen para facilitar y observar la estructuras presentes, anillo preconoiide (CR), conoide (C), dos microtúbulos apicales (M), anillo polar (PR), sub-película de microtúbulos (SPM), Microporo (MP) y el complejo membrana interna (IMC).<sup>3</sup>

*Toxoplasma gondii* presenta tres formas en las que se puede encontrar en los organismos:

- Ooquiste: Es la fase de latencia, donde le es posible sobrevivir por largos periodos de tiempo fuera del hospedero, por su alta resistencia a factores del medio ambiente.
- Bradizoíto: Es la forma de replicación lenta del parásito, se presenta en conglomerados microscópicos en quistes dentro del músculo infectado y el tejido cerebral.
- Taquizoítos: son formas móviles con motilidad que forman quistes en tejidos, se encuentran en vacuolas dentro de las células infectadas.

## 2.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* fue descrito sólo en 1970, cuando se descubrió que los hospederos definitivos son los miembros de la familia Felidae, incluidos los gatos domésticos.<sup>2</sup> *Toxoplasma* es capaz de infectar y replicarse dentro de cualquier célula nucleada de mamíferos. El ciclo de vida está dividido entre infección felina e infección no felina, correlacionados cada una con replicación sexual y asexual respectivamente.<sup>3</sup>

*Toxoplasma gondii*  
CICLO DE VIDA

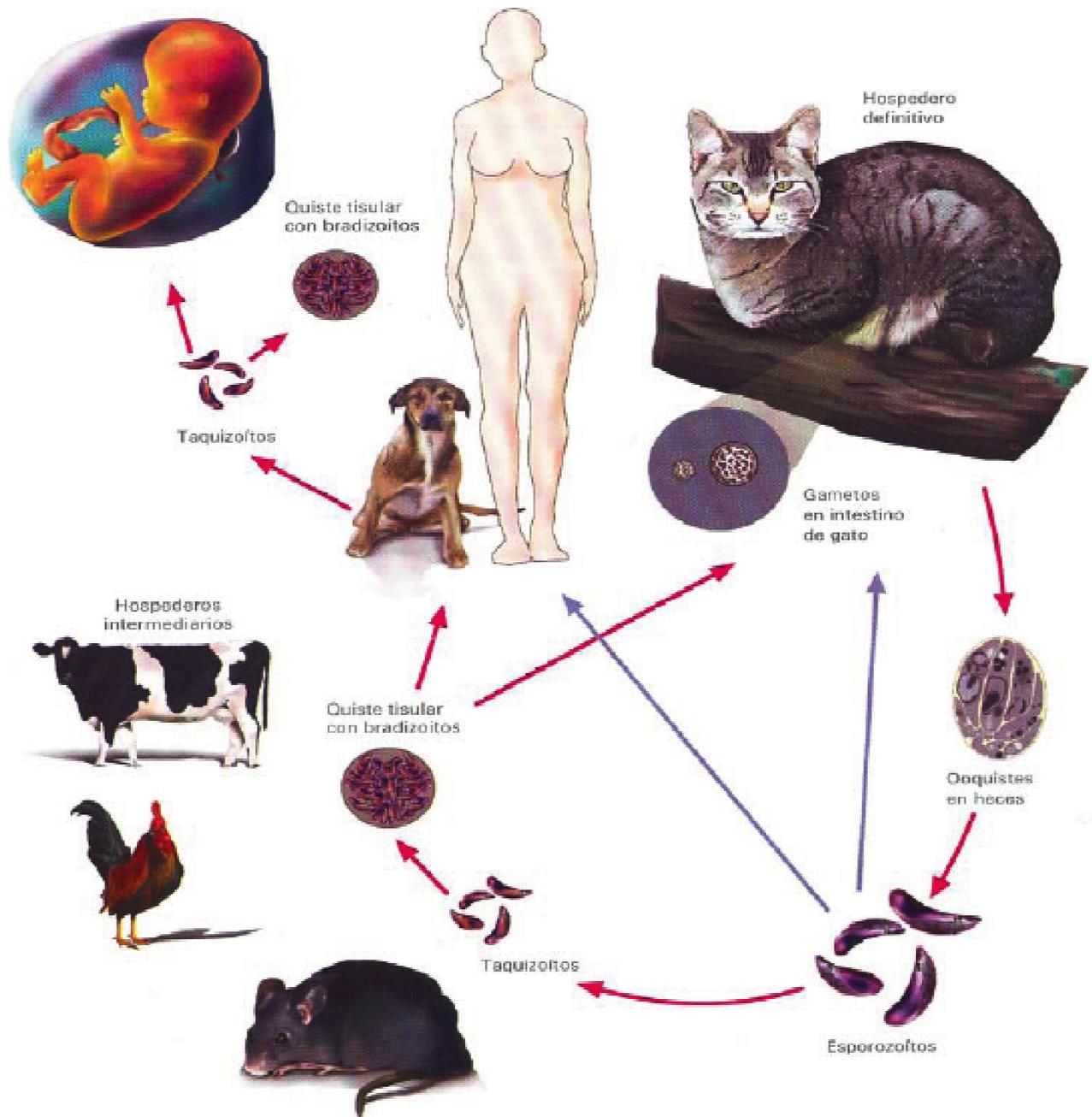


Figura 4. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.<sup>5</sup>

### 2.2.1 Ciclo sexual

*Toxoplasma* se reproduce sexualmente sólo en los felinos. Los microorganismos infectan el epitelio intestinal; se producen los ooquistes y estos se eliminan en las heces. Los ooquistes maduros son de aproximadamente 12 micras de diámetro y contienen ocho esporozoitos infecciosos.<sup>2</sup>

Cuando un gato ingiere carne que contiene quistes en los tejidos, la pared del quiste se disuelve por las enzimas proteolíticas en el estómago y el intestino delgado, causando la liberación de los bradizoítos. Los bradizoítos, que son una etapa de lenta multiplicación, penetran en las células epiteliales del intestino delgado e inician la formación de numerosas generaciones asexuales antes que el ciclo sexual (gametogonia) comience. Posteriormente el gameto masculino, fertiliza al gameto femenino, dos paredes están establecidas en todo el cigoto fecundado para formar el ooquiste, que se excreta en las heces, para la posterior maduración. Figura 5A.<sup>2</sup>

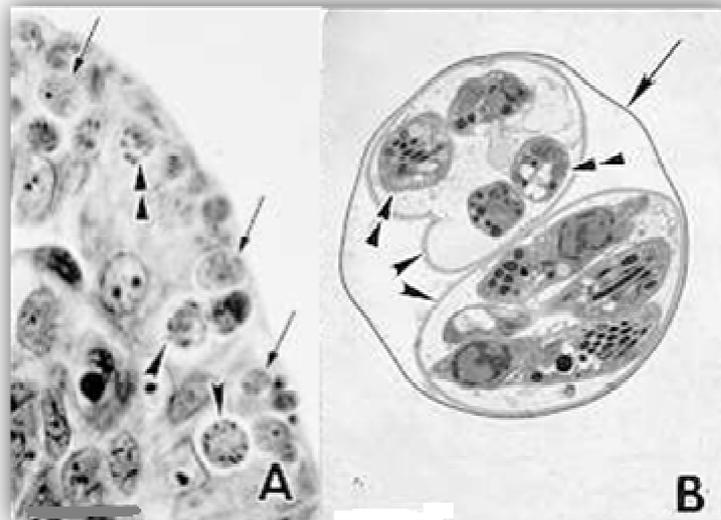


Figura 5.<sup>2</sup>

- A. Endodiogenia (puntas de flecha doble), gametos femeninos (flechas), y gametos masculino (puntas de flecha) en la sección de células epiteliales superficiales del intestino delgado de un gato. Barrido= 15 micras.

B. Ooquiste maduro. Ooquistes de pared delgada (flecha), 2 esporoquistes (puntas de flecha) y 4 esporozoitos (puntas de flecha doble). Barrido 2-25 micras.

Los ooquistes miden aproximadamente 10 por 12 micras. La maduración se produce fuera del cuerpo, y el ooquiste se vuelve infeccioso 1 a 5 días después de la excreción. Cada ooquiste maduro contiene dos esporocistos y cada esporocisto contiene cuatro esporozoitos, Figura 5B. Los ooquistes esporulados son muy resistentes y pueden sobrevivir en el suelo durante varios meses.<sup>2</sup>

Al mismo tiempo que algunos bradizoítos entrar en las células epiteliales superficiales del intestino felino y se multiplican allí para producir ooquistes, otros bradizoítos penetran en la lámina propia y comienzan a multiplicarse como los taquizoítos. Los taquizoítos son alrededor de  $6 \times 2 \mu$  en tamaño y de forma semilunar (Figura 6). A las pocas horas de la infección, los taquizoítos pueden diseminarse a los tejidos extraintestinales a través de la linfa y la sangre.<sup>2</sup>



Figura 6. Taquizoítos extracelularmente (flecha) liberado de las células huésped. Comparar su tamaño con los glóbulos rojos y los linfocitos. Barrido = 20 micras.<sup>2</sup>

Los taquizoítos pueden entrar en casi cualquier tipo de célula hospedera, se multiplican hasta que la célula hospedera se llena de parásitos y muere, la replicación se da entre 6 y 8 horas (in Vitro), saliendo de las células únicamente para poder infectar a las células vecinas, usualmente después de que son alrededor de 64-128 parásitos acumulados por célula. Este ciclo puede resultar en microfocos de necrosis del tejido. El hospedero suele superar esta fase de multiplicación y el parásito entra entonces en el "reposo" etapa en la que están aislados los bradizoítos en forma de quistes tisulares en los tejidos. Los quistes tisulares se forman con mayor frecuencia en el cerebro, el hígado y los músculos. Los quistes en los tejidos por lo general no causan reacción del hospedero y puede permanecer durante toda la vida del hospedero.<sup>2</sup>

### 2.2.2 Ciclo asexual

El hospedero intermediario se puede infectar mediante la ingestión de ooquistes maduros o de quistes tisulares presentes en tejidos de otros hospederos intermediarios.<sup>12</sup> Al ingerir los ooquistes o los quistes tisulares, se liberan los esporozoitos o los bradizoítos, respectivamente, infectando el epitelio intestinal, para producir taquizoítos, los cuales finalmente se diferencian a bradizoítos, apareciendo los quistes tisulares de a 7-10 días post-infección.<sup>3</sup>

## 2.3 Epidemiología

La infección por *Toxoplasma gondii* en los seres humanos es generalizada en todo el mundo. La incidencia de infección en humanos y animales puede variar en diferentes partes de los países. La causa de estas variaciones pueden ser: las condiciones ambientales, los hábitos culturales (higiene, alimentación, edad) y las especies animales (convivencia con gatos) encontrándose entre los factores que pueden determinar el grado de dispersión natural de *Toxoplasma gondii*. En la literatura se reporta que existe una alta prevalencia y exposición al parásito a temprana edad en zonas de gran contaminación del suelo y del agua con ooquistes por la presencia de gatos domésticos o salvajes que deambulan libremente.<sup>14</sup>

### 2.3.1 Epidemiología en México

En México la información es muy escasa, pero de acuerdo a un estudio realizado en todo el país, con muestras de varias regiones, la seropositividad en México varía según la distribución geográfica, es decir, es baja en la zona norte, debido a la aridez y a las altas temperaturas que alcanza el suelo de esa región, por lo que los ooquistes depositados con la materia fecal de los gatos, lejos de madurar, mueren en un poco tiempo.<sup>14</sup>

En cambio en algunos estados de la zona costera es muy alta la presencia de la infección por la similitud con las condiciones bioclimatológicas y socioeconómicas de esas regiones, que además de permitir mayor viabilidad de los ooquistes, los mantienen en cercanía con el hombre.<sup>14</sup>

Se tienen resultados en el norte como una prevalencia media de 11.5% e inferior al 10% en los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Zacateca y Durango,<sup>1</sup> mientras que en la zona costera del sur del país los valores presentan una media mayor del 65%. Donde el sexo no presentó ninguna diferencia, pero por otro lado la edad es donde se presentó la diferencia, con mayor prevalencia en menores de edad, por la contaminación de los menores en los suelos contaminados.<sup>14</sup>

En el caso de la infección congénita, existen dos estudios realizados en la Ciudad de México; el primero en 1962, en el que se encontró que de 1000 recién nacidos, 19 tenían anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*,<sup>7</sup> y el segundo que corresponde al 2005, en el que de 1003 niños recién nacidos de la Ciudad de México se encontraron 2 casos positivos por presentar la infección.<sup>13</sup>

#### 2.4 Vías de transmisión

Los miembros de la familia de los felinos (Felidae) son los hospederos definitivos; otros mamíferos y aves sirven como hospederos intermediarios. El parásito entra en el epitelio intestinal y puede diseminarse a los tejidos del hospedero. *Toxoplasma gondii* se transmite por diferentes formas conocidas<sup>2</sup>:

- Congénita (madre-Hijo).
- Ingesta de carne cruda contaminada, con quistes tisulares o ingesta de ooquistes directamente (Vía oral).
- Transfusión sanguínea o trasplantes de órganos infectados.
- Accidentalmente por manejo de cepas de *Toxoplasma gondii*.

#### 2.5 Respuesta inmune contra *Toxoplasma gondii*

La infección primaria por *Toxoplasma gondii* induce una respuesta inmune específica que protege contra una reinfección.<sup>10</sup> Después de la infección, se presenta inmunidad de tipo celular y humoral contra el parásito.

##### 2.5.1 Respuesta inmune celular

La infección por *Toxoplasma gondii* tiene como característica presentar una fuerte y persistente respuesta inmune mediada por células, para protección del hospedero contra el parásito.

Durante la fase activa de la infección, en la que hay invasión a células, multiplicación y liberación de taquizoítos, puede haber interacción con células presentadoras de antígenos, las cuales procesaran a los taquizoítos y lo

presentaran a través de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, siglas en ingles).<sup>10</sup>

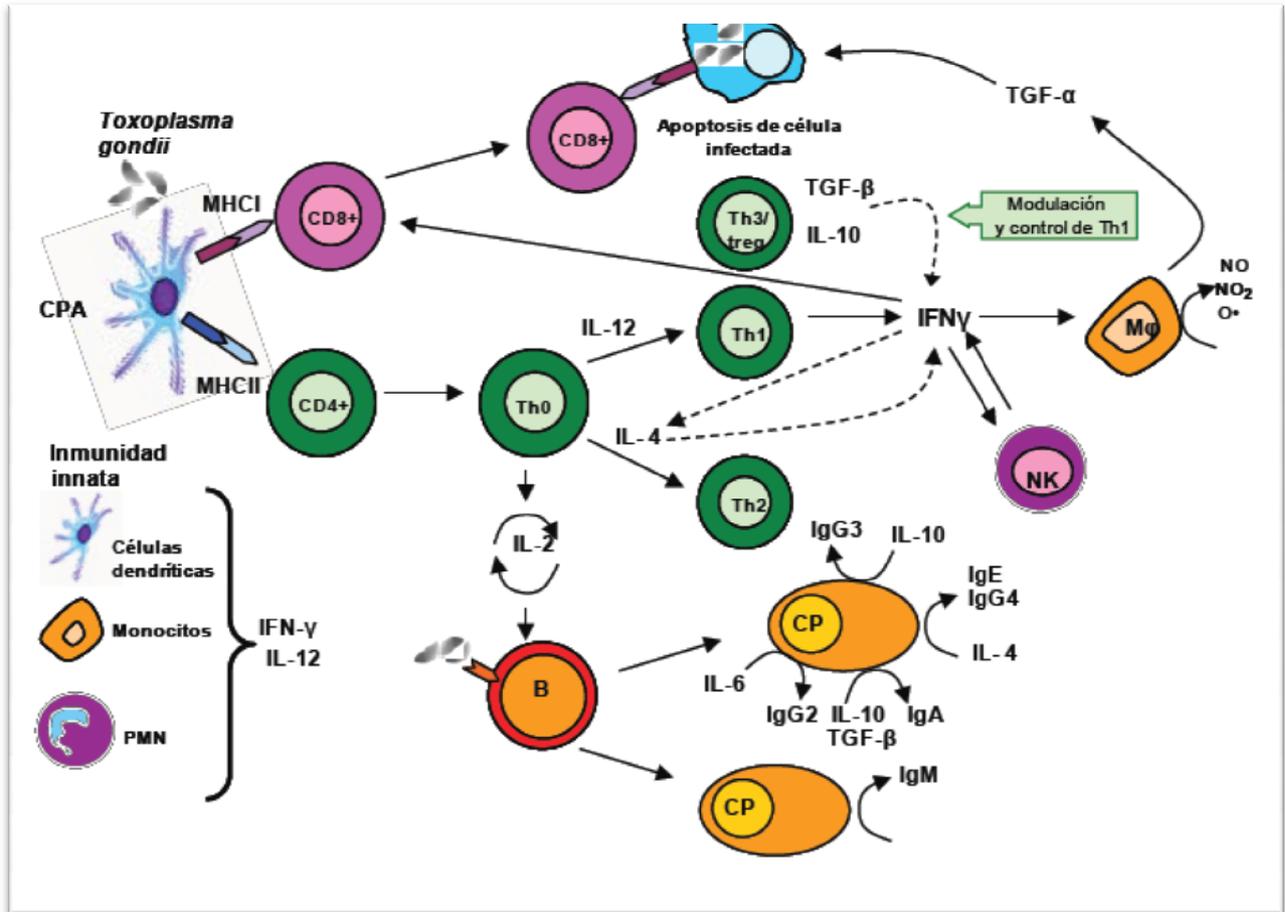


Figura 7. Respuesta inmune celular contra *Toxoplasma gondii*. CPA: células presentadoras de antígenos, MHC I y II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II, NK: células natural killer, PMN: polimorfonucleares, CP: células plasmáticas, Ig: inmunoglobulinas, Mφ: macrófagos, TGF-α: factor de necrosis tumoral alfa, IFN-γ: interferón gamma, IL: interleucina, La línea continua y punteada representan regulación positiva y negativa respectivamente.<sup>6</sup>

Si son presentados por MHC clase I (Figura 7) serán reconocidas por los linfocitos T CD8+, llevándose a cabo el proceso de citotoxicidad para finalmente producir la apoptosis de células infectadas, con una regulación positiva con el Factor de Necrosis tumoral alfa (TGF- $\alpha$ ), secretado por los macrófagos. Por otro lado, si son presentados a través de antígenos clase II, interactúan con linfocitos T CD4+. Si se encuentran citocinas como la interleucina 12 (IL-12), se desarrollará una respuesta tipo Th1, para luego liberar interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que a su vez activará a macrófagos y células natural killer (NK), que son capaces de controlar la replicación de los taquizoítos y activar más linfocitos T CD8+ y CD4+.<sup>10</sup>

Si al inicio de la infección hay IL-4 en el medio, características de una respuesta Th2, no podrá haber control de la replicación parasitaria. Sin embargo una respuesta Th1 prolongará una respuesta inflamatoria excesiva, la cual puede incluso ocasionar la muerte al hospedero, por lo que se debe haber un control mediado por la Interleucina tipo Th3/Treg IL-10 y TGF- $\beta$ .<sup>10</sup>

Al inicio de la infección, los linfocitos T CD4+ liberan IL-2 que activa a los linfocitos B, los cuales se diferencian a células plasmáticas y dan origen a los anticuerpos séricos dirigidos contra el parásito. Por otro lado, algunos antígenos interactúan directamente con receptores de linfocitos B, los cuales producirán anticuerpos de clase IgM característicos de la infección aguda.<sup>10</sup>

Con ayuda de marcadores de yodo radiactivo de la superficie de los taquizoítos y la electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas solubilizadas de la membrana, se ha demostrado la existencia de 4 proteínas principales<sup>10, 4</sup>:

- La proteína p30: La más abundante, constituye el 5% del peso total del taquizoítos, es la encargada de inducir la producción de anticuerpos IgG, IgM e IgA y se ha empleado para el diagnóstico de infecciones agudas en adultos y recién nacidos con infección congénita.
- La proteína p22: Se utiliza para la detección de IgG por método de ELISA.

- Las proteínas p23 (pacientes con infección crónica) y p28, son las más estudiadas.
- También antígenos de excreción-secreción, obtenidos de cultivos en tejido de taquizoítos, los cuales constituyen el 90% del antígeno del parásito que circula en el hospedero.

### 2.5.2 Respuesta inmune humoral

La inmunidad humoral se demuestra por la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en el suero. La primera clase (IgM) aparece al final de la primera semana después de la primo infección, Figura 8. Se pensó que estos anticuerpos eran característicos de la fase aguda, pero se han encontrado meses e incluso años después, sobre todo en mujeres embarazadas y pacientes con Toxoplasmosis adquirida que desarrollan linfadenopatía.<sup>8</sup>

Las inmunoglobulinas de clase A aparecen poco después de las IgM, teniendo una cinética similar a la última, y persistiendo durante 6-7 semanas, aunque puede variar en pacientes adultos y recién nacidos con infección congénita. Para diagnóstico presuntivo de Toxoplasmosis congénita, su detección es de gran valor, ya que puede ser detectada en ausencia de IgM.<sup>8</sup>

Son pocos los estudios sobre la aparición de anticuerpos IgE. Son detectables durante la fase aguda de la infección y pueden ser producidos por algunos recién nacidos con infección congénita. Su presencia regularmente se relaciona con la presencia de complicaciones, como adenopatías y coriorretinitis en casos de reactividad en pacientes inmunodeprimidos. Los anticuerpos IgG aparecen 2 a 3 semanas después de la primo infección, alcanzando sus máximos niveles a los 2 meses y persistiendo a lo largo de meses o años. Jugando un papel importante en la protección al feto, ya que es capaz de cruzar la barrera placentaria.<sup>8</sup>

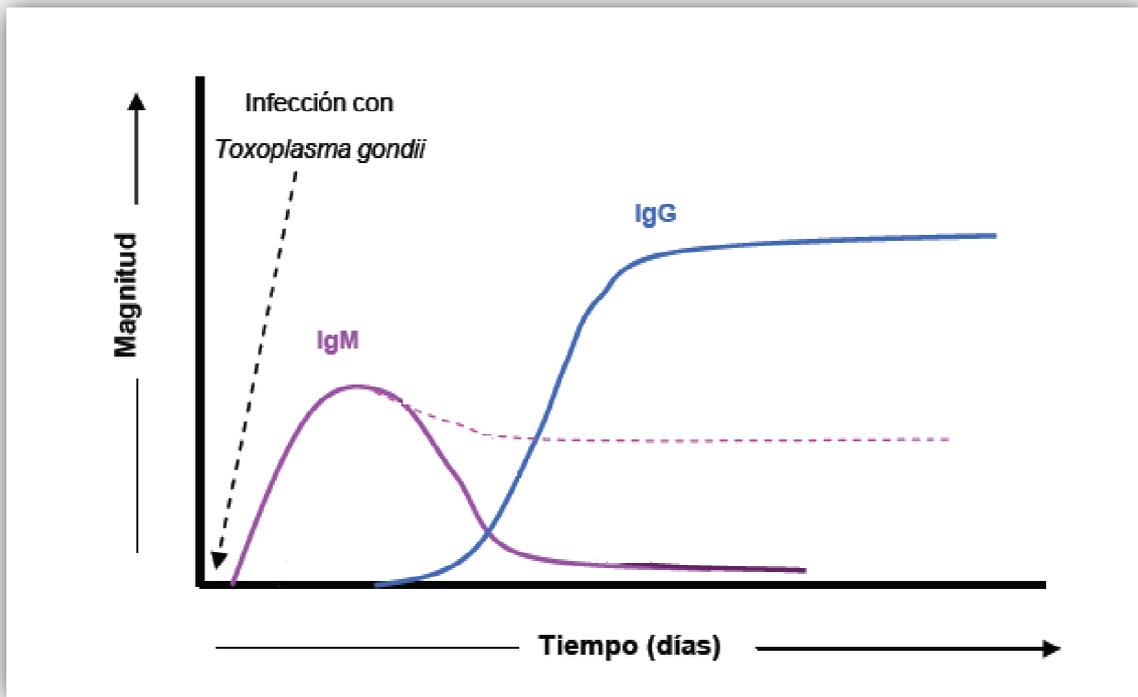


Figura 8. Cinética de la respuesta inmune humoral a partir de una primo infección con *Toxoplasma gondii*.<sup>8</sup>

## 2.6 Manifestaciones Clínicas

*Toxoplasma gondii* suele parasitar los hospederos definitivos e intermediarios sin producir síntomas clínicos. En los seres humanos, una enfermedad grave suele observarse sólo en niños con infección congénita y en individuos inmunodeprimidos, incluyendo pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Las infecciones adquiridas después del nacimiento puede ser local o generalizada y rara vez son graves en individuos inmunocompetentes. La linfadenitis es la manifestación más común en los seres humanos. Cualquier ganglio puede ser infectado, pero los ganglios cervicales profundos son los que comúnmente se encuentran involucrados. Los ganglios infectados no son dolorosos, la infección se resuelve espontáneamente en semanas o meses. La linfadenopatía puede estar acompañada de fiebre, malestar general (tipo gripa), fatiga, dolores musculares, dolor de garganta y dolor de cabeza.<sup>2</sup>

La encefalitis es una manifestación importante y grave de la toxoplasmosis en pacientes inmunodeprimidos, incluyendo pacientes con SIDA. Los síntomas pueden incluir dolor de cabeza, desorientación, somnolencia, hemiparesia, cambio en los reflejos y convulsiones, coma e incluso la muerte en algunas ocasiones.<sup>2</sup>

La enfermedad congénita leve puede consistir en la ligera disminución de la vista, mientras que los niños gravemente enfermos pueden presentar una tétada clásica de signos:

- Coriorretinitis.
- Hidrocefalia.
- Convulsiones.
- Calcificaciones intracerebrales.

La hidrocefalia es la lesión menos común pero más dramática de la Toxoplasmosis congénita y la enfermedad ocular es la secuela más común.<sup>2</sup>

## 2.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la toxoplasmosis puede ser ayudado por el examen serológico. Los signos clínicos de la toxoplasmosis no son específicos y no se puede depender de un diagnóstico definitivo; La toxoplasmosis clínicamente presenta varios síntomas parecidos de otras enfermedades infecciosas (la leptospirosis, enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, encefalitis, mononucleosis, tuberculosis en inmunocomprometidos y sarcoidosis).<sup>2</sup>

Para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii*, se pueden llevar a cabo las siguientes técnicas:

a) Estudios de gabinete:

- Tomografía axial computarizada (TAC).
- Resonancia Magnética Nuclear (RM).
- Radiografía (Calcificación cerebral).

b) Identificación histológica:

- Biopsias de tejidos corporales como musculo estriado y musculo cardiaco (Tinción de Wright, hematoxilina-eosina, inmunofluorescencia específica y tinción inmunoperoxidasa)

c) Aislamiento del parásito

El aislamiento del parásito a través de líquidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo) refleja una infección aguda en el paciente; sobre todo después de la inoculación del líquido en el peritoneo de un ratón y observar su desarrollo entre 6-10 días posteriores. La sensibilidad de este método en el diagnóstico es de la infección es de aproximadamente 90%; aunque presente la desventaja del riesgo de contaminación y el tiempo de espera para el resultado.<sup>2</sup>

d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Consiste en efectuar una replicación respectiva “in vitro” de una secuencia específica de DNA. Al copiar varias veces una misma secuencia se aumenta en forma proporcional la sensibilidad de la misma. El producto amplificado se analiza en un gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio. Clínicamente se ha empleado con buenos resultados para detectar *T. gondii* en líquidos corporales.<sup>2</sup>

e) Prueba de Sabin y Feldman

En la prueba de Sabin-Feldman, se utilizan taquizoítos vivos de *T. gondii* como antígeno y se ven expuestos a las diluciones del suero problema y un factor accesorio. Consiste en observar taquizoítos vivos que pierden su afinidad para ser teñidos por el azul de metileno cuando están en contacto con un anticuerpo específico (prueba positiva), mientras que los parásitos no tratados por estos, se colorean intensamente (prueba negativa). Esta prueba es sensible y hasta el momento es la prueba más específica para toxoplasmosis. Sus principales desventajas son su alto costo y el riesgo humano de la utilización de organismos vivos.<sup>2</sup>

#### f) Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Esta prueba consiste en la fijación de Taquizoítos en un portaobjetos, los cuales se ponen en contacto con el suero del paciente a distintas diluciones. Posteriormente son adicionados anticuerpos conjugados con sustancias fluorescentes.<sup>2</sup>

#### g) Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Consiste en utilizar anticuerpos conjugados a una enzima que se unen a anticuerpos presentes en el suero del paciente, los cuales conservan su capacidad de unión específica al antígeno. Este sistema consiste en adsorber a una fase sólida el antígeno o el anticuerpo, mientras la enzima es capaz de producir una reacción de oxidación-reducción, en la cual el sustrato se convierte en un producto colorido. El porcentaje de sensibilidad de esta técnica es de 90% y de especificidad de 88%.

Existen diversos tipos de ELISA: directo, indirecto y de sándwich. En el método directo, se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indicando la presencia de antígeno en la solución analizada. En cambio, en el método indirecto, el sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. Y en el de sándwich, se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno, después 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 se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado.

Los antígenos más utilizados para esta técnica son:

- La proteína p30: La más abundante, constituye el 5% del peso total del taquizoítos, es la encargada de inducir la producción de anticuerpos IgG, IgM e IgA y se ha empleado para el diagnóstico de infecciones agudas en adultos y recién nacidos con infección congénita.
- La proteína p22: Se utiliza para la detección de IgG.

Las enzimas más empleadas son: peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (FA) y la  $\beta$ -D-galactosidasa (BG). Los sustratos para la enzima HRP son el peróxido de hidrogeno o urea, que al ser reducidos no presentan color pero se acompañan de un cromógeno (o-fenilendiamina, la más empleada) que se oxida y desarrolla color. Los sustratos para la fosfatasa alcalina son el p-nitrofenil fosfato y el 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato.<sup>1,2,5</sup>

#### h) Prueba de avidéz

Se basa en las distintas fuerzas de unión entre el antígeno y el anticuerpo en la infección aguda y crónica. Algunos estudios demuestran que las primeras semanas de la infección predominan las IgG de baja avidéz, mientras que después de la segunda semana predominan las de alta avidéz, la avidéz del anticuerpo se determina mediante ELISA indirecto, colocando las muestras por duplicado y una se trata con urea, ya que la urea rompe los complejo de antígeno-anticuerpo de baja avidéz. El resultado es el cociente de la absorbancia de la muestra tratada entre la no tratada con urea, un valor bajo refleja una etapa más temprana de infección.<sup>4,5</sup>

#### i) Western blot

Es una técnica inmunoenzimática, basada en la unión de anticuerpos específicos en el suero del paciente al estar en contacto con antígenos de *T. gondii* presentes en una membrana de nitrocelulosa.

Los antígenos proteicos son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida, después son transferidos e inmovilizados en la membrana. Posteriormente a la reacción antígeno-anticuerpo se le agrega un segundo anticuerpo unido a una enzima, siendo visible la reacción mediante un sustrato y un cromógeno, el cual revelará la banda en la membrana que reconocieron los anticuerpos específicos. Debido a que esta es una prueba muy sensible (96%) y específica (100%), se ha empleado como prueba confirmatoria, utilizando comúnmente los mismos antígenos que en la prueba de ELISA.<sup>5</sup>

## 2.8 Tratamiento

En el tratamiento se utilizan combinaciones de sulfonamidas (sulfadiazina, sulfametacina y sulfameracina) y Pirimetamina. Donde inhiben la síntesis del ácido dihidrofólico, evitando así que *T. gondii* pueda llevar a cabo la síntesis de su RNA y división celular, por lo que es necesario añadir al tratamiento ácido fólico, el cual puede ser usado por el paciente mas no por el parásito.<sup>2</sup> Los corticosteroides están contraindicados excepto en casos de toxoplasmosis con sintomatología ocular, en cuyos casos se usan en concentraciones bajas.

Para prevenir infecciones con *T. gondii*, La carne debe cocinarse a 66 ° C antes de comer. Las manos deben lavarse con agua y jabón después de manipular carne, nunca deben ser alimentados los gatos con carne cruda, sólo comida seca, enlatada o la carne cocida. Las heces de los gatos debe ser desechadas en de manera correcta y la protección adecuada o ser quemadas. Los guantes deben ser utilizados mientras se trabaja en el jardín y las aéreas de juego infantil deben ser sanitizadas con frecuencia.

### **3. Planteamiento del problema**

El contacto cotidiano con *Toxoplasma gondii* determina una respuesta específica en contra del protozoo, la convivencia diaria con los reservorios naturales o con el mismo parásito en la naturaleza, indica un contacto estrecho y por consiguiente una respuesta específica a largo o corto plazo. La determinación de anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii*, es un indicativo de contacto previo con el protozoo.

Es de suma importancia determinar el porcentaje de individuos seropositivos debido a que en base a las determinaciones de anticuerpos se conocerá la actividad y comportamiento de la infección. Además que se podrá monitorear las diferentes clasificaciones de individuos infectados (infecciones activas, infecciones pasadas y portadores asintomáticos) y así saber la frecuencia de la infección en una población con posible contacto con *Toxoplasma gondii*.

## 4. Objetivos

### Objetivo General

- Obtener el punto de corte en una población abierta con posible contacto con *Toxoplasma gondii*, mediante la técnica de ELISA.

### Objetivo Particular

- Clasificar la seropositividad como individuos infectados, no infectados o en periodo de ventana.

## **5. Hipótesis**

El contacto cotidiano con *Toxoplasma gondii*, induce una respuesta específica, es decir, la convivencia diaria con los reservorios naturales o con el mismo parásito en la naturaleza, indica un contacto estrecho y por consiguiente una respuesta a largo o corto plazo.

## 6. Metodología

Se realizaron 2 determinaciones de los individuos en estudio de una población abierta, la determinación de IgG e IgM específicas, esto se acompañó de una encuesta escrita que sustentara los resultados; se obtuvieron los títulos de corte respectivos y se determinó el seropositivismo de la misma población, Figura 9.

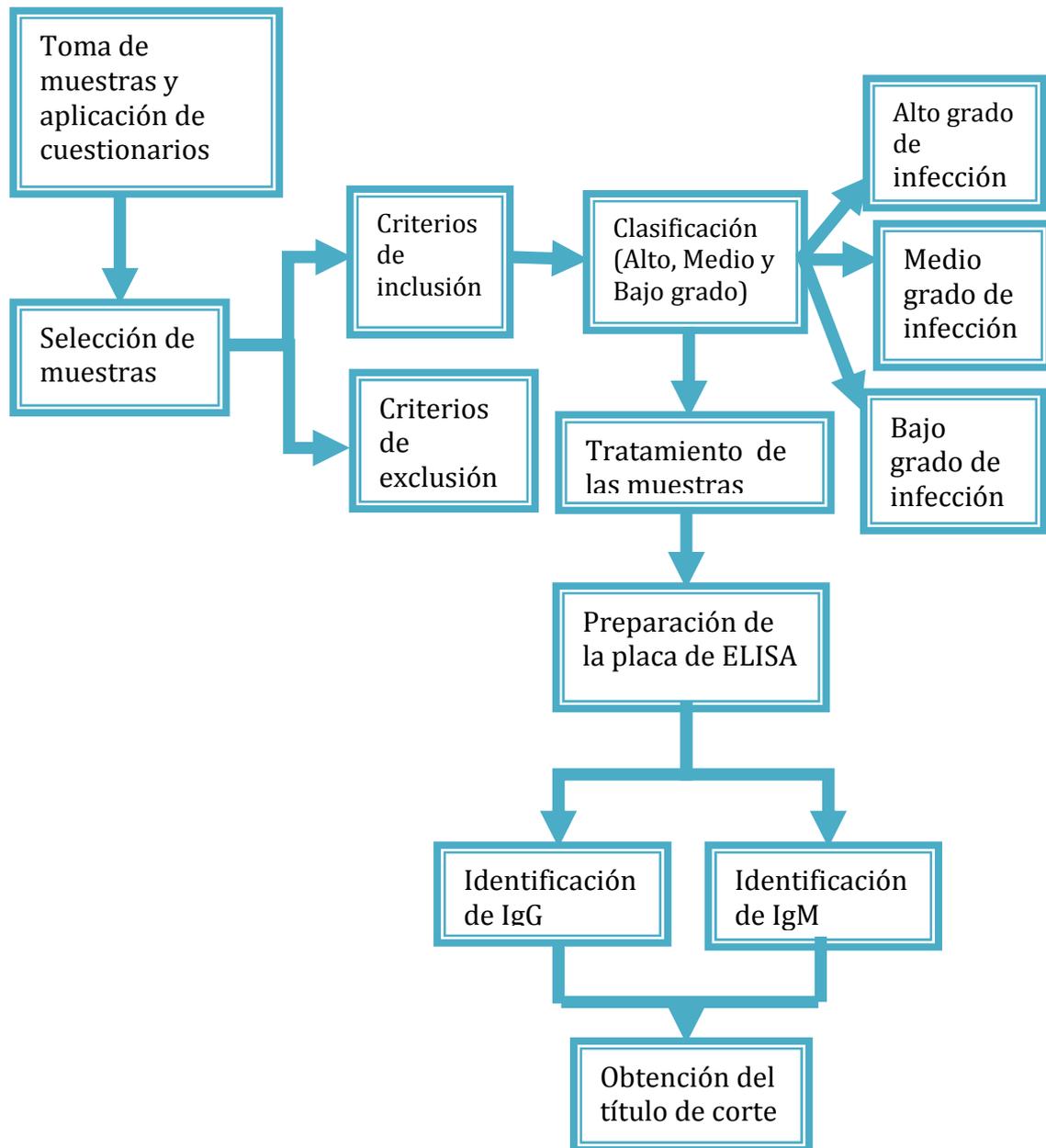


Figura 9. Diagrama de flujo de la estrategia general utilizada.

## 6.1 Obtención de muestras y aplicación de cuestionarios

Se recolectaron 100 muestras de una población abierta voluntaria, aleatoria, estudiantes, académicos y técnicos laboratoristas principalmente y aplicando a cada uno de ellos el siguiente cuestionario (Figuras 10 y 11).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
LABORATORIO DE PARASITOLOGIA

"Protocolo de Investigación de detección de anticuerpos circulantes contra  
*Toxoplasma gondii*"

Nombre (Opcional): \_\_\_\_\_

Sexo: M \_\_\_\_ F \_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
Carrera: \_\_\_\_\_ Facultad: \_\_\_\_\_

Contacto: \_\_\_\_\_

**Cuestionario**

1. Posee mascotas?  
Gato: \_\_\_\_\_ Perro: \_\_\_\_\_ Aves: \_\_\_\_\_ Otro: \_\_\_\_\_
2. Desde cuando ha tenido contacto con su mascota?  
\_\_\_\_\_
3. Cuidado mínimo para la preservación de su mascota?  
Vacunas: \_\_\_\_\_ Desparasitación: \_\_\_\_\_ Higiene: \_\_\_\_\_  
Frecuencia \_\_\_\_\_  
otros: \_\_\_\_\_
4. Convivencia íntima con su mascota:  
Duerme con ella: \_\_\_\_\_  
Come con ella: \_\_\_\_\_  
Convive en el interior de la casa: \_\_\_\_\_  
Convive en el exterior de la casa: \_\_\_\_\_  
Contacto estrecho: \_\_\_\_\_
5. Tiene contacto directo con materiales biológicos de su mascota?  
No: \_\_\_\_\_  
Sí: \_\_\_\_\_ Ejemplo: \_\_\_\_\_
6. Sabe que existen padecimientos parasitarios que se transmiten por contacto con mascotas?  
No: \_\_\_\_\_  
Sí: \_\_\_\_\_ De cuales tiene conocimiento?: \_\_\_\_\_

Figura 10. Cuestionario aplicado a cada voluntario, parte 1.

7. Conoce la Toxoplasmosis?  
No: \_\_\_\_\_  
Si: \_\_\_\_\_

8. Sabe quien produce la Toxoplasmosis?  
No: \_\_\_\_\_  
Si: \_\_\_\_\_ Nombre: \_\_\_\_\_

9. Como considera su Estado General de Salud?  
Excelente: \_\_\_\_\_ Bueno: \_\_\_\_\_ Regular: \_\_\_\_\_ Malo: \_\_\_\_\_

10. Ha presentado alguna sintomatología relacionada con enfermedades transmitidas por mascotas?  
No: \_\_\_\_\_  
Si: \_\_\_\_\_ Cuales: \_\_\_\_\_

11. Ha presentado Linfangitis en alguna etapa de su vida? (Inflamacion de los ganglios)  
No: \_\_\_\_\_  
Si: \_\_\_\_\_ Hace cuanto?: \_\_\_\_\_

12. Ha recibido tratamientos antiparasitarios en alguna etapa de su vida?  
No: \_\_\_\_\_  
Si: \_\_\_\_\_ De que tipo?: \_\_\_\_\_

Criterios de Inclusión:

Criterios de exclusión:

Criterios de eliminación:

Folio No. \_\_\_\_\_

Figura 11. Cuestionario aplicado a cada voluntario, parte 2.

## 6.2 Criterios y clasificación de muestras

Posterior a la recolección del total de muestras, fue necesario realizar un análisis de cada uno de los cuestionarios y con los criterios de inclusión y exclusión fue posible obtener únicamente las muestras útiles para el estudio.

### 6.2.1 Criterios de inclusión

- Contar con una mascota.
- Contacto estrecho con la mascota (interior y exterior de la casa, abrazos, besos, etc.).
- Manejo del material biológico de la mascota.
- Cuidado de la mascota (vacunación, desparasitación, higiene).

### 6.2.2 Criterios de Exclusión

- No contar con mascota.
- No tener ningún contacto con la mascota si lo hay.

### 6.2.3 Clasificación de las muestras

Una vez obtenidas las muestras útiles, fue necesario realizar una clasificación de acuerdo al grado de una posible infección, es decir:

- Alto grado  
Tener como mascota gatos.  
Contacto muy estrecho con el mismo.  
Manejo del material biológico.
- Medio grado  
Tener de mascotas gato y perro.  
Contacto con la mascota.  
Manejo del material biológico.
- Bajo grado  
Tener de mascota perros u otros.  
No hay contacto con la o las mascotas.  
No manejar o poco manejo del material biológico.

### 6.3 Tratamiento de las muestras

Una vez recolectadas las muestras (sueros extraídos de voluntarios sanos, aleatorios) y clasificadas de acuerdo a los criterios utilizados, se mantuvieron congeladas (aprox  $-15^{\circ}\text{C}$ ), hasta el día de su uso.

### 6.4 ELISA directo para la identificación de anticuerpos

Para la identificación de los anticuerpos IgG e IgM, se utilizaron 2 kits de la marca comercial HUMAN:

#### **IgG**



Figura 12. Kit. HUMAN para detección de IgG en suero humano.

Human, Fab-Human GMBH Max-Planh-Ring 21D-65205, Wiesbaden Alemania, Lote 11002 Referencia 51209.

## IgM



Figura 13. Kit. HUMAN para la detección de IgM en suero humano.

Human, Fab-Human GMBH Max-Planh-Ring 21D-65205, Wiesbaden Alemania, Lote 10005 Referencia 51109.

### 6.4.1 ELISA directo para la identificación de IgG

La prueba HUMAN ELISA TOXO IgG está basada en la clásica técnica de ELISA. Los micropocillos de la placa de ELISA ya están recubiertos con antígeno de *Toxoplasma gondii*. Las muestras y los reactivos deben aplicarse a temperatura ambiente (20-25 °C) y estar antes de su uso. Los controles ya están listos para uso, mientras que las muestras fue necesario realizar una dilución de los sueros con el buffer de dilución incluido en el kit, 1/100 (10µL de suero en 1mL de buffer), y preparar una solución de lavado, como se indica a continuación:

#### Solución de lavado (WASH)

Diluir 1 porción de la solución de lavado que se encuentra en el kit con 20 porciones de agua desionizada fresca, por ejemplo: 25 mL de la solución del lavado del kit + 500 mL de agua desionizada = 525 mL de WASH

Una vez diluidos los sueros y preparado la solución de lavado fue posible realizar la prueba, dividiéndola en 3 etapas, como se muestra a continuación:

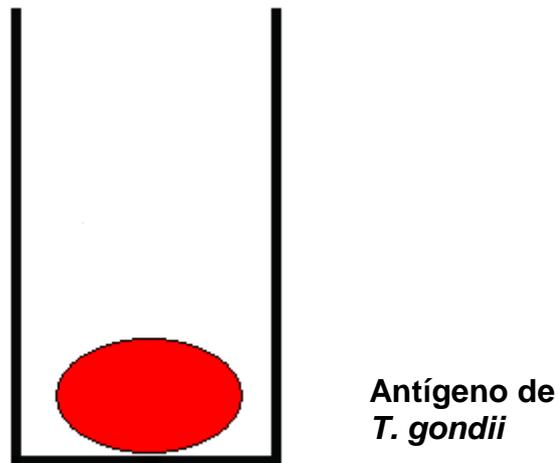


Figura 14. Condiciones en las que se encuentra la placa antes de la adición de las muestras y el resto de los reactivos.

- Etapa 1

Los anticuerpos anti-toxo contenidos en la prueba o el control se fijan específicamente a los antígenos inmovilizados, al final de la incubación los componentes excesivos son eliminados por lavado.

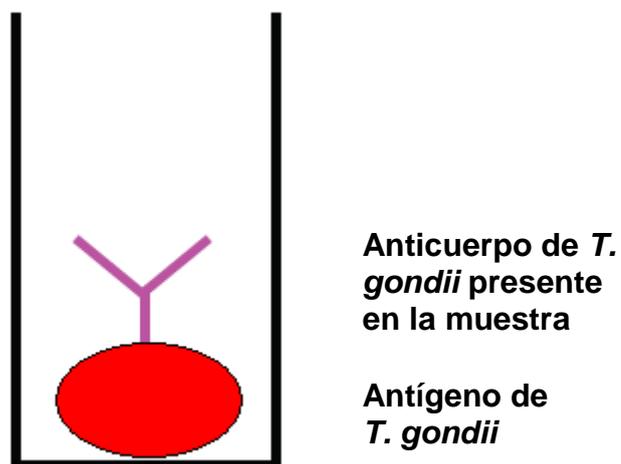


Figura 15. Condiciones en las que se encuentra la placa después de la primera etapa.

- Etapa 2

En esta etapa se añade un conjugado anti-IgG (CON), anticuerpos anti IgG humana, marcados con peroxidasa, que se fija específicamente a la Fv de los anticuerpos IgG, se forma un inmunocomplejo, después se elimina el complejo que no se unió al anticuerpo con lavado.

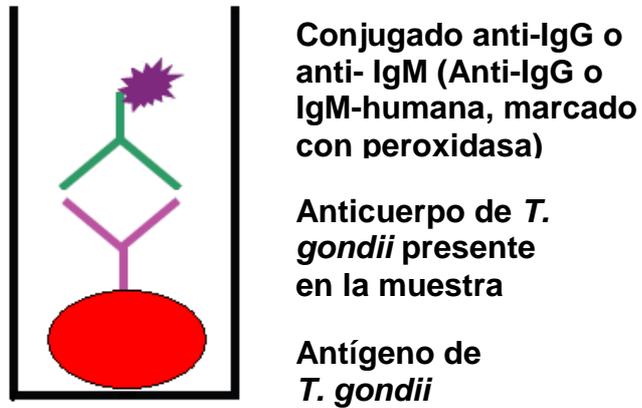


Figura 16. Condiciones en las que se encuentra la placa después de la segunda etapa.

- Etapa 3

Finalmente se añade la solución de TMB/Substrato (SUB), se forma un color azul que se transforma en amarillo después de parar la reacción con la solución de parada (STOP), la intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-TOXO IgG en la muestra.

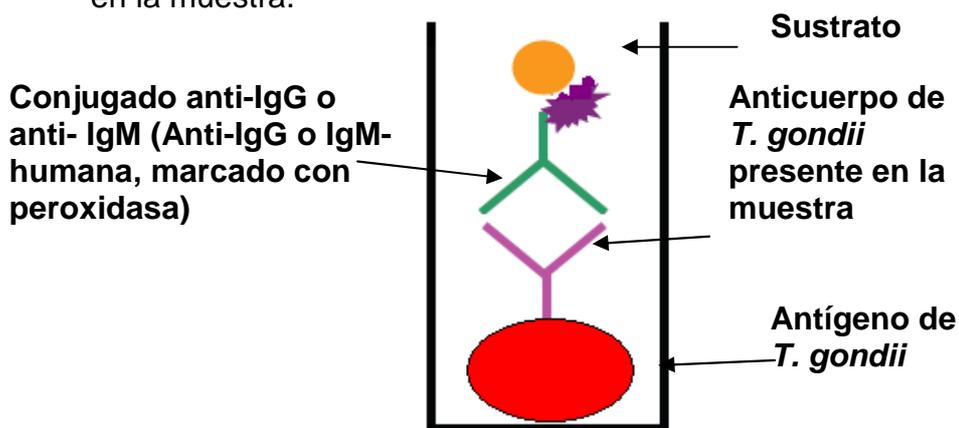


Figura 17. Condiciones en las que se encuentra la placa después de la tercera etapa.

<b>Etapa 1</b>	<b>Pocillos ( <math>\mu</math>L)</b>		
	<b>A1 (blanco)</b>	<b>D1/C2 (Punto de corte)</b>	<b>D2 (Muestras)</b>
Control del Punto de corte	---	100	---
Control positivo bajo	---	100	---
Control positivo medio	---	100	---
Control positivo alto	---	100	---
Muestra diluida	---	---	100
Cubrir la placa con tiras adhesivas e incubar por 30 minutos a 17-25 °C			
Lavar 4 veces con la solución de lavado preparada (WASH)			
WASH	350	350	350
<b>Etapa 2</b>			
CON	---	100	100
Cubrir la placa con tiras adhesivas e incubar por 30 minutos a 17-25 °C			
Lavar 5 veces con la solución de lavado preparada (WASH)			
WASH	350	350	350
<b>Etapa 3</b>			
SUB	100	100	100
Incubar por 15 minutos a 17-25 °C			
STOP	100	100	100
Mezclar vigorosamente			

Tabla 1. Procedimiento realizado para la preparación de la placa de ELISA para identificación de IgG.

Para finalizar se debe medir la absorbancia a 450 nm lo antes posible o dentro de 30 min, después de terminar la reacción. Finalmente este kit nos proporciona la posibilidad de obtener una estimación cuantitativa del valor de IgG, mediante una curva de calibración construida con el valor del control de punto de corte (MCC) y 3 controles positivos (PCL, PCM, PCH), expresado en IU/mL, como es posible observarlo en los resultados.

#### 6.4.2 ELISA directo para la identificación de IgM

La prueba HUMAN ELISA TOXO IgM está basada en la clásica técnica de ELISA. Los micropocillos de la placa de ELISA están ya recubiertos con antígeno de *Toxoplasma gondii*. Las muestras y los reactivos deben aplicarse a temperatura ambiente (20-25 °C) y estar antes de su uso. Los controles ya están listos para uso, mientras que las muestras fue necesario realizar una dilución de los sueros con el buffer de dilución (este buffer contiene anti IgG humana para prevenir interferencia por facto reumatoide y competencia de IgG específica presente en la muestra) incluido en el kit, 1/100 (10µL de suero en 1mL de buffer), y preparar una solución de lavado, como se indica a continuación:

Solución de lavado (WASH)

Diluir 1 porción de la solución de lavado que se encuentra en el kit con 20 porciones de agua desionizada fresca, por ejemplo: 25 mL de la solución del lavada del kit + 500 mL de agua desionizada = 525 mL de WASH.

Una vez diluidos lo sueros y preparado la solución de lavado fue posible realizar la prueba, dividiéndola en 3 etapas, como se muestra a continuación:

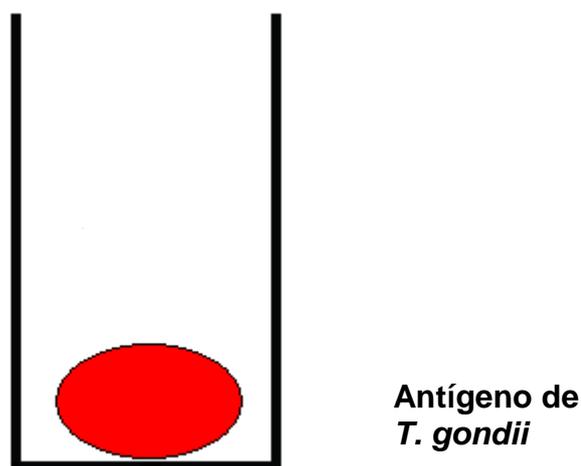
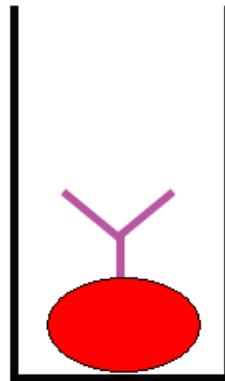


Figura 18. Condiciones en las que se encuentra la placa antes de la adición de las muestras y el resto de los reactivos.

- Etapa 1

Los anticuerpos anti-toxo contenidos en la prueba o el control se fijan específicamente a los antígenos inmovilizados, al final de la incubación los componentes excesivos son eliminados por lavado.



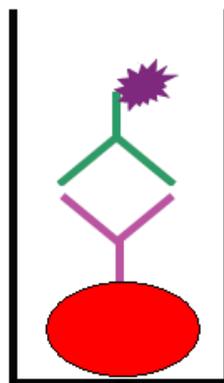
**Anticuerpo de *T. gondii* presente en la muestra**

**Antígeno de *T. gondii***

Figura 19. Condiciones en las que se encuentra la placa después de la primera etapa.

- Etapa 2

En esta etapa se añade un conjugado anti-IgM (CON), anticuerpos anti IgM humana, marcados con peroxidasa, que se fija específicamente a la fracción Fv de los anticuerpos IgM, se forma un inmunocomplejo, después se elimina el complejo que no se unió al anticuerpo con lavado.



**Conjugado anti-IgG o anti- IgM (Anti-IgG o IgM-humana, marcado con peroxidasa)**

**Anticuerpo de *T. gondii* presente en la muestra**

**Antígeno de *T. gondii***

Figura 20. Condiciones en las que se encuentra la placa después de la segunda etapa.

- Etapa 3

Finalmente se añade la solución de TMB/Substrato (SUB), se forma un color azul que se transforma en amarillo después de parar la reacción con la solución de parada (STOP), la intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-TOXO IgM en la muestra.

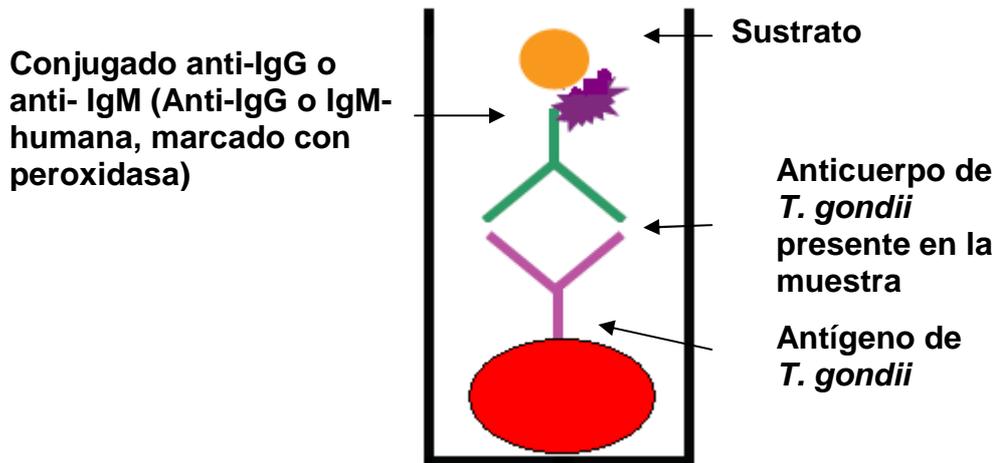


Figura 21. Condiciones en las que se encuentra la placa después de la tercera etapa.

Etapa 1	Pocillos ( $\mu$ L)		
	A1 (blanco)	B1/C1 (Control Negativo) D1/E1 (Control Positivo)	D2 (Muestras)
Control Negativo	---	100	---
Control positivo	---	100	---
Muestra diluida	---	---	100
Cubrir la placa con tiras adhesivas e incubar por 30 minutos a 17-25 °C			
Lavar 4 veces con la solución de lavado preparada (WASH)			
WASH	350	350/350	350
<b>Etapa 2</b>			
CON	---	100/ 100	100
Cubrir la placa con tiras adhesivas e incubar por 30 minutos a 17-25 °C			
Lavar 5 veces con la solución de lavado preparada (WASH)			
WASH	350	350/350	350
<b>Etapa 3</b>			
SUB	100	100/100	100
Incubar por 15 minutos a 17-25 °C			
STOP	100	100/100	100
Mezclar vigorosamente			

Tabla 2. Procedimiento realizado para la preparación de la placa de ELISA para identificación de IgM.

Finalmente se debe medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 30 min, después de terminar la reacción.

## 7. Resultados

### 7.1 Encuestas

#### a) Resultados de encuestas realizadas a muestras de Alto grado de infección

Folios	Mascota					Tiempo con mascota (años)	Contacto			
	Perro	Gato	Aves	Otros	Exterior		Interior	Mat. Biológico	Otro	
1	x	x			22	x	x	x	Abrazos y duermen	
5	x	x		x	4	x	x		Abrazos	
9		x	x		2	x	x		Abrazos y duermen	
13		x			1	x	x	x	Comen juntos	
16	x	x			11		x		Abrazos, duermen y comen	
17		x			12	x	x	x	Abrazos	
19	x	x		x	10	x	x	x	Abrazos	
20		x			6 meses	x	x		Abrazos y comen	
25	x	x			26	x	x	x	Abrazos y duermen	
28	x	x			21	x	x	x	Abrazos y duermen	
30	x	x			8		x	x	Abrazos, duermen y comen	
52	x	x	x		24	x	x	x	Abrazos, duermen y comen	
62		x			17		x	x	Abrazos, duermen y comen	
65	x	x		x	9	x	x	x	Abrazos, duermen y comen	
67		x			13	x	x	x	Abrazos y duermen	
70	x	x	x		11	x	x	x	Abrazos y duermen	
77	x	x	x	x	22	x	x		Abrazos, duermen y comen	

Tabla 3. Resultados encuestas de muestras con alto grado de infección.

Folios	Cuidados mascotas			Desparasitados	
	Vacunas	Desparasitación	Higiene	Si	No
1	x	x	x	x	
5	x	x	x	x	
9	x	x	x	x	
13	x		x	x	
16	x	x	x	x	
17	x	x	x	x	
19	x	x	x	x	
20	x	x	x	x	
25	x	x	x	x	
28	x	x	x	x	
30	x	x	x	x	
52	x	x	x		x
62	x	x	x		x
65	x	x	x		x
67	x	x	x		x
70	x	x			x
77	x	x	x		x

Tabla 4. Segunda parte de resultados encuestas de muestras con alto grado de infección.

b) Resultados de encuestas realizadas a muestras de Medio grado de infección

Folios	Mascota					Contacto			
	Perro	Gato	Aves	Otros	Tiempo con mascota (años)	Exterior	Interior	Mat. Biológico	Otro
7	x		x	x	20	x	x	x	Abrazos y Duermen juntos
8	x		x		23	x	x	x	Abrazos
10	x				22	x	x	x	Abrazos y comen juntos
11	x				4	x	x	x	Abrazos
15	x				10	x	x	x	Abrazos y comen juntos
18	x				3	x	x	x	Abrazos, Duermen y comen juntos
26	x				12	x	x	x	Abrazos, Duermen y comen juntos
32	x		x	x	24	x	x	x	Abrazos y comen juntos
34	x				10	x	x	x	Abrazos y Duermen juntos
43	x				2 1/2		x	x	Abrazos y Duermen juntos
51	x				6		x		Abrazos y Duermen juntos
53	x				21		x	x	Abrazos, Duermen y comen juntos
54	x				3	x	x		Abrazos, Duermen y comen juntos
60	x				10	x	x	x	Abrazos, Duermen y comen juntos
61	x			x	3	x	x	x	Abrazos, Duermen y comen juntos
66	x				11		x	x	Abrazos y Duermen juntos
91	x		x		1	x	x		Abrazos y Duermen juntos
93	x				15	x	x	x	Abrazos, Duermen y comen juntos
95				x	2	x	x	x	Abrazos y Duermen juntos
101	x				8	x	x	x	Abrazos y comen juntos

Tabla 5. Resultados encuestas de muestras con medio grado de infección.

Folios	Cuidados mascotas			Desparasitados	
	Vacunas	Desparasitación	Higiene	Si	No
7	x	x	x		x
8	x	x	x	x	
10	x	x	x	x	
11	x	x	x		x
15	x	x	x	x	
18	x	x	x	x	
26	x		x		x
32	x	x	x	x	
34	x	x	x	x	
43	x	x	x	x	
51	x	x	x	x	
53	x	x	x	x	
54	x	x	x		x
60	x	x	x	x	
61	x	x	x	x	
66	x		x	x	
91	x	x	x		x
93	x	x	x	x	
95			x	x	
101	x	x	x	x	

Tabla 6. Segunda parte de resultados encuestas de muestras con medio grado de infección.

c) Resultados de encuesta de muestras con Bajo grado de infección

Folios	Mascota					Contacto			
	Perro	Gato	Aves	Otros	T. mascota (años)	Exterior	Interior	Mat. Biol	Otro
2	x		x	x	23	x			
6	x				20		x		
12	x				4	x		x	
14	x				7	x			
21	x				9	x			
22	x			x	18	x	x	x	Abrazos
23			x		23	x			Abrazos
24	x				9	x		x	Abrazos
27	x				21	x	x		Abrazos
29	x				2	x		x	
33		x		x	7	x	x		Abrazos
40	x				5	x			
41	x		x	x	23	x	x		
42	x				5 meses	x	x	x	Abrazos
44	x				4	x	x		
45	x				21	x			
46	x				6 meses	x			
47	x				23	x		x	
48	x				3 meses	x		x	
59	x	x			5	x	x	x	Abrazos
63	x				5	x		x	Abrazos
64	x				8	x	x	x	Duerme
69	x	x			2	x	x		Abrazos
73	x				23	x	x	x	Abrazos
74	x				15	x	x	x	Abrazos
75				x	4		x	x	
76	x				7	x	x	x	
78	x	x	x		7		x		Abrazos
80	x	x		x	20		x	x	Abrazos
81	x				10		x	x	Comer
85	x				15	x		x	
87	x				25	x		x	
88	x	x			13	x		x	
89	x				3 meses	x	x		
90	x				7	x			Abrazos
92	x				3	x	x	x	Comer
100	x				5	x	x		Abrazos

Tabla 7. Resultados encuestas de muestras con bajo grado de infección.

Folios	Cuidados mascotas			Desparasitados	
	Vacunas	Desparasitación	Higiene	Si	No
2	x	x	x	x	
6	x	x		x	
12	x		x	x	
14	x		x	x	
21	x	x	x	x	
22	x	x	x	x	
23	x		x	x	
24	x	x	x	x	
27	x		x		x
29	x	x	x		x
33	x	x	x	x	
40	x	x	x	x	
41	x	x		x	
42	x	x	x	x	
44	x	x	x		x
45	x	x	x		x
46	x	x	x	x	
47	x	x	x	x	
48	x		x		x
59	x	x	x	x	
63	x	x	x	x	
64	x	x	x	x	
72		x	x	x	
73	x	x	x	x	
74	x	x	x	x	
75	x		x	x	
76	x	x	x	x	
78	x	x	x	x	
80	x		x	x	
81	x		x	x	
85	x	x	x	x	
87	x	x	x	x	
88	x	x	x	x	
89	x	x	x	x	
90	x	x	x	x	
92	x	x	x		x
100	x	x	x	x	

Tabla 8. Segunda parte de resultados encuestas de muestras con bajo grado de infección.

## 7.2 Preparación de la placa de ELISA

Se realizó el procesamiento de 84 muestras de suero iguales en cada una de las placas de ELISA, a continuación se muestra la ubicación de cada muestra:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B		17	52	7	34	91	21	41	55	74	85
B			19	62	8	43	93	22	42	59	75	87
C			20	65	10	51	95	23	44	63	76	88
D		1	25	67	11	53	101	24	45	64	78	89
E		5	28	70	15	54	2	27	46	69	80	90
F		9	30	77	18	60	6	29	47	71	81	92
G		13	31	79	26	61	12	33	48	72	82	100
H		16	38	86	32	66	14	40	50	73	84	

Tabla 9. Ubicación de las muestras en la placa de ELISA.

Condiciones	
Alto grado	
Medio grado	
Bajo Grado	
Blanco	B

En las celdas vacías se colocaron los controles como se indicaba en cada uno de los kits utilizados (metodología punto 4.4) y las muestras fueron ordenadas en ese orden por los criterios de inclusión mencionados (metodología, punto 4.2).

Tabla 10. Condiciones de ubicación de la muestras en la placa de ELISA.

Del total de muestra, 21 muestras fueron de las consideradas de alto grado de infección, 20 muestras de medio grado de infección y 43 muestras de bajo grado de infección.

### 7.3 Resultados ELISA directo para la identificación de IgG

Una vez que se detiene las reacciones las absorbancias obtenidas son las que muestra la siguiente tabla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.145	0.746	0.372	0.306	0.306	0.264	0.223	0.298	0.224	0.232	0.292	0.248
<b>B</b>		0.826	0.307	0.254	0.291	0.291	0.294	0.268	0.21	0.29	0.256	0.213
<b>C</b>		0.865	0.226	0.276	0.287	0.263	0.223	0.308	0.283	0.301	0.26	0.306
<b>D</b>	0.384	0.253	0.227	0.202	0.226	0.237	0.265	0.188	0.261	0.201	0.237	0.218
<b>E</b>	0.352	0.378	0.263	0.268	0.293	0.299	0.302	0.275	0.267	0.207	0.31	0.3
<b>F</b>	0.636	0.215	0.252	0.305	0.287	0.309	0.26	0.223	0.255	0.258	0.204	0.264
<b>G</b>	0.611	0.307	0.277	0.216	0.286	0.269	0.24	0.276	0.257	0.218	0.207	0.211
<b>H</b>	0.767	0.207	0.306	0.275	0.299	0.275	0.228	0.214	0.281	0.229	0.275	

Tabla 11. Resultados de absorbancias en la placa de ELISA para IgG.

Acotaciones	
Blanco	B
Control de punto de corte	MCC
Control positivo bajo	PCL
Control positivo medio	PCM
Control positivo alto	PCH
Muestras ubicadas en zona gris	

Los resultados de las muestras cumplieron con los siguientes criterios para poder considerarlos viables:

- Blanco sustrato en pocillo

$A1 < 0,150$

- $MPCM \geq 0,750$

Tabla 12. Acotaciones establecidas para cada uno de los controles utilizados en la determinación de IgG.

El cálculo de los valores de control y punto de corte se realizaron de la siguiente manera:

$$MCC = \frac{A_{450NM} (D1) + A_{450NM}(E1)}{2} = \frac{0.384 + 0.352}{2} = 0.368$$

$$PCL = \frac{A_{450NM} (F1) + A_{450NM}(G1)}{2} = \frac{0.636 + 0.611}{2} = 0.623$$

$$PCM = \frac{A_{450NM} (H1) + A_{450NM}(A2)}{2} = \frac{0.767 + 0.746}{2} = 0.756$$

$$PCH = \frac{A_{450NM} (B2) + A_{450NM}(C2)}{2} = \frac{0.826 + 0.865}{2} = 0.845$$

Obteniendo como resultados los siguientes:

<b>Valores de blanco, controles y punto de corte</b>	
<b>Blanco</b>	0,145
<b>MCC</b>	0,368
<b>PCL</b>	0,623
<b>PCM</b>	0,756
<b>PCH</b>	0,845

Tabla 13. Valores del blanco y cada uno de los controles utilizados en la identificación de IgG.

La interpretación de los resultados se obtienen por comparación con el valor de punto de corte  $\pm 15\%$ , es decir:

$A_{450nm} (\text{Paciente}) \geq MCC + 15\% = \text{anti-Toxo-IgG-Ac-positivo}$

$A_{450nm} (\text{Paciente}) < MCC - 15\% = \text{anti-Toxo-IgG-Ac-negativo}$

Debido a las variaciones fisiológicas y analíticas los resultados de los pacientes un 15% arriba o abajo del valor calculado como punto de corte son indeterminados (ubicados en la zona gris).

Por lo tanto, si el valor de MCC= 0.368 ± 15% se obtiene las siguientes condiciones:

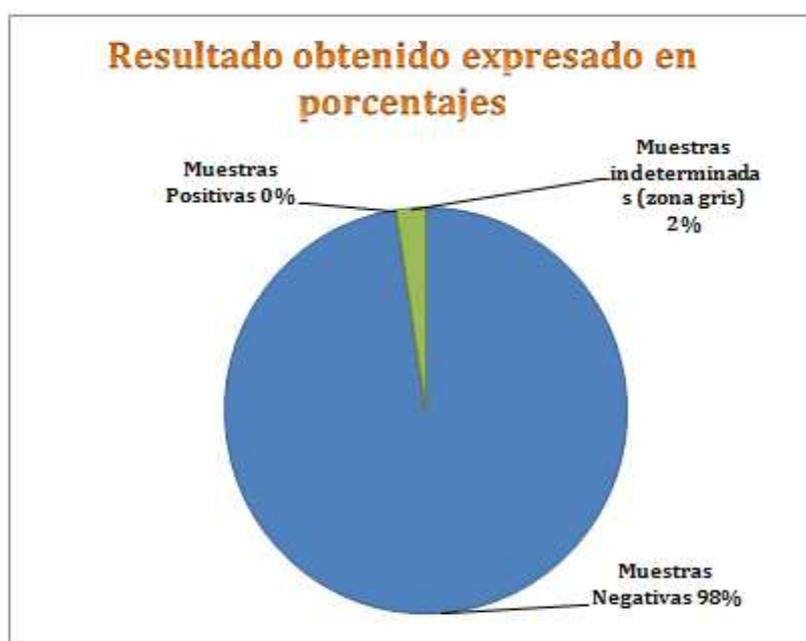
$A_{450nm}$  (Paciente) ≥ (0,368 + 15%) **0,423 anti-Toxo-IgG-Ac-positivo**

$A_{450nm}$  (Paciente) < (0,368 - 15%) **0,312 anti-Toxo-IgG-Ac-negativo**

**Entre 0,312 y 0,423 es la denominada zona gris**, es decir, las muestras son indeterminadas. Finalmente en esta determinación se encontraron solo dos muestras (Tabla 14.) de las 84 procesadas se ubican en la zona gris, ninguna positiva y 82 negativas, presentando los siguientes porcentajes (Grafica 1.):

Numero de muestras, con valor superior al punto de corte	Absorbancia
5	0,378
17	0,372

Tabla 14. Muestras obtenidas con valores ubicados en la zona gris en la determinación de IgG.

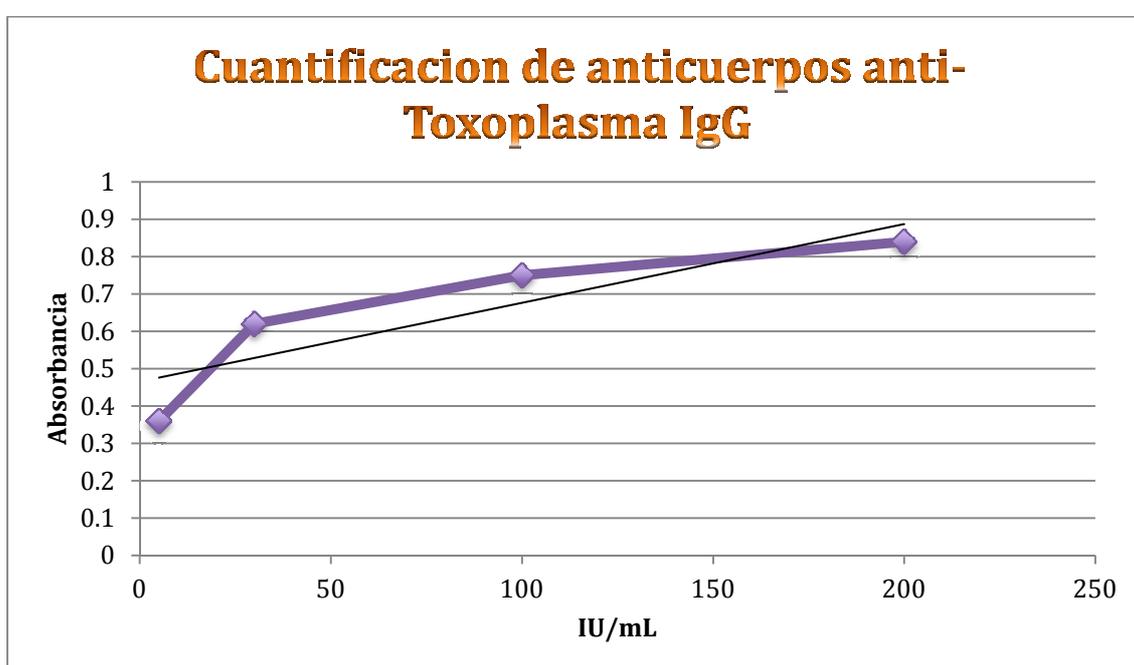


Grafica 1. Porcentajes encontrados en los resultados por contacto con *Toxoplasma gondii* en la determinación de IgG.

#### 7.4 Definición de cuantitativa de anticuerpos anti-*Toxoplasma* IgG

	Absorbancia	IU/ml	En esta identificación es posible obtener un valor de IgG cuantitativamente, mediante una curva de calibración construida con el valor del control de punto de corte (MCC) y 3 controles positivos (PCL, PCM, PCH), expresado en IU/mL.
MCC	0.36	5	
PCL	0.62	30	
PCM	0.75	100	
PCH	0.84	200	

Tabla 15. Resultados de los controles expresados en IU/mL.

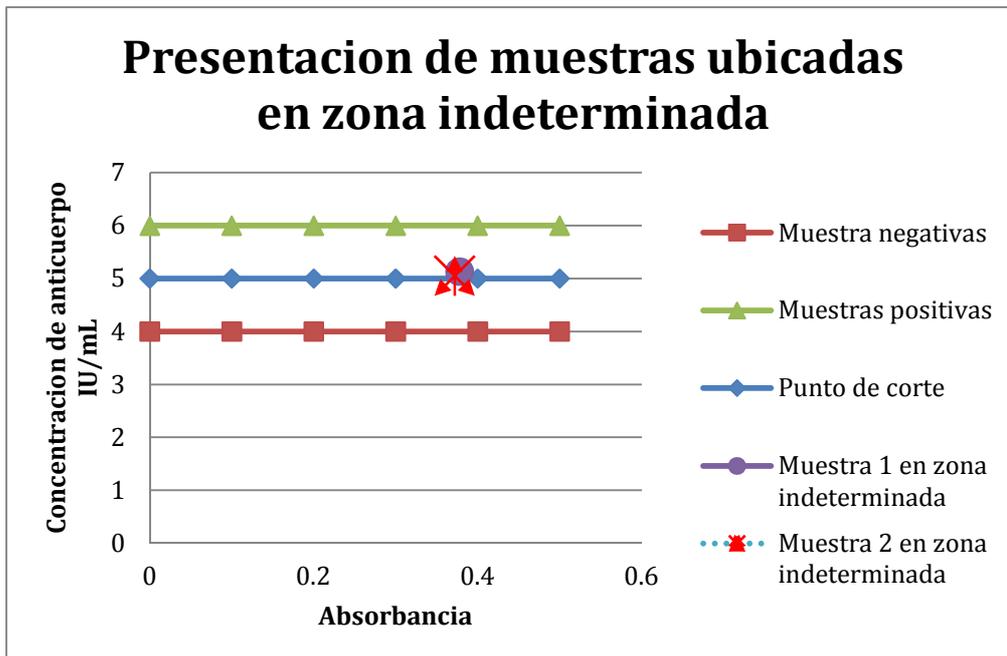


Grafica 2. Cuantificación de IgG presente en las muestras.

A continuación se muestran los valores de absorbancia superiores al punto de corte en una grafica donde es posible observar la zona gris en la que se ubican.

Numero de Muestra	Absorbancia	Concentración (IU/mL)	Símbolo
5	0,378	5.13	
17	0,372	5.05	

Tabla 16. Conversión de valores de absorbancia a unidades de anticuerpos.



Grafica 3. Presentación de muestras ubicadas en zona indeterminada.

## 7.5 Resultados ELISA directo para la identificación de IgM

Una vez que se detiene las reacciones las absorbancias obtenidas son las que muestra la siguiente tabla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.122		0.246	0.214	0.243	0.275	0.253	0.219	0.254	0.221	0.287	0.263
<b>B</b>	0.229		0.249	0.352	0.238	0.292	0.233	0.209	0.286	0.242	0.205	0.223
<b>C</b>	0.23		0.323	0.264	0.251	0.296	0.276	0.298	0.216	0.269	0.256	0.293
<b>D</b>	0.481	0.336	0.221	0.248	0.273	0.233	0.287	0.214	0.284	0.201	0.227	0.221
<b>E</b>	0.479	0.286	0.297	0.289	0.294	0.278	0.287	0.236	0.224	0.237	0.202	0.274
<b>F</b>		0.291	0.235	0.347	0.206	0.229	0.294	0.275	0.234	0.262	0.226	0.206
<b>G</b>		0.248	0.238	0.231	0.238	0.281	0.221	0.284	0.247	0.237	0.231	0.288
<b>H</b>		0.265	0.301	0.217	0.221	0.193	0.266	0.275	0.225	0.298	0.244	

Tabla 17. Resultados de absorbancias en la placa de ELISA para IgM.

Acotaciones	
Blanco	B
Control Negativo	NC
Control positivo	PC
Punto de corte	COV
Muestras ubicadas en zona gris	

Los resultados de las muestras cumplieron con los siguientes criterios para poder considerarlos viables:

- Blanco substrato en pocillo
- $A_1 < 0,150$
- $MNC \leq 0,250$
- $MPC \geq 0,400$

Tabla 18. Acotaciones establecidas para cada uno de los controles utilizados en la determinación de IgM.

El cálculo de los valores de control y punto de corte se realizaron de la siguiente manera:

$$MNC = \frac{A_{450NM}(B1) + A_{450NM}(C1)}{2} = \frac{0.229 + 0.230}{2} = 0.230$$

$$MPC = \frac{A_{450NM}(D1) + A_{450NM}(E1)}{2} = \frac{0.481 + 0.479}{2} = 0.480$$

$$COV = MNC + 0,2 \times MPC = 0.330$$

Obteniendo como resultados los siguientes:

Valores de blanco y controles	
Blanco	0,122
MCN	0,230
MCP	0,480
COV	0,330

Tabla 19. Valores del blanco y cada uno de los controles utilizados en la identificación de IgM.

La interpretación de los resultados se obtienen por comparación con el valor de punto de corte  $\pm 20\%$ , es decir:

$$A_{450nm}(\text{Paciente}) \geq COV + 20\% = \text{anti-Toxo-IgM-Ac-positivo}$$

$$A_{450nm}(\text{Paciente}) < COV - 20\% = \text{anti-Toxo-IgM-Ac-negativo}$$

Debido a las variaciones fisiológicas y analíticas los resultados de los pacientes un 20% arriba o abajo del valor calculado como punto de corte son indeterminados (ubicados en la zona gris).

Por lo tanto, si el valor de  $COV = 0.330 \pm 20\%$  se obtiene las siguientes condiciones:

$$A_{450nm}(\text{Paciente}) \geq (0,330 + 20\%) \mathbf{0,396 \text{ anti-Toxo-IgG-Ac-positivo}}$$

$$A_{450nm}(\text{Paciente}) < (0,330 - 20\%) \mathbf{0,264 \text{ anti-Toxo-IgG-Ac-negativo}}$$

**Entre 0,264 y 0,396 es la denominada zona gris**, es decir, las muestras son indeterminadas.

Finalmente en esta determinación se encontraron solo dos muestras (Tabla 19.) de las 84 procesadas que se ubican en la zona gris, ninguna positiva y 82 negativas, presentando los siguientes porcentajes (Grafica 3.):

Muestras con valor superior al punto de corte	Absorbancia
62	0,352
77	0,347

Tabla 20. Muestras obtenidas con valores ubicados en la zona gris en la determinación de IgM.



Grafica 4. Porcentajes encontrados en los resultados por contacto con *Toxoplasma gondii* en la determinación de IgM.

## 8. Discusión

La infección por *Toxoplasma gondii*, se puede dar por estar en contacto con el reservorio natural o con el mismo parásito en la naturaleza y ser asintomática en algunos individuos inmunocompetentes, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue la obtención del punto de corte en una población con posible contacto con *Toxoplasma gondii*, para demostrar que a pesar de no presentarse manifestaciones clínicas, es posible infectarse.

Todo esto se demuestra realizando identificaciones de anticuerpos específicos para *Toxoplasma gondii*, IgM en infecciones agudas e IgG en infecciones crónicas.

En la identificación de IgM, se utilizó un kit que demuestra la presencia de este anticuerpo de manera cualitativa, es decir, únicamente nos indica si existe su presencia del anticuerpo clase IgM o no, además de que el kit permite que no exista una interferencia con el factor reumatoide, presente en las muestras.

Se obtuvieron 2 valores de las 84 muestras procesadas que están por encima del punto de corte (es el valor que obtiene a partir de los controles, indicando los límites para poder clasificar si es positivo o negativo la muestra ante infección de *Toxoplasma gondii*), pero no es posible considerarlas como positivas, ya que entre el punto de corte y el valor considerado positivo existe un  $\pm 20\%$  que maneja el kit, por las posibles variaciones fisiológicas presentes en el cuerpo, por lo tanto, estos valores no son considerados positivos, pero tampoco negativo, se encuentran en una zona denominada zona gris (muestras indeterminadas). En este caso los valores nos indican que la cantidad de anticuerpos es mayor al punto de corte, pero no para poder ser considerada como positiva, anteriormente la presencia de IgM era solo en fase aguda de la infección, actualmente la literatura menciona que se puede presentar este anticuerpo incluso meses después de presentarse esta fase, porque es posible detectarlos dependiendo la técnica utilizada y la sensibilidad de las mismas.

Al revisar los resultados arrojados por las encuestas nos indica que existe un contacto estrecho con el reservorio natural (gatos) y la convivencia con el mismo es de años, al igual que no existe una desparasitación de los individuos, en ambos casos, siendo una de las razones de un contacto con *T. gondii*, lo que confirma la existencia de este anticuerpo, pero sin desarrollo de enfermedad.

En la identificación de IgG, se utilizó un kit que demuestra la presencia de anticuerpos de manera cualitativa y cuantitativa, la parte cualitativa de la prueba, se obtuvieron de igual forma 2 muestras de las 84 procesadas con valores por encima del punto de corte, pero igual que en la identificación de IgM, el kit maneja un rango de  $\pm 15\%$  del valor de punto de corte, por la existencia de variaciones fisiológicas, por lo tanto las 2 muestras entran nuevamente en una denominada zona gris (muestras indeterminadas), pero cabe destacar que la IgG es un anticuerpo que se detecta en infecciones crónicas y tiende a permanecer por años detectable. Al revisar los resultados obtenidos de las encuestas ambos casos presentan contacto estrecho con el reservorio natural, de años esa convivencia, además del contacto con el material biológico, únicamente una de ellas, siendo una de las causas de porque existió el contacto con *T. gondii*, mientras que la otra muestra no indica que tenga contacto con el material biológico, pero un factor que puede ser el causante de esa infección es el contacto estrecho con la mascota, y la convivencia del mismo en el exterior, donde posiblemente pudo haberse infectado la mascota y del porque se encuentra presente este anticuerpo.

En el caso de la parte cuantitativa, es posible corroborar mediante el cálculo de IU/mL de anticuerpo de cada uno de los controles y del título de punto de corte que los dos valores que se encontraron por arriba del punto de corte (5 IU/mL), no son considerados positivos, porque se ubican en la zona gris que equivale entre 6 y 4 IU/mL y siendo el control positivo bajo de 30 IU/mL, por lo que la cantidad de anticuerpo en cada una de las muestras es baja para poder considerar positivas las muestras.

Finalmente ambos individuos presentaron un título de anticuerpo por encima del punto de corte, pero hablando cuantitativamente no tan alta para poder considerarlo como enfermedad, únicamente contacto con *T. gondii* sin desarrollo de la parasitosis.

## 9. Conclusiones

- Se obtuvieron muestras con unos títulos de anticuerpos considerados, con lo que es posible comprobar la existencia de un contacto con *T. gondii*, por la convivencia con el reservorio natural, por lo tanto la hipótesis establecida fue comprobada.
- Los puntos de corte obtenidos fueron para IgG de 0.36 y para IgM de 0.23.
- Los objetivos fueron cumplidos ya que se obtuvieron los puntos de corte para cada uno de los anticuerpos identificados y fue posible clasificar la seropositividad de las muestras como individuos infectados sanos pero sin una sintomatología para ser clasificados como enfermos.
- A pesar del gran número de muestras, solo pocas presentaron la existencia de contacto con *T. gondii*, por lo que los cuidados o medidas de prevención que toma esta población de estudio son de mucha importancia.
- Sería interesante realizar otro estudio pero en una población sin mascota, cuál sería la prevalencia de la respuesta inmune, porque el tener mascota no es la única forma de tener contacto con *T. gondii*.

## 10. Bibliografía

1. Alvarado-Esquivel C, Mercado-Suárez MF, Rodríguez-Briones A, Fallad-Torres L, Ayala-Ayala JO, Nevarez-Piedra LJ, Duran-Morales E, Estrada-Martínez S, Liesenfeld O, Márquez-Conde JA, Martínez-García SA. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, México. 2007. BMC Infectious Diseases 7:75.
2. Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th Edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branches at Galveston; Chapter 84 *Toxoplasma gondii*. 1996.
3. Black MW, Brothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. 2000. Microbiol Mol Biol Rev. 64: pp. 607-623.
4. Cesbron-Delauw MF, Guy B, Torpier G, Pirce RJ, Lenzen G, Cesbron JP, Charif H, Lepage P, Darcy F, Lecoq JP, Capron a. Molecular characterization of a 23 kilodalton mayor antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. 1989. Proc Nath Acad Sci. USA 86: pp. 7537-7541.
5. 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. 2007. Parasite immunology 29. 65-66.
6. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and Function of T-Cell-Mediated immunity Turing *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev. 1998. 11:pp. 569-588.

7. Dubey J. P. Toxoplasmosis. 1994. J Am Vet Med Assoc, 205: pp. 1593-1598.
8. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. 2004. Ann Ist Super Sanita 40 (1) pp. 71-80.
9. Limenitakis J, Soldati-Favre D. Functional genetics in Apicomplexa: Potentials and limits. 2011. FEBS Letters 585: pp. 1579-1588.
10. Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. 2011. Immunological Reviews 210 pp. 269-285.
11. Santos MJ, Soldati-Favre D. Invasion factors are couple to key signalling events leading to the establishment of infection in apicomplexan parasites. 2011. Cellular Microbiology 13 (6) pp. 787-796.
12. Tender AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: From animals to human. 2000. Int J. Parasitol; 308 pp. 1217-1258.
13. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortes J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez ML, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C, Correa D. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in México. 2005. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72: pp. 142-144.

14. Velasco-Castrejo O, Salvatierras-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C, Llausás A, Tapia-Conyer R, Guitierrez G, Sepúlveda J. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. 1992. Salud Publica México. 34: pp. 222-229.