

Tesis de Maestría en
Biotecnología

Desarrollo de kits de ELISA para la detección de Toxoplasmosis en humanos

Lic. María Ximena Simón Soria

ATGen - Diagnóstica, Laboratorios Celsius S.A.

Director de Tesis: Dr. J. Andrés Abin Carriquiry

Director Académico: Dra. Iris Miraballes Martínez

RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad de amplia distribución mundial con una prevalencia promedio del 30%. Generalmente la infección pasa desapercibida en individuos inmunocompetentes, en los que permanece de forma crónica y no tiene manifestaciones graves. Sin embargo, su diagnóstico es de particular importancia en individuos inmunosuprimidos, en los que se puede dar una reactivación de la enfermedad; y en mujeres que contraigan la infección durante el embarazo porque la pueden transmitir al feto. Este trabajo se enfoca en los problemas para el diagnóstico de infecciones recientes en embarazadas, para ello se propuso el desarrollo de un sistema de ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos del tipo IgG e IgM anti-*T. gondii* y cálculo del índice de avidéz. La combinación de estos ensayos permite el diagnóstico de la toxoplasmosis y ayuda a determinar si la infección ocurrió recientemente. El ensayo desarrollado para la detección de IgG permite la cuantificación de los anticuerpos específicos en unidades internacionales y presenta una sensibilidad del 99,1% y especificidad del 100%. Para el ELISA de IgM se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,4% y el ELISA para la determinación de la avidéz de los anticuerpos IgG fue capaz de clasificar correctamente todas las muestras evaluadas. Los tres ensayos fueron producidos en formato de kit y demostraron ser estables por al menos un año de almacenamiento. Los Kits de IgG e IgM fueron validados por el Departamento de Laboratorios de Salud Pública mostrando en ambos casos sensibilidad/especificidad de 100/100. Ambos Kits han sido registrados ante el MSP y actualmente están en condiciones de ser comercializados. El Kit para determinación de avidéz se encuentra actualmente en proceso de registro.

CONTENIDOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
Ciclo del parásito	5
Patogenia.....	6
Tratamiento y prevención.....	6
Variabilidad genética y distribución	7
Antígenos.....	8
Respuesta de anticuerpos frente a la infección	8
Diagnóstico	8
Determinación de anticuerpos IgG.....	9
Determinación de anticuerpos IgM.....	9
Determinación de la avidéz de los anticuerpos IgG.....	11
Situación del diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres gestantes	11
OBJETIVO	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Confección de serotecas.....	14
Antígenos.....	14
Ensayos de ELISA	15
Sensibilización de las placas.....	16
Estudio de la estabilidad de los extractos de antígeno	16
Estudios de estabilidad de los componentes de los kits	16
Estudios de reproducibilidad	17
Análisis por SDS-PAGE	17
Inmunoblot.....	17
Inmunoblot de avidéz	18
Cálculos y métodos estadísticos	18
RESULTADOS.....	20
Obtención del antígeno y su inmovilización en la fase sólida	20
Estrategias de extracción de proteínas de los parásitos.....	20
Evaluación de los diferentes antígenos	21
Puesta a punto de las condiciones de sensibilización de las placas.....	23
Estabilidad de los extractos.....	25
Estabilidad de la solución de antígeno	26

Estabilidad de las placas sensibilizadas y secas	26
Ensayo para la detección de IgG específicas anti-T. gondii	28
Desarrollo	28
Estabilidad	32
Validación	33
Situación actual.....	37
ELISA para la detección de IgM específica	38
Desarrollo	39
Estabilidad	42
Validación	43
Situación actual.....	44
ELISA para la determinación de la avidéz de los anticuerpos IgG específicos	45
Desarrollo	45
Estabilidad	47
Validación	48
Situación actual.....	49
DISCUSIÓN GENERAL	50
Antígeno	50
ELISA de IgG	50
ELISA de IgM y ELISA de Avidéz	51
CONCLUSIONES	52
Tareas a futuro	52
BIBLIOGRAFÍA	53

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una enfermedad infecciosa causada por el parásito *Toxoplasma gondii*. Tiene una amplia distribución mundial, con una prevalencia promedio del 30 % que varía entre 0 y 100% dependiendo de la geografía, hábitos alimenticios y nivel socioeconómico (figura 1) [1-2]. En nuestro país se detecta una prevalencia similar a la región, con una frecuencia del 30 al 60%, donde existe mayor transmisibilidad en poblaciones socialmente más desfavorecidas y con carencias sanitarias generales [3].

El ser humano, al igual que muchos vertebrados de sangre caliente, es un huésped intermediario, mientras que el gato y otros felinos actúan como huéspedes definitivos. La respuesta inmune del huésped intermediario generalmente mantiene al parásito enquistado y la infección permanece de por vida de forma asintomática [4].

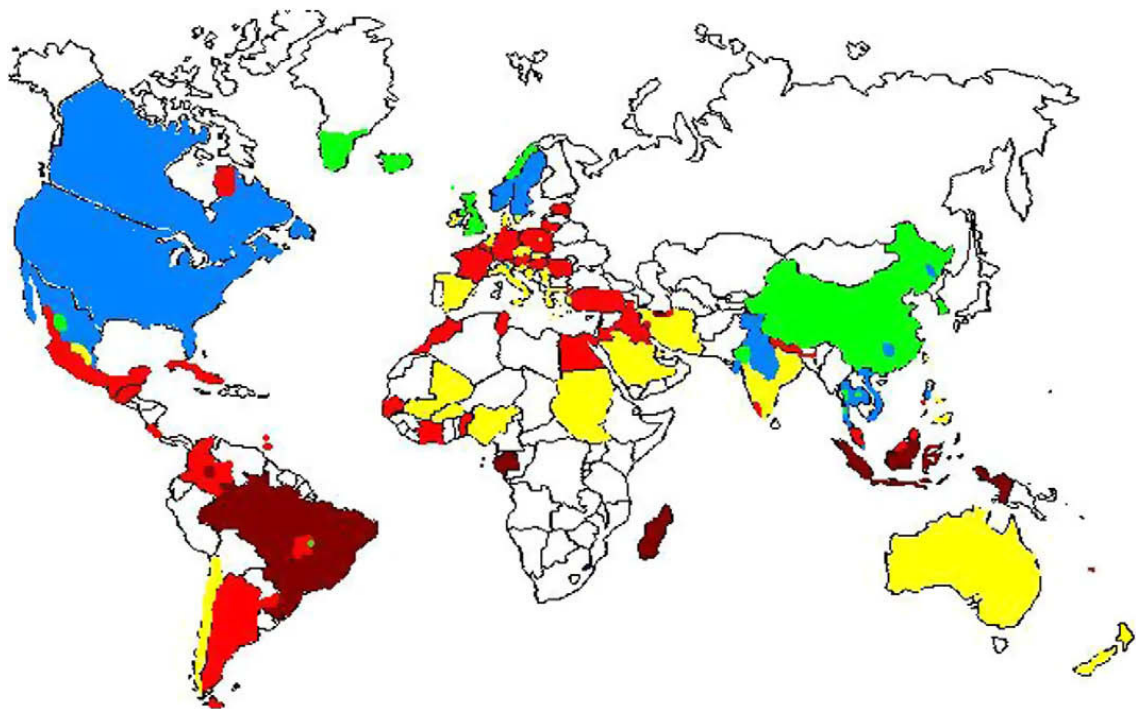


Figura 1: Estatus global de la seroprevalencia de *T. gondii*. Se indica en rojo oscuro una prevalencia mayor al 60%, rojo 40-60%, amarillo 20-40%, azul 10-20%, verde menor al 10% y en blanco sin datos. G. Pappas et al. / International Journal for Parasitology 39 (2009) 1385–1394.

Ciclo del parásito

En la figura 2 se muestra el ciclo biológico del parásito. En el huésped intermedio, existen dos formas del parásito (taquizoítos y bradizoítos) que se interconvierten una en la otra y se reproducen de forma asexual [5]. Los taquizoítos, son capaces de infectar casi cualquier tipo de célula, y allí se dividen rápidamente dentro de una vacuola parasitófora. Las últimas generaciones de los taquizoítos comienzan a formar los quistes intracelulares y se convierten en bradizoítos, de replicación lenta [4]. Los bradizoítos, contenidos en quistes tisulares de mamíferos, pueden infectar al ser humano al ser ingeridos en alimentos poco cocidos. Al ser ingeridos, los bradizoítos se diferencian a taquizoítos, para luego volver a diferenciarse a bradizoítos y formar quistes. Cuando los quistes son ingeridos por el huésped definitivo, los bradizoítos se multiplican dentro de las células epiteliales del intestino hasta que en las últimas etapas comienza la reproducción sexual. Los ooquistes formados se liberan al lumen intestinal y son eliminados con las heces [4].

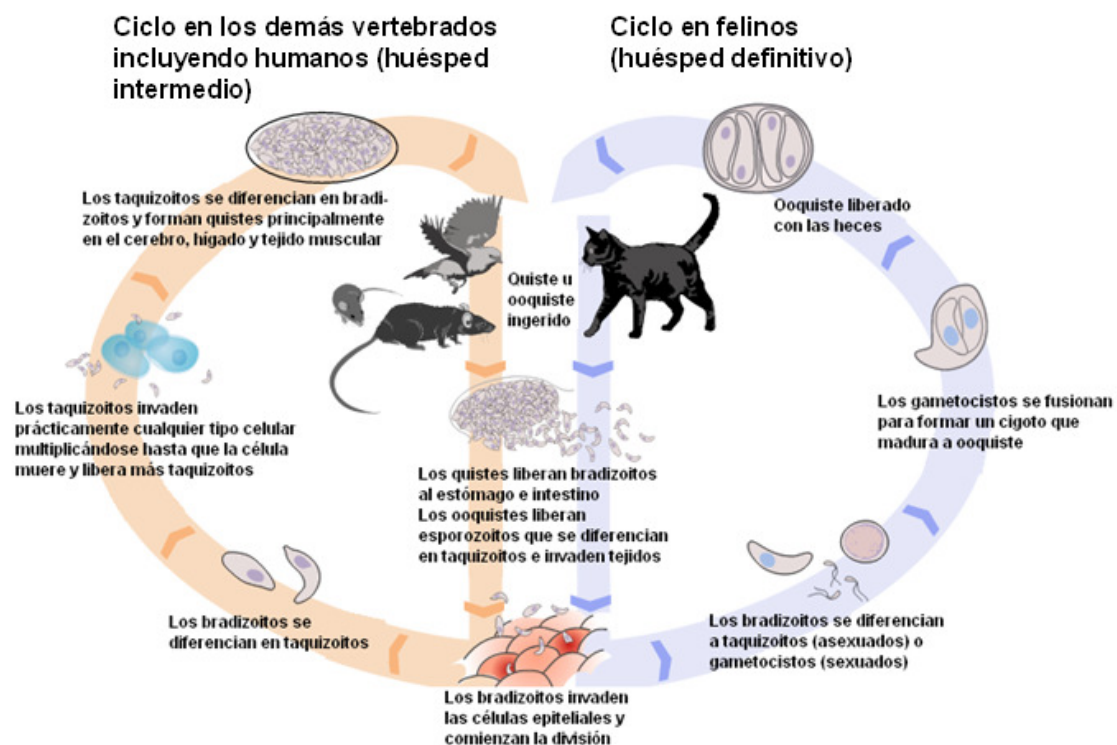


Figura 2: Ciclo biológico de *T. gondii*. Modificado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/72/Toxoplasmosis_life_cycle_en.svg

Patogenia

La infección toxoplásmica es de relevancia en aquellos casos en que el sistema inmune no funciona a plenitud y no le es posible desarrollar una contención a la proliferación del parásito, como por ejemplo en el feto e individuos inmunodeprimidos (infección por VIH, inmunosupresión farmacológica, deficiencias del sistema inmune, etc.). Cuando la infección se adquiere durante el embarazo, mientras se encuentra en la fase aguda y los taquizoítos están circulantes, el feto puede infectarse a través de la placenta. Sin embargo, cuando la mujer ha contraído previamente la infección y se encuentra cursando la fase crónica al momento del embarazo, no existe riesgo de contagio [4].

Aproximadamente el 30% de las madres con infección aguda transmiten la enfermedad al feto y el porcentaje es mayor si la infección se da durante el tercer trimestre del embarazo [6-7]. El tratamiento de la madre con antiparasitarios no reduce la probabilidad de infección del feto, pero sí, baja la severidad de la enfermedad [7].

Los efectos sobre el feto son variados, principalmente afecta el tejido nervioso provocando problemas visuales, retardo mental, malformaciones y hasta aborto espontáneo. El daño producido depende del momento de la infección, es más grave al comienzo de la gestación y disminuye hacia el final; por el contrario, la probabilidad de contagio es mayor a medida que transcurre el embarazo [7-8]. Por estos motivos es clínicamente relevante conocer si una embarazada que tiene anticuerpos específicos para *T. gondii*, se halla cursando la fase aguda o crónica de la infección, y en función de ello definir la necesidad de someterla a tratamiento.

En el caso de individuos inmunodeprimidos el daño es producido principalmente por la reactivación de una infección crónica por falta de presión inmunológica. Actualmente la encefalitis toxoplásmica es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con SIDA. También se puede dar la reactivación de quistes en pacientes transplantados y enfermos de cáncer sometidos a quimioterapia. En el caso de los transplantados se puede producir una infección primaria al recibir un órgano infectado [4].

Tratamiento y prevención

En caso de confirmarse la infección aguda de una embarazada, se la trata con espiramicina para evitar la transmisión al feto. En caso de confirmarse la infección del feto por PCR del líquido amniótico, se pasa a un tratamiento con pirimetamina, sulfadiazina o sulfadoxina y ácido fólico [9]. En el caso de enfermos de SIDA con

encefalitis toxoplásmica el tratamiento es similar, combinando pirimetamina con sulfadiazina [10].

Para la prevención del contagio se recomienda lavar bien con agua y jabón todo el material que haya estado en contacto con carne cruda. La exposición a temperaturas extremas mata al parásito, por lo tanto los alimentos cocidos no serían una fuente de contagio. Las mujeres embarazadas, no portadoras, deben evitar el contacto con gatos, tierra o carne cruda [11].

Variabilidad genética y distribución

A pesar de tener una amplia distribución mundial, el género *Toxoplasma* consta de una sola especie. Dentro de *T. gondii* existen tres linajes clonales, denominados tipo I, II y III. La diferencia genotípica entre los linajes es muy pequeña, alrededor del 1%, sin embargo se observan varias diferencias fenotípicas tales como el crecimiento, transmisión, virulencia en ratones e infectividad en humanos [1]. Los tipos II y III son cepas que forman quistes, no virulentas, capaces de cumplir todas las etapas del ciclo. Las cepas del tipo I no forman quistes con facilidad y son más virulentas. Se ha descrito que las cepas del linaje I están frecuentemente asociadas a infecciones congénitas, mientras que las del tipo II a la reactivación de infecciones crónicas en pacientes con SIDA [12]. La mayoría de los parásitos aislados de humanos en Europa y Norteamérica pertenecen al tipo II y el 80% de las infecciones en sujetos inmunocompetentes se cursan de forma asintomática [12-14]. Por otra parte, en Brasil se encontró gran diversidad genética entre los aislados, no coincidiendo con ninguno de los linajes clonales [15]. Entre estas cepas se encontraron algunas virulentas, otras no virulentas y otras intermedias. En Sudamérica es más común encontrar casos de retinocoroiditis en pacientes inmunocompetentes [13, 16].

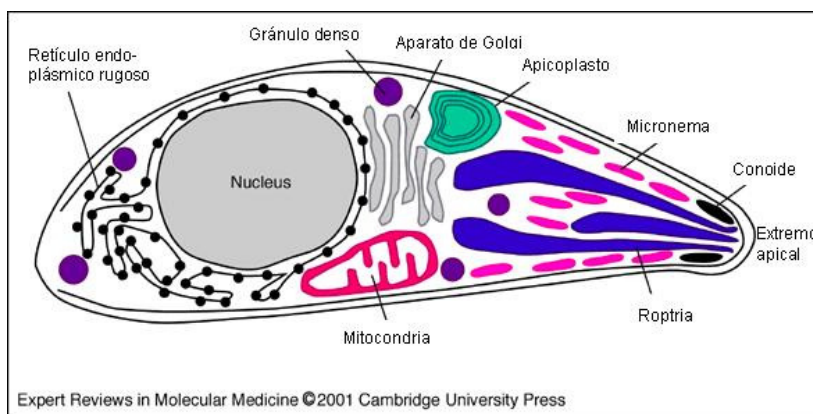


Figura 3: Estructura de un taquizoíto. Extraído de: Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001.

Antígenos

Los antígenos de superficie y de excreción/secreción (ES) son los que desencadenan una mayor respuesta en anticuerpos. Dentro de los antígenos de superficie, denominados SAGs, se encuentra la SAG1 o p30 que representa alrededor del 5% de las proteínas de parásito y es el antígeno inmunodominante. Estas proteínas se encuentran unidas a la superficie a través de anclajes glicosilfosfatidilinositol (GPI) [17]. Los antígenos ES (figura 3) los componen proteínas de las roptrias (ROP), micronemas (MIC) y gránulos densos (GRA) [18-19].

Se ha estudiado el uso de antígenos recombinantes para el diagnóstico utilizando las proteínas mencionadas anteriormente o combinaciones de las mismas, incluso muchas de estas construcciones están patentadas [20-21]. Sin embargo, ninguno de los antígenos recombinantes descritos son capaces de detectar todas las muestras positivas de la forma en que lo hacen los ensayos que utilizan extractos de taquizoítos [22].

Respuesta de anticuerpos frente a la infección

Los primeros anticuerpos que aparecen en respuesta a la infección son del isotipo IgM, estos se detectan dentro de las dos primeras semanas. En el primer mes comienza la producción de IgG. Generalmente el isotipo IgM disminuye hasta desaparecer a medida que aumenta el IgG, sin embargo, frecuentemente se detecta IgM en pacientes cursando la fase crónica de la infección [23-24]. El título de IgG generalmente aumenta hasta observarse un máximo alrededor de los tres meses y luego comienza a disminuir hasta mantenerse en valores más o menos estables, sin desaparecer [25]. La permanencia de anticuerpos específicos en suero se debe a que el sistema inmune está constantemente desafiado por taquizoítos provenientes de la ruptura de quistes que luego rápidamente se reenquistan [26].

La producción de IgA comienza casi al mismo tiempo que la de IgM, pero tarda más en desaparecer. La IgA persiste por tres o cuatro meses [27]. La IgE también aparece al comienzo de la infección y por lo general se detecta por poco tiempo [6].

Diagnóstico

Los signos clínicos de la infección no son suficientemente característicos como para dar un diagnóstico definitivo, por lo tanto se debe recurrir a métodos biológicos, serológicos, histológicos o moleculares [11]. Rara vez es útil la detección directa del

parásito. Sin embargo, es posible aislar el parásito del paciente, inoculando animales de laboratorio o cultivos de tejidos con fluidos corporales o tejidos. A su vez, se puede detectar el material genético del parásito por PCR [11, 28].

Los anticuerpos tienen un rol menor en el control de la infección, sin embargo son útiles para el diagnóstico [26]. La técnica serológica de referencia es el “dye test” de Sabin-Feldman [29-30], sin embargo es difícil de implementar en cualquier laboratorio ya que utiliza parásitos vivos. Para el diagnóstico de rutina se utilizan otras técnicas como enzoinmunoensayos, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, etc. Existen métodos que han mejorado el diagnóstico de la enfermedad adquirida recientemente como el test de avidéz de IgG, la PCR en fluidos o tejidos para detectar material genético del parásito y el western blot con muestras pareadas madre-hijo. En esta última técnica, si en la muestra del recién nacido se detecta un patrón de bandas de anticuerpos del tipo IgM o IgG diferente al de su madre [31], se confirma la infección ya que son producto de la reacción propia frente al parásito y no anticuerpos transferidos pasivamente.

Determinación de anticuerpos IgG

La presencia de anticuerpos IgG contra el parásito en la sangre indica que el paciente ha sido infectado en algún momento en el pasado. Por lo general, los ensayos para la detección de IgG son cuantitativos. Un título alto de IgG generalmente es indicativo de infección reciente, aunque se puede mantener así por más de un año. Por otra parte, los títulos bajos son característicos de infecciones antiguas, aunque también se pueden detectar al inicio de la infección, cuando la producción de IgG se encuentra en la curva ascendente [32]. Para poder estimar si se trata de una infección reciente se debe complementar con otros ensayos, lo cual es muy importante en el caso de embarazo para permitir la intervención médica con el objetivo de minimizar el daño al feto [11]. Una posibilidad es analizar una segunda muestra colectada de 2 a 3 semanas luego de la primera, en caso que el título de IgG aumente significativamente con respecto a la primera, se estaría tratando de una infección reciente [11, 32].

Determinación de anticuerpos IgM

Debido a la cinética de la producción de IgM su detección se utiliza para diagnosticar una infección reciente. Sin embargo, en algunos pacientes el título de anticuerpos IgM específicos persiste por largos períodos de tiempo. Según recomendación de la FDA (US Food and Drug Administration), no se debería

diagnosticar infección reciente en una paciente embarazada mediante el uso de un único test para IgM de toxoplasmosis comercial [33]. El diagnóstico es complicado por varios motivos: la mayoría de los ensayos no se desarrollan en base a resultados de pacientes a los que se haya detectado verdaderamente la presencia del parásito, no existe estandarización para reportar los resultados y los ensayos disponibles varían en sensibilidad y especificidad [34]. Hay pacientes que presentan IgM durante la fase crónica de la infección, incluso 12 años después [35]. La persistencia de estos anticuerpos no tiene ninguna relevancia clínica y deben considerarse infectados de forma crónica.

Guía para la interpretación de los resultados de IgG e IgM anti-*T. gondii* según la FDA [33]

Resultado de IgG	Resultado de IgM	Interpretación
Negativo	Negativo	No existe evidencia serológica de infección.
Negativo	Equívoco o positivo	Posible infección aguda reciente o reacción falso-positiva de IgM. Obtener una nueva muestra y repetir los ensayos. Si se obtiene el mismo resultado, probablemente el paciente no está infectado.
Equívoco	Negativo	Indeterminado: obtener una nueva muestra para retestear IgM e IgG o determinar IgG con un ensayo diferente.
Equívoco	Equívoco	Indeterminado: obtener una nueva muestra para retestear IgM e IgG.
Equívoco	Positivo	Posible infección aguda. Obtener una nueva muestra para retestear IgM e IgG. Si los resultados permanecen igual, o la IgG se positiviza, ambas muestras deberán ser retesteadas por un laboratorio de referencia con experiencia en diagnóstico de toxoplasmosis.
Positivo	Negativo	Infectado por más de un año.
Positivo	Equívoco	Infectado probablemente por más de un año o reacción falso-positiva a IgM. Si los resultados de una segunda muestra permanecen igual, ambas muestras deberán ser retesteadas por un laboratorio de referencia con experiencia en diagnóstico de toxoplasmosis.
Positivo	Positivo	Posible infección reciente en los últimos 12 meses. Enviar la muestra a un laboratorio de referencia con experiencia en diagnóstico de toxoplasmosis.

Determinación de la avidéz de los anticuerpos IgG

La unión del anticuerpo al antígeno se da por interacciones electrostáticas y de van der Waals. Al principio de la respuesta estas uniones son débiles, pero durante el transcurso de la respuesta inmune existe una maduración de la afinidad de los anticuerpos que incrementa progresivamente durante semanas o meses [36]. A medida que transcurre la infección, la estimulación persiste pero disminuye la masa total de antígeno, aumentando la avidéz media de los anticuerpos. La avidéz de los anticuerpos está relacionada con la afinidad epitopo paratopo, un parámetro que establece la sumatoria de las fuerzas de unión entre el Ag y el Ac. La forma más común de medir avidéz es a través de la disociación del complejo Ag-Ac en un ELISA indirecto mediante el agregado de un agente caotrópico. El tiocianato de potasio y la urea son los agentes más utilizados, estos interfieren con las interacciones polares (por solapamiento de cargas) y distorsionan la estructura de “bulk” del agua, por lo que las condiciones termodinámicas que conducen al efecto hidrófobo se revierten.

Para determinar la avidéz de los anticuerpos de una muestra de suero o plasma, se compara la densidad óptica (DO) obtenida con y sin agente, y a través de dicha relación se establece un índice de avidéz (IA). Si se trata de una infección reciente (aguda) la avidéz media de los anticuerpos va a ser menor que los de una infección antigua (crónica). En base a esto, una muestra se puede clasificar como crónica o aguda según el IA de los anticuerpos IgG [37].

Situación del diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres gestantes

El tamizaje maternal de toxoplasmosis permite la implementación de medidas profilácticas y terapéuticas, reduciendo la tasa de transmisión y los problemas causados al feto. Los primeros en establecer estos programas fueron Francia y Austria en 1975 [9] y de allí se fue adoptando en otras partes del mundo. Según la normativa del Ministerio de Salud Pública [38] se debe determinar la presencia de IgG anti-*T. gondii* en suero a todas las mujeres embarazadas en la primera consulta. En caso de ser negativa se repite la prueba en el segundo y tercer trimestre del embarazo [38].

El diagnóstico serológico de toxoplasmosis en mujeres gestantes en Uruguay se realiza mayoritariamente por la técnica de ELISA. Otras técnicas utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta, inmunofluorescencia, quimioluminiscencia e ISAGA (immunosorbent agglutination assay) de IgM como técnica confirmatoria. Una de las

más utilizadas es el ensayo VIDAS de la empresa bioMérieux, es un enzimoimmunoensayo en el que se utiliza un sustrato fluorescente (ELFA).

A modo de ejemplo, en el hospital del Banco de Previsión Social (BPS) se utiliza el ensayo de VIDAS. Se realiza una prueba de IgG durante el primer trimestre del embarazo. Si es negativo, se asume que la paciente no está infectada y se reitera la prueba en los próximos dos trimestres para descartar seroconversión. Si el ensayo de IgG es positivo, se ensaya IgM. Si es IgM negativo, se asume infección crónica. Si es IgM positivo, se evalúa el índice de avidéz.

En un estudio realizado en el BPS entre los años 1991 y 1996 [39], se encontró un 52,7% de seropositividad en 16.936 casos estudiados. Dentro de estos, 137 presentaron alto título de IgM, sin embargo no se pudo determinar la fecha de infección. Las pacientes seronegativas fueron seguidas durante el embarazo encontrándose 14 casos de seroconversión. En los casos en que fue posible, se trató con antiparasitarios a las pacientes IgM positivas o con seroconversión.

Aún no es posible determinar el momento exacto de la infección en que deja de ser posible la transmisión al feto. Este momento sería cuando los parásitos se encuentran en la etapa de bradizoítos. Se sabe que entre los 6 y 7 días luego de la infección ya se detectan quistes con bradizoítos en su interior [40]. Por el momento, lo más seguro es que una paciente que presenta anticuerpos IgG de alta avidéz pero no IgM o IgA, atraviesa una infección con más de cuatro meses de antigüedad y no es capaz de transmitirla al feto [41].

Actualmente los ensayos utilizados en el país son de origen extranjero. Un desarrollo nacional traería como ventaja:

- **menor precio**, por evitar tasas, fletes e intermediarios
- **menor plazo de entrega**, por evitar embarques
- **mayor disponibilidad**, no existen muchos proveedores para el conjunto de detección de IgG, IgM y avidéz.
- **validación de los ensayos utilizando muestras locales**, lo que permite el ajuste de los puntos de corte a la población, ya que puede ser afectado por la prevalencia y la presencia de otras infecciones circulantes
- **posibilidad de ajustar los ensayos según demandas específicas de los usuarios finales** con el objetivo de facilitar la manipulación.

OBJETIVO

Se plantea el desarrollo de tres sistemas de ELISA para el diagnóstico de toxoplasmosis en humanos y su clasificación en aguda o crónica: detección y cuantificación de anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii* en suero humano, determinación del IA de dichos anticuerpos y detección de anticuerpos específicos del tipo IgM. Los ensayos deben tener un formato de kit comercial similar a los encontrados en el mercado, ser de fácil manipulación para el personal técnico de los laboratorios clínicos y estar aprobados por el Departamento de Laboratorios de Salud Pública. La validez de los productos debe ser de al menos un año cuando son conservados a una temperatura entre 2 y 8 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Confección de serotecas

Las muestras positivas y negativas a toxoplasmosis fueron provistas por el Laboratorio de serología del Hospital de las Fuerzas Armadas y el Laboratorio del Hospital Canzzani. En estos lugares reciben muestras de suero de mujeres embarazadas y las analizan por las técnicas de VIDAS® (bioMérieux, Francia): VIDAS® TOXO IgG II, VIDAS® TOXO IgM, VIDAS® TOXO IgG Avidity y en algunos casos son confirmadas por IFI de IgM anti-*T. gondii*. Estas muestras llegan a nuestro laboratorio con título asignado de IgG, IgM y en algunos casos índice de avidéz, estas son registradas en una planilla, etiquetadas y almacenadas a -20°C.

Cantidad y tipo de muestras obtenidas:

Contamos con 221 muestras clasificadas por VIDAS como positivas a IgG, 8 indeterminadas y 304 muestras negativas. Dentro de las positivas a IgG, 179 son IgM negativas, 30 positivas, 5 dudosas y 7 sin determinar. Dentro de las IgM positivas, dudosas y sin determinar, 13 presentaban alta avidéz de las IgGs y 17 baja avidéz y el resto vino sin datos de avidéz.

Las muestras de las que se tenían dudas con respecto a la presencia de IgM, luego fueron testeadas por IFI IgM, Platelia Toxo IgM Biorad y/o ImmunoComb Toxo IgM Origenics.

Antígenos

Comerciales

Se obtuvo mediante la empresa Meridian Lifesciences dos extractos de taquizoítos de *T. gondii* para evaluar: un extracto de parásitos sonificado y otro tratado con detergente. Ambos se transportan en hielo seco y se deben conservar a temperaturas menores a -65°C. A estos extractos les llamó “antígenos comerciales”.

Extractos preparados en el laboratorio

Taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH liofilizados, provistos por el Laboratorio del INTEBIO, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, se procesaron en nuestro laboratorio para extraer proteínas solubles y de membrana. Luego, se adquirió al Laboratorio de Biotecnología (LBT, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelAR) 20.000 millones de taquizoítos. Dichos parásitos fueron entregados en PBS con azida de sodio. Con estos parásitos se realizó la última parte del trabajo, incluyendo la optimización de los ensayos y la producción de los primeros lotes.

Métodos de extracción de proteínas

Se resuspenden los taquizoítos en solución de buffer fosfato (PBS) con azida de sodio y se hace una determinación de proteínas por el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, Sigma-Aldrich). Posteriormente, se evaluaron diferentes métodos de extracción.

Extracción con detergente:

Se evaluó la utilización de detergentes de uso habitual para la extracción de proteínas de membrana. Se incubaron los taquizoítos con los diferentes detergentes y luego se centrifugó a 20.000xg durante 45 minutos. Se vuelve a determinar la concentración de proteínas del sobrenadante y se almacena a -80°C.

Sonicado:

Se sonicó la suspensión de taquizoítos con 40 ciclos de 1 segundo de aplicación de ultrasonido a 45% de amplitud intercalados con períodos de 1 segundo de reposo. Se centrifugó 15 minutos a 10000xg y almacenó el sobrenadante a -20°C.

Ensayos de ELISA

ELISA para determinación y cuantificación de IgG

Se incuba una placa de ELISA (Biomat srl, Italy) con la solución de antígeno toda la noche a 4°C. Se escurre el contenido, se incuba con una solución bloqueante, seroalbúmina bovina (Applichem) al 1% en PBS y se lava con Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0,05% en PBS. En caso de almacenar la placa para su uso posterior, esta se incuba con una solución estabilizante, luego se seca en estufa, se envasa en un sobre hermético y se almacena en heladera. Para realizar los ensayos se siembran en los pocillos las muestras diluidas y se incuban. La placa se lava y se incuba con una solución de anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (Meridian Lifesciences,[®] Inc, USA). A continuación, la placa se lava y se incuba con una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina –TMB - (Sigma-Aldrich) y 4mM de peróxido de urea (Sigma-Aldrich). Se frena la reacción con ácido sulfúrico 2N, y se lee la absorbancia, o densidad óptica (DO), a 450nm-620nm. Las condiciones de reacción – tiempo y temperatura, la composición de los buffers y concentraciones a utilizar son ajustadas durante el desarrollo de los ensayos.

ELISA para la determinación de la avidéz de las IgG

La base del ensayo es tal como se describió en el párrafo anterior, salvo que se incluye un paso de disociación de los anticuerpos de baja afinidad de las muestras. En este ensayo se siembran todas las muestras y controles por duplicado. Luego de la

incubación, se descarta el contenido de los pocillos y se siembra en un pocillo de cada muestra una solución con un agente disociante, mientras que en la otra réplica, se siembra una solución buffer sin disociante como control y se incuban. A continuación se descarta el contenido de los pocillos, se lavan y se continúa con la incubación con el conjugado enzimático como se describió en el procedimiento anterior. Una vez obtenidos los valores de DO, se halla para cada muestra la relación entre la DO con y sin disociante. De esta forma se calcula el índice de avidéz (IA) como:

$$IA = \frac{\text{DO muestra con disociante}}{\text{DO muestra sin disociante}} \times 100$$

ELISA para la determinación de IgM

Se utilizan las placas procesadas de igual modo que en el ensayo de IgG y el mismo sustrato. El conjugado enzimático utilizado en este caso es una solución de anticuerpos anti-IgM humana conjugados a peroxidasa (Meridian Lifesciences,[®] Inc, USA). Las condiciones de aplicación de las muestras son ajustadas durante el trabajo.

Sensibilización de las placas

Se estudiaron las condiciones óptimas de adsorción del antígeno a la placa. Esto consistió en modificar el pH, la fuerza iónica, la concentración del antígeno de la solución y la temperatura de incubación.

Estudio de la estabilidad de los extractos de antígeno

Para evaluar dicho efecto se tomaron alícuotas de antígeno y se almacenaron 24h a 4°C. Estas se compararon en ELISA con una alícuota recién descongelada.

Estudios de estabilidad de los componentes de los kits

Estabilidad acelerada

Para evaluar la estabilidad de las placas envasadas se realizó un estudio de estabilidad acelerada. Las placas fueron sensibilizadas, bloqueadas, estabilizadas, secadas y envasadas en bolsas selladas con una bolsita de sílica gel en su interior. Las placas se almacenan durante 3 semanas a 37°C guardando una contramuestra a 4°C [42]. Una vez transcurrido el período, las placas se ensayan en paralelo. En caso de evaluar la estabilidad del kit completo, este se almacena durante una semana a 37°C.

Tiempo real

Las placas o kits son preparados, envasados y almacenados a 4°C, luego son testeados a intervalos regulares y comparados con los resultados obtenidos a tiempo cero.

Estudios de reproducibilidad**Intraplaca**

Se ensaya una muestra negativa, una positiva baja una media y una alta en 10 réplicas. Se calcula el promedio, desvío estándar y coeficiente de variación (CV).

Interplaca

Se ensayan las mismas muestras del estudio anterior en 10 experimentos independientes. Se calcula el promedio, desvío estándar y CV.

Análisis por SDS-PAGE

Para caracterizar los antígenos se sembraron los diferentes extractos en geles de poliacrilamida al 12% con SDS [43] en condiciones reductoras, diluidos en buffer muestra con ditioneitol (DTT). Se corrieron a corriente constante de 25mA, utilizando una cuba Mighty Small II (Hoefer, San Francisco, USA). El revelado de las bandas se realizó mediante tinción con nitrato de plata según instrucciones del fabricante.

Inmunoblot

Para caracterizar algunas muestras se realizaron SDS-PAGE según se describió anteriormente. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Alemania) durante 1h a 75 mA ($\cong 1,5 \text{ mA/cm}^2$) con buffer de transferencia (Tris 25 mM + Glicina 192 mM + SDS 0.1 % + 5% metanol) en un aparato de transferencia semiseca (LKB, Suecia).

Se cortó la sección correspondiente al marcador de PM de la membrana de NC y se tiñó, el resto se bloqueó durante 1 hora con PBS-BSA 1 % a temperatura ambiente con agitación. Luego la membrana se cortó en tiras longitudinales de alrededor de 5 mm de ancho. Cada tira fue incubada con diluciones en PBS-T-BSA de las distintas muestras en las mismas condiciones del bloqueo. Luego de lavar con

PBS-T, las tiras se incubaron con diluciones adecuadas de anticuerpos de cabra anti-IgM o IgG humana-fosfatasa alcalina en PBS-T-BSA en las condiciones antes descritas. El revelado se llevó a cabo con NBT-BCIP (Nitro Blue Tetrazolium 0.3 mg/mL, Bromo-4 cloro-3 indol Phosphate 0,15 mg/mL en buffer carbonato-bicarbonato 0.1 M, MgCl₂ 10 mM pH 9.8), se dejó reaccionar hasta visualizar las bandas, se lavó con H₂O destilada y se dejó secar.

En otro ensayo se llevó a cabo del revelado con un anticuerpo monoclonal anti-P30 conjugado a peroxidasa, allí se utilizó el sustrato DAB (diaminobencidina) en PBS con H₂O₂ al 3%.

Se estimó el peso molecular relativo de las bandas utilizando un análisis de regresión lineal basado en el RF de los estándares de peso molecular.

Inmunoblot de avidez

En este ensayo al igual que en el ELISA de avidez, luego de incubar las membranas con las muestras, se incuban algunas con agente disociante con el objetivo de eluir los anticuerpos de menor afinidad.

Cálculos y métodos estadísticos

Sensibilidad diagnóstica: Probabilidad expresada en % de que el procedimiento diagnóstico sea positivo para un individuo enfermo.

$$S = \frac{VP}{VP+FN}$$

Siendo: S- sensibilidad, VP- muestras positivas verdaderas, FN- muestras negativas falsas (son detectadas como negativas siendo en realidad positivas).

Especificidad diagnóstica: Probabilidad expresada en % de que el procedimiento diagnóstico resulte negativo en un individuo sano.

$$E = \frac{VN}{VN+FP}$$

Siendo: E- especificidad, VN- muestras negativas verdaderas, FP- muestras positivas falsas (son detectadas como positivas siendo en realidad negativas).

Curva ROC: Los valores de sensibilidad y especificidad dependen del punto de corte o cut-off, y cuando este varía tienen un comportamiento opuesto. Para escoger el punto de corte óptimo, se utiliza la construcción de una curva ROC [44]. En ella se grafica la sensibilidad respecto al coeficiente falso positivo y se obtiene un valor de cut-off para cada par sensibilidad – especificidad. Para la construcción de la curva y el tratamiento de datos, se utilizó el programa GraphPad Prism 4.

Valor predictivo positivo y negativo (VPP y VPN): El VPP indica el porcentaje de individuos que padecen la enfermedad que son correctamente clasificados como positivos, mientras que el VPN corresponde al porcentaje de los individuos sanos que son clasificados como tales.

$$\text{VPP} = \frac{P \cdot S}{P \cdot S + (1-P) \cdot (1-E)} \qquad \text{VPN} = \frac{(1-P) \cdot E}{(1-P) \cdot E + P \cdot (1-S)}$$

Siendo P la probabilidad de que el paciente esté enfermo antes de realizar el análisis, que en este caso se toma como la prevalencia de la enfermedad en la población en estudio [44].

Correlación lineal: Se aplicó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el programa GraphPad Prism 4.

RESULTADOS

El trabajo comenzó con la puesta a punto de la preparación de las placas de ELISA con el antígeno adsorbido, que serán utilizadas en los tres ensayos. Esta es quizás la etapa fundamental en el desarrollo de inmunoensayos con este formato, ya que es la que define la especificidad de los ensayos. En esta primera parte se estudia entonces la preparación del extracto antigénico, las condiciones de adsorción a las placas y los tratamientos necesarios para la conservación de la reactividad de las mismas durante el período de vida útil de los kits.

En las secciones posteriores se estudia el desarrollo y validación de cada uno de los kits.

Obtención del antígeno y su inmovilización en la fase sólida

Estrategias de extracción de proteínas de los parásitos

Se planteó preparar un extracto a partir de taquizoítos enteros que contuviera las proteínas de mayor valor diagnóstico para utilizar como antígeno en los ensayos. Se aspiraba obtener un preparado con proteínas de excreción/secreción- tales como las ROP, MIC y GRA- y proteínas de membrana- SAG. Se evaluaron diferentes formas de extraer estas proteínas de los parásitos liofilizados; por aplicación de ultrasonido o extracción con detergentes. La elección del detergente y las condiciones de extracción se deben hacer por ensayo y error, ya que depende de la naturaleza de las proteínas [45]. Entonces se evaluaron detergentes de varios tipos: anfótero, iónico y no-iónicos, y se comparó con la extracción por sonicación.

En la figura 4 se observa el comportamiento de un ensayo de ELISA para determinación de IgG contra *T. gondii* en muestras de suero de pacientes sanos e infectados, utilizando las diferentes preparaciones de antígeno. Se calculó la relación entre la densidad óptica a 450nm (DO450) de las muestras positivas y negativas con cada tratamiento y se escogió la extracción con el detergente A, ya que permitía una mejor discriminación de poblaciones. Este presenta además otras ventajas, es muy utilizado para solubilizar proteínas de membrana porque no provoca desnaturalización y tiene una baja absorptividad en el ultravioleta [45]. De aquí en adelante, los extractos preparados en el laboratorio se realizaron con este detergente.

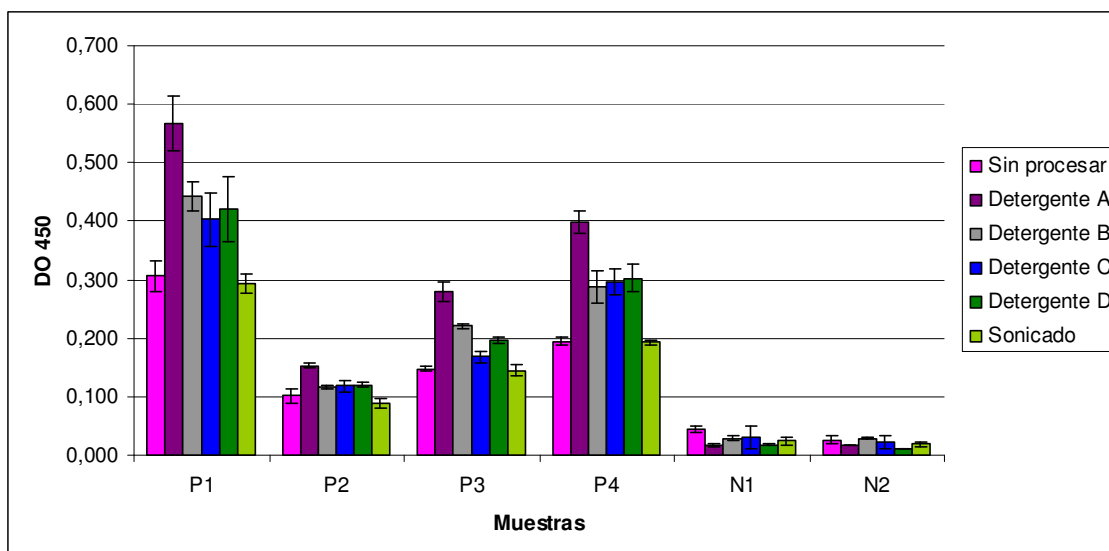


Figura 4- Comportamiento por ELISA de los extractos obtenidos con los diferentes detergentes (A-D), el sonicated y la suspensión de taquizoítos sin procesar. P1, P2 y P3 son muestras positivas (pacientes infectados) y N1 y N2 son muestras negativas (pacientes sanos).

Evaluación de los diferentes antígenos

Se comparan los antígenos comerciales con los diferentes lotes de los antígenos obtenidos en el laboratorio mediante un análisis por SDS-PAGE (figura 5).

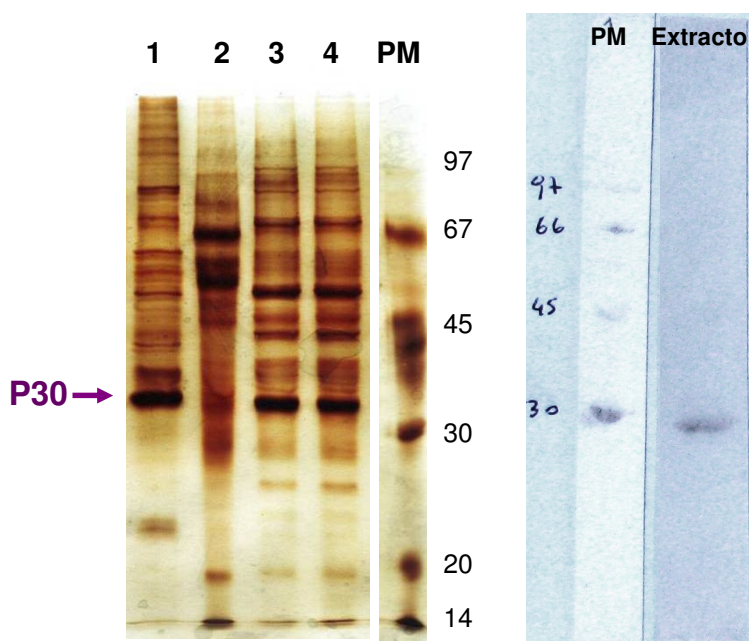


Figura 5- Izquierda: análisis por SDS-PAGE de los diferentes extractos. 1. Extracto comercial con detergente, 2. Extracto comercial sonicated, 3. Extracto de nuestro laboratorio lote R119, 4. Extracto de nuestro laboratorio lote R120 y PM. Marcador de peso molecular. Derecha: western blot del extracto de nuestro laboratorio revelado con un anticuerpo monoclonal anti-P30 marcado con HRP.

Si bien el patrón de bandas es diferente en los diferentes extractos, en la figura 5 izquierda se observa nítidamente la presencia de la proteína P30 en el extracto comercial con detergente y los preparados en el laboratorio, dato confirmado por western blot (figura 5 derecha). La P30 o SAG-1 es una proteína de unos 32 kDa de la membrana de los taquizoítos, mayoritaria y muy antigénica [18]. También se observan otras bandas que podrían corresponder a proteínas antigénicas como HSP70 (73kDa), MIC1 (50 kDa), MIC3 (38 kDa), GRA2 (28 kDa), GRA7 (26 kDa) [22, 46]. Otra observación de la figura es que en las extracciones de diferentes cosechas de taquizoítos (R119 y R120) no se detectan diferencias, lo cual sugiere una buena reproducibilidad entre lotes. La reproducibilidad fue confirmada por ELISA, la variación resultó ser menor al 4% en todos los casos evaluados.

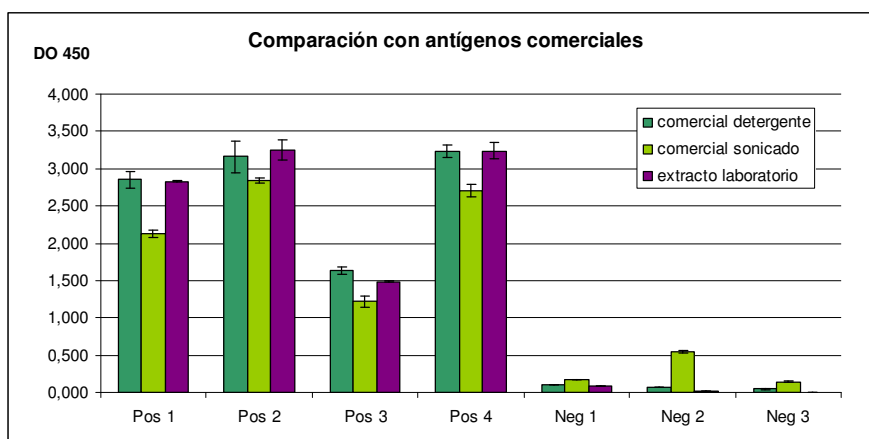


Figura 6- Comparación de los extractos comerciales con el de nuestro laboratorio por ELISA de IgG.

En el gráfico de la figura 6 se observa que el extracto preparado en el laboratorio se comporta de forma muy similar a uno de los comerciales y presenta mayor relación positivos/negativos que el otro cuando se detectan IgG específicas. Cuando se utilizan estos mismos antígenos en la determinación de IgM (datos no mostrados), el antígeno comercial sonificado no es capaz de distinguir entre muestras positivas y negativas, mientras que con el otro se detecta mucho ruido de las muestras negativas.

Se realizó el análisis por western blot para evaluar el reconocimiento de ambos antígenos por muestras positivas y negativas a IgG contra *T. gondii*. En la figura 7 se observa un patrón de reacción muy similar entre ambos antígenos, a pesar de las diferencias en el patrón de proteínas observado en el SDS-PAGE. En la tira correspondiente a la muestra negativa también se detectan bandas, sin embargo, el

patrón es muy diferente al de las muestras positivas. Esto sugiere que se da una leve reacción inespecífica con proteínas del extracto.

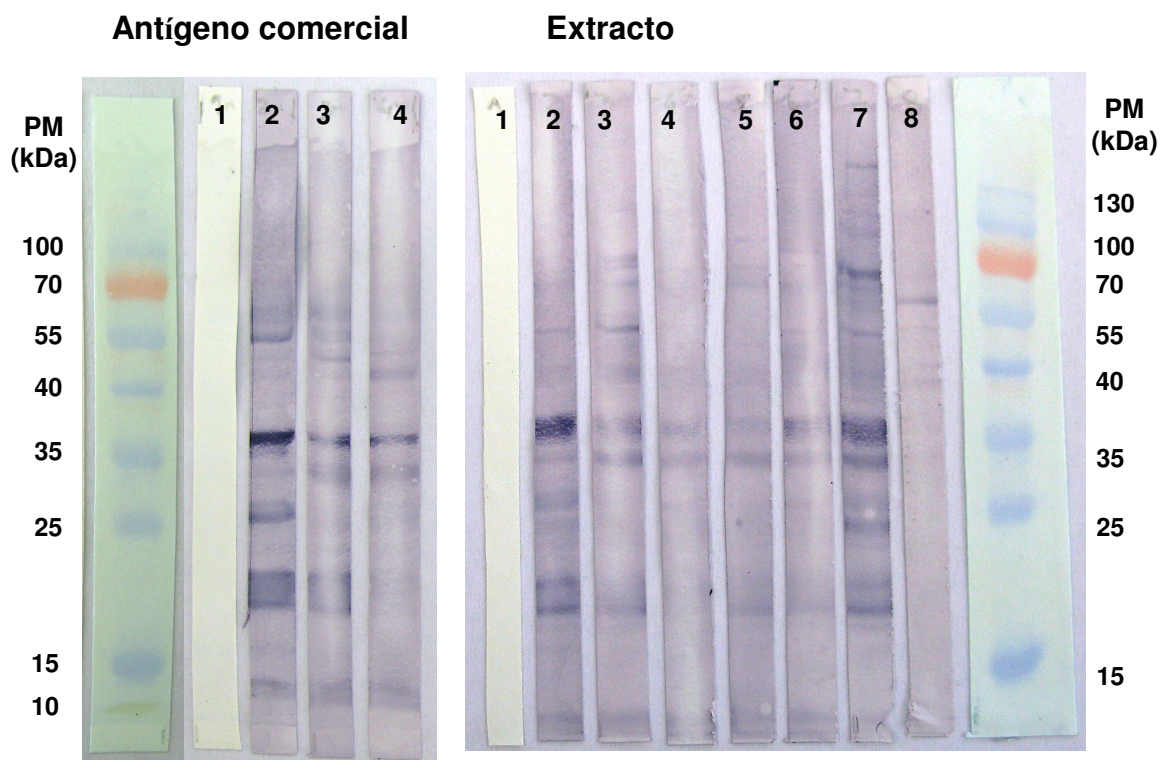


Figura 7: Reactividad de las IgG de diferentes muestras por western blot utilizando antígeno comercial y extracto. Cada tira 1 a 4, en el caso del antígeno comercial y 1 a 8 en el caso del extracto, fueron incubadas con diferentes muestras o blanco (solamente diluyente de muestras). Tira 1: blanco, 2 a 7: muestras positivas a IgG y 8: muestra negativa.

Se decidió continuar trabajando con el extracto preparado en el laboratorio teniendo en cuenta el precio, la cercanía del proveedor y las posibilidades de ajustar el procedimiento de extracción para obtener un producto con la calidad deseada.

Puesta a punto de las condiciones de sensibilización de las placas

La inmovilización del antígeno a la superficie de la placa se lleva a cabo por adsorción pasiva, en la cual se dan interacciones hidrofóbicas entre zonas apolares de las proteínas y la matriz de plástico [42]. La eficiencia de esta interacción depende de muchas variables: buffer, concentración de proteínas, temperatura y tiempo de incubación. Un factor importante para el paso de adsorción a la placa, es la elección del buffer en el que se realiza la dilución del antígeno, para lo cual se estudian diferentes pH y concentración salina.

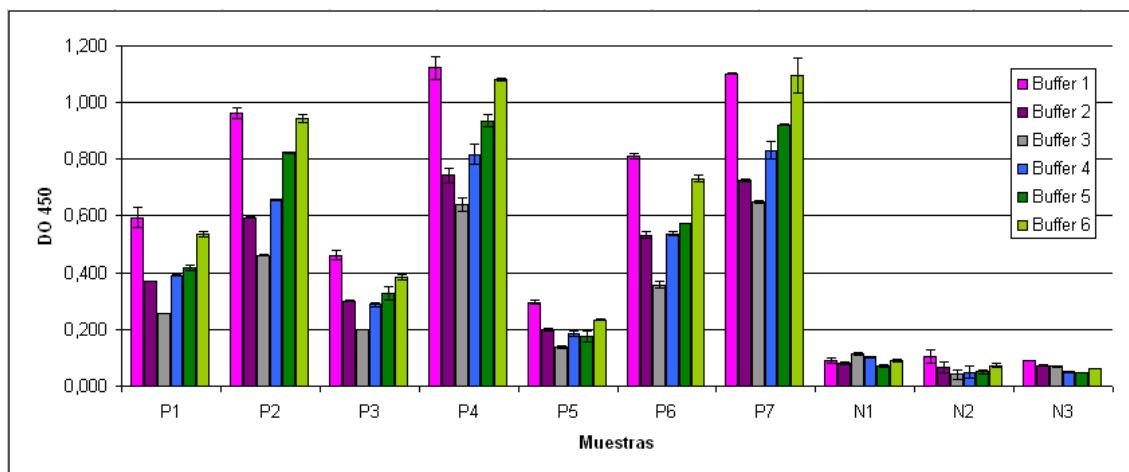


Figura 8- Evaluación del efecto de los distintos buffers de adsorción del antígeno (1 a 6) sobre el desempeño del ELISA. P1 a P7 son muestras positivas y N1 a N3 son muestras negativas.

Cuando se utiliza el buffer 1 en la adsorción, se obtiene una señal mayor, sin embargo, el buffer con el que se obtiene una mayor relación en la señal de sueros positivos/ sueros negativos es el 5, por lo que se escogió ese buffer (figura 8).

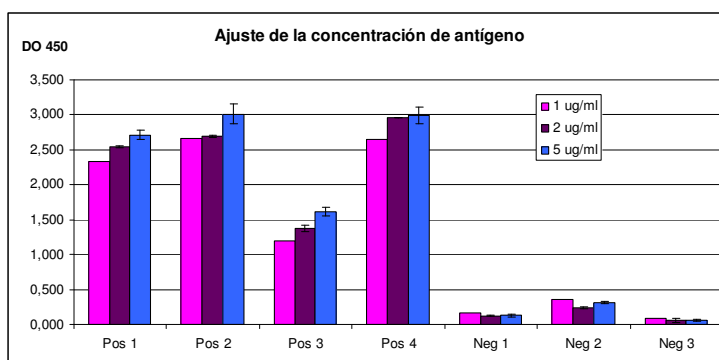


Figura 9- ELISA utilizando diferentes concentraciones de antígeno.

Combinando estos resultados (figuras 8 y 9) con los de otros ensayos, se fijaron las condiciones de adsorción: 100 μ l/pocillo de una solución 2 μ g/ml de antígeno en buffer 5, incubado toda la noche a 4°C.

Luego de la inmovilización del antígeno se deben bloquear los sitios de la superficie de poliestireno que quedaron sin cubrir. Este paso se realiza en condiciones estándar, se utiliza seroalbúmina bovina (BSA) en PBS a una concentración de 10 mg/ml. Luego de este tratamiento, la placa queda pronta para aplicar la muestra a analizar.

Estabilidad de los extractos

Se observó que los extractos perdían reactividad cuando eran almacenados a 4°C (figura 10), además cuando estos se descongelaban y congelaban en repetidas oportunidades, se degradaban (figura 11). Esto ocurría tanto con el extracto comercial como con el de nuestro laboratorio.

Supusimos que el antígeno se estaba degradando por la presencia de proteasas en el extracto [47-49]. Este problema se solucionó agregando un inhibidor de proteasas al buffer de extracción (figura 12), y se aplicó en la producción de los siguientes lotes de antígeno. El compuesto utilizado es un inhibidor irreversible de serin proteasas que se utiliza frecuentemente en lisados celulares [45].

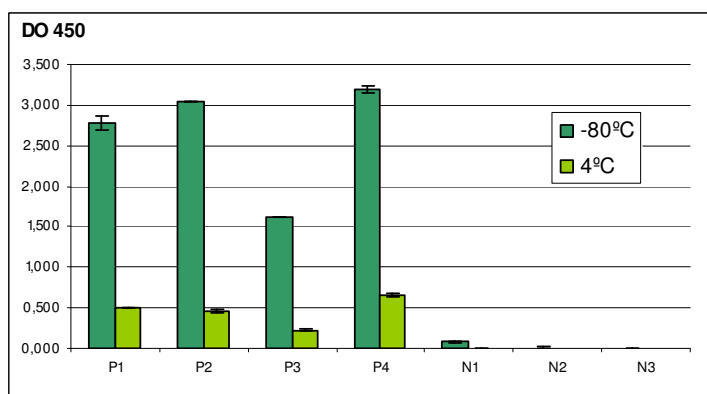


Figura 10- Comparación del comportamiento por ELISA del extracto recién descongelado (-80°C) con el almacenado durante 24 h a 4°C.

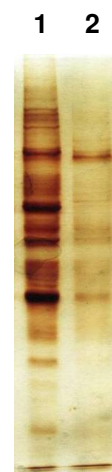


Figura 11- Patrón de bandas por SDS-PAGE de un extracto descongelado una vez (1) y otro descongelado 4 veces (2)

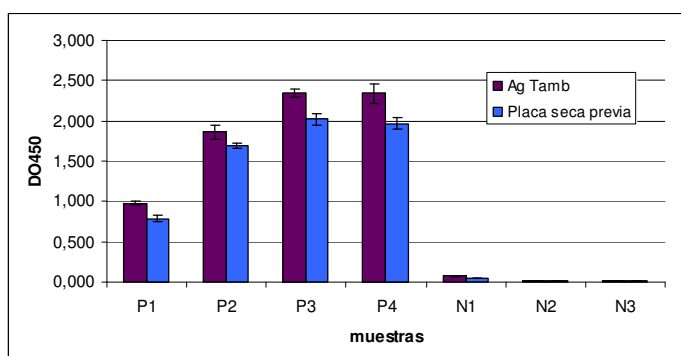


Figura 12- Comparación por ELISA de un extracto con inhibidor de proteasas que estuvo a temperatura ambiente 24h y una placa seca previa sin inhibidor, en la que se había usado antígeno recién descongelado.

Estabilidad de la solución de antígeno

Si se piensa producir lotes de más de 100 placas, hay que tener en cuenta el tiempo que se tarda en dispensar la solución de antígeno. Por datos empíricos, sabemos que la solución de antígeno no es estable por mucho tiempo. Se evaluó la estabilidad preparando la solución y sensibilizando tiras de pocillos de ELISA cada 30 minutos. En la figura 13 se observa la reactividad promedio de 5 muestras positivas de diferente título. Se observa que a los 150 minutos, la reactividad baja alrededor de un 10%. Sería deseable que la solución no permanezca más de 60 minutos, donde se observa un descenso del 3%. Con los equipos que tenemos en el laboratorio somos capaces de procesar hasta 500 placas por hora, por lo tanto, en principio este no sería un inconveniente.

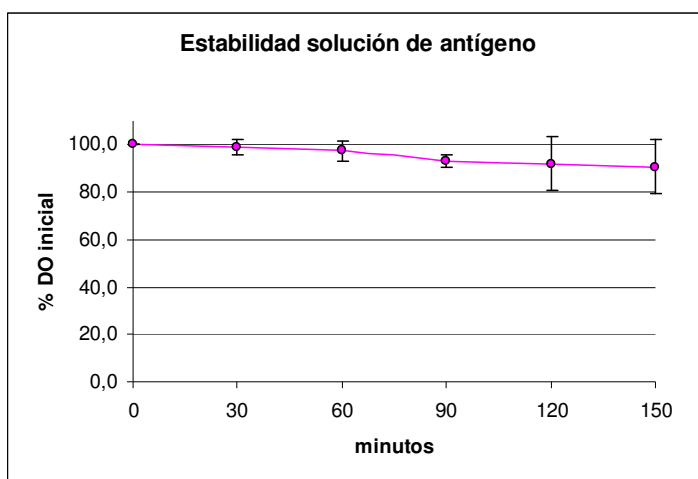


Figura 13 – Promedio de la densidad óptica de 5 muestras positivas con respecto al tiempo 0.

Estabilidad de las placas sensibilizadas y secas

Una vez fijadas las condiciones de sensibilización y bloqueo, es necesario acondicionar las placas para ser utilizadas mucho tiempo después de su producción. Para ello se incuban con una solución estabilizante, se secan en estufa y se envasan en estuche hermético. Se estudió la estabilidad acelerada de las placas en estas condiciones.

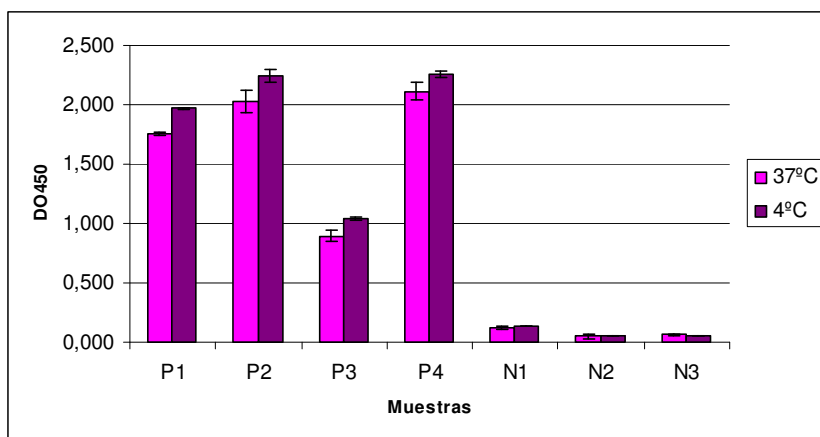


Figura 14- Efecto de la temperatura de almacenamiento (durante 3 semanas) sobre los resultados del ELISA.

En la figura 14 se observa una reducción de la reactividad del 10% en la placa almacenada a 37°C, lo cual indica que las placas secas y envasadas son muy estables [42].

A partir de este punto quedó definido el antígeno y las condiciones de preparación de las placas. Ahora se lleva a cabo el desarrollo de cada uno de los ensayos por separado comenzando por el de determinación de IgG, que es el primero que se utiliza para el diagnóstico.

Ensayo para la detección de IgG específicas anti-*T. gondii*

Este ensayo tiene un formato de ELISA indirecto cuantitativo para la detección de anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii* en suero humano. El ensayo se basa en la unión de los anticuerpos del paciente al antígeno del parásito adsorbido al pocillo de la placa. Esta reacción es revelada por un anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa que cataliza la formación de un complejo coloreado. La intensidad del color desarrollado es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presente en la muestra del paciente, permitiendo asignarle un título expresado en unidades internacionales.

El kit consistirá en:

- una placa de 96 pocillos sensibilizada con proteínas de superficie de taquizoítos, bloqueada, estabilizada y envasada.
- frascos conteniendo soluciones estabilizadas de: diluyente de muestras, conjugado, sustrato, lavado y frenado
- control negativo y calibradores

Desarrollo

Estudio del diluyente y dilución de las muestras

Para facilitar la manipulación en la rutina del laboratorio clínico, se decidió trabajar con una dilución de muestras que se pudiera hacer directamente en el pocillo de reacción. Una dilución de 1/21 se puede realizar sembrando 10 µl de muestra en 200 µl de diluyente.

Es necesario ajustar experimentalmente las condiciones de reacción de modo de maximizar las uniones específicas y minimizar las inespecíficas [50]. La muestra utilizada en estos ensayos es suero o plasma, la cual contiene una variedad de componentes, entre ellos otros anticuerpos que pueden interferir en el ensayo. Para bajar el ruido provocado por componentes de la muestra a alta concentración se debe utilizar un diluyente de muestras con algún agente que favorezca las uniones con mayor afinidad. Otra cualidad deseable para el paso de siembra de muestras es que el diluyente cambie de color al sembrar la muestra, de modo que se puedan diferenciar fácilmente los pocillos que contienen, de los que no contienen muestra. Para esto se agrega un colorante en el diluyente que vira con el cambio de pH provocado por la muestra.

Revelado de la reacción

Luego de la incubación de las muestras se revela la reacción mediante la adición de una solución conteniendo anticuerpos contra IgGs humanas conjugados a la enzima peroxidasa. La concentración de conjugado enzimático se debe ajustar para cada lote de producto, o sea, no todos los productos funcionan a una misma dilución, ni lo hacen todos los lotes del mismo producto. Esto se debe a que pueden tener diferente concentración de anticuerpos, moléculas de enzima por molécula de anticuerpo y avidéz. En la figura 15A se observa el efecto de diferentes diluciones de conjugado enzimático en la curva de calibración.

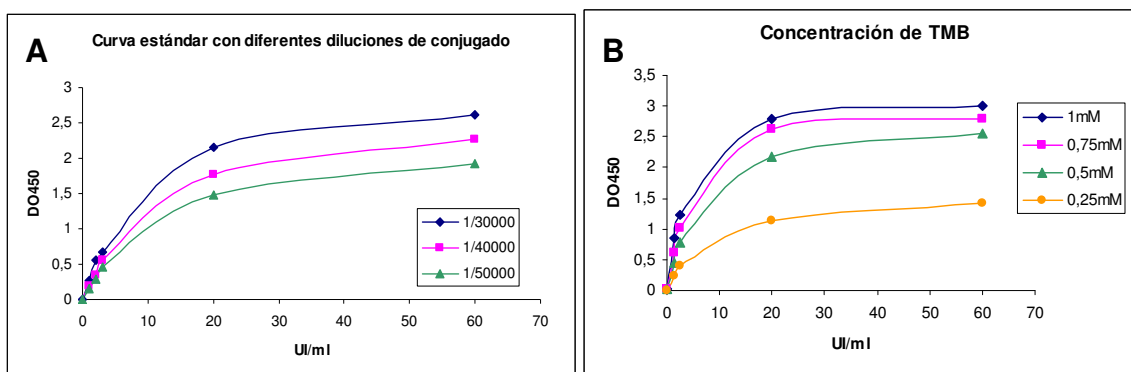


Figura 15- Curva de calibración revelada con diferentes diluciones del conjugado enzimático (A) o diferentes concentraciones de TMB (B).

Posteriormente se incubaba con una solución conteniendo el sustrato de la enzima, peróxido de hidrógeno, y TMB que es un aceptor de electrones cromogénico. También se puede modificar la concentración de TMB en la solución (figura 15 B).

Se escoge la dilución de conjugado enzimático y concentración de sustrato óptimas para obtener una curva estándar lo más lineal posible y con una DO del calibrador de 60 UI/ml que supere las 2 unidades de absorbancia, de forma que la bajada debida al envejecimiento del kit afecte lo menos posible su performance.

Cuantificación y curva de calibración

Existe un patrón internacional para la cuantificación de anticuerpos contra *T. gondii* [51]. A través del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) la OMS distribuye un suero humano estándar con anticuerpos contra *T. gondii* que contiene 20 Unidades Internacionales por ml (UI/ml) de IgGs específicas.

Al tratarse de un ensayo cuantitativo necesitamos asignarle un título a cada muestra en UI/ml calculado a partir de una curva de calibración. Esta curva de calibración se realizó a partir de diluciones de un pool de muestras positivas de título alto – mayor a 100 UI/ml. Realizando diluciones seriadas de ambos y comparando las curvas, se le pudo asignar al estándar secundario 140 UI/ml (figura 16A). Las diluciones de suero no tienen una respuesta de densidad óptica lineal, sin embargo se puede linealizar graficando el logaritmo de las UI (figura 16B), lo cual facilita la titulación de las muestras.

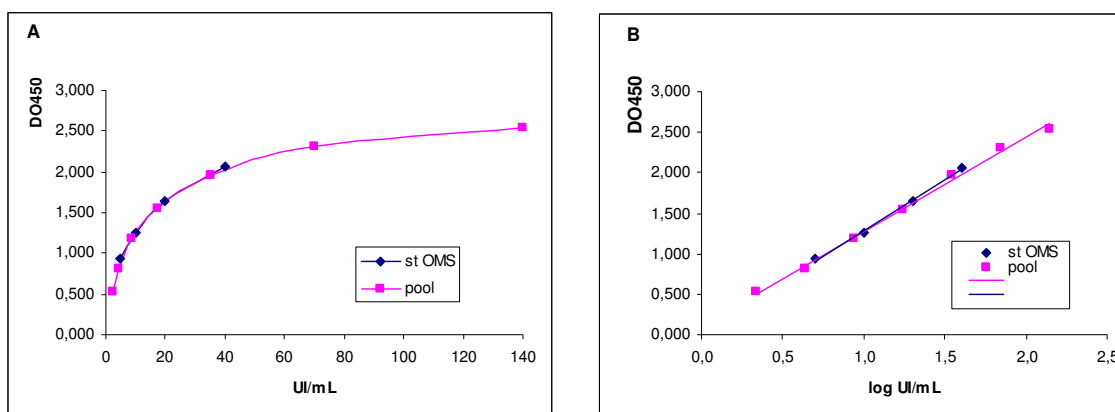


Figura 16- Titulación del estándar secundario utilizando el patrón de IgG anti-*T. gondii* de la OMS. A- Gráfico de la DO450 vs. UI/ml, B- Linealización del gráfico

Utilizando el estándar secundario se debe construir una curva que pueda ser provista en el kit. Esta debe tener ciertas características:

- Cubrir un amplio rango de título de anticuerpos.
- Estar compuesta por pocos puntos (no más de tres o cuatro), para que el usuario no deba utilizar demasiados pocillos de la placa quitándole espacio a las muestras.
- Permitir el cálculo del punto de corte entre las muestras positivas y negativas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones se construyó una curva con los siguientes puntos: 1,5; 2,5; 20 y 60 UI/mL.

Se estudió la correlación entre el título de 88 muestras positivas asignado según la técnica de VIDAS y nuestro ensayo. En la figura 17 se muestra que existe una correlación positiva alta entre las técnicas.

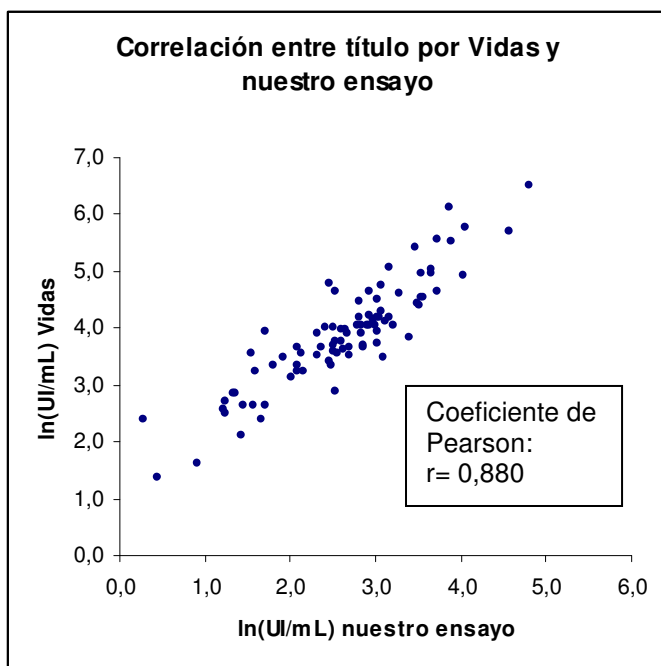


Figura 17: Se muestra la correlación entre el título de las muestras según nuestro ensayo en comparación con el ensayo de VIDAS. Se grafica el ln del título para observar mejor la distribución.

Cálculo del punto de corte o cut-off

Es necesario establecer un punto de corte o “cut-off” a partir del cual una muestra es diagnosticada como positiva. El valor de cut-off seleccionado va a determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas del ensayo. Para establecer el punto de corte se recurrió a la construcción de una curva ROC con el título de las muestras positivas y negativas. Con este análisis se hace un emparejamiento de los valores de sensibilidad y especificidad para cada posible punto de corte [42].

Se escogió el punto de 2UI/mL como punto de corte o cut-off, con el cual se obtiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 100%. Como se observa en la figura 18, se obtiene una muy buena discriminación de las muestras, además de observarse una gran dispersión en el título de las muestras positivas.

Se estableció una zona de indeterminación, o zona gris, entre los puntos de 1,5 y 2,5 UI/ml que nos permite tener una mejor precisión en el diagnóstico. Las muestras que caigan dentro de esta zona, deberán ser retesteadas para dar el diagnóstico definitivo.

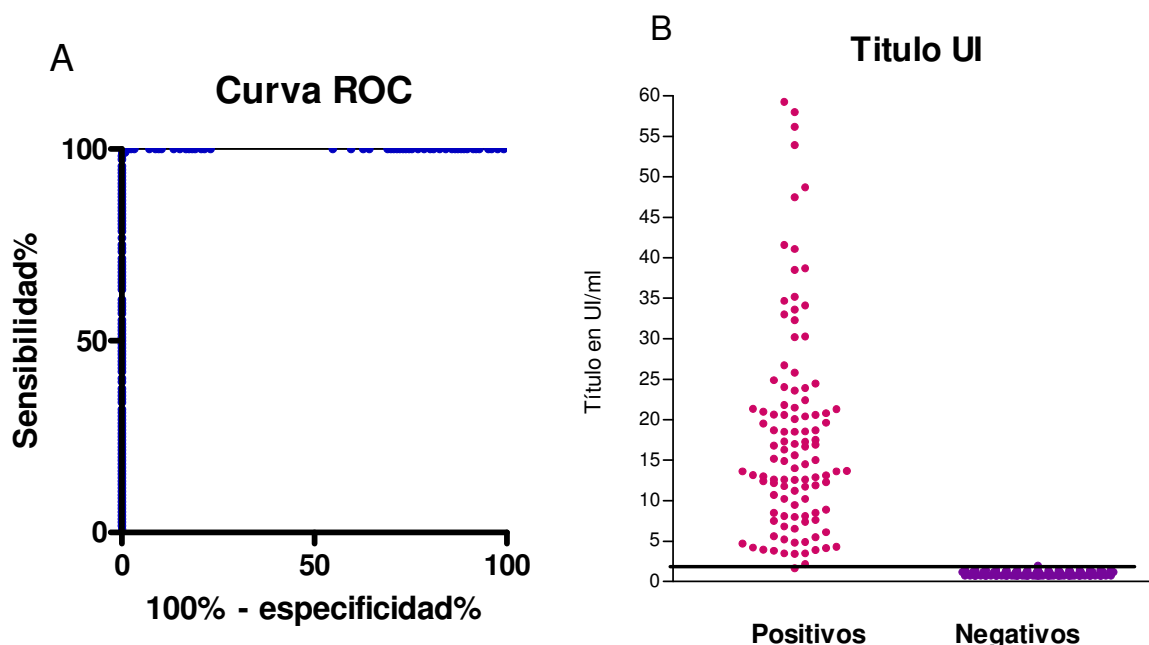


Figura 18: A) Curva ROC y B) distribución del título en Unidades Internacionales por ml (UI/ml) de las muestras positivas y negativas analizadas.

Estabilidad

Contemplando el periodo de tiempo que puede transcurrir entre la producción del kit hasta que llega a manos de su consumidor y la posibilidad de estoquear unidades en los laboratorios clínicos, es deseable que el producto tenga una validez de al menos un año conservado entre 2 y 8°C. Para ajustar los parámetros que afectan la estabilidad del kit son necesarios estudios de estabilidad acelerada para optimizar los tiempos de desarrollo. Deshpande en su libro propone, según la ecuación de Arrhenius, que la degradación provocada al almacenar un kit de ELISA una semana a 37°C emularía a la del almacenamiento durante un año a 4°C [52]. En algunos ensayos se almacena durante 10 días a 37°C para tener un mayor margen.

Estabilidad acelerada del kit completo

Con estos resultados se observa un descenso promedio en la reactividad de un 32%, sin embargo la clasificación de las muestras permanece igual en cada caso (figura 19). O sea, más allá que la DO disminuya, no cambia el diagnóstico de las muestras.

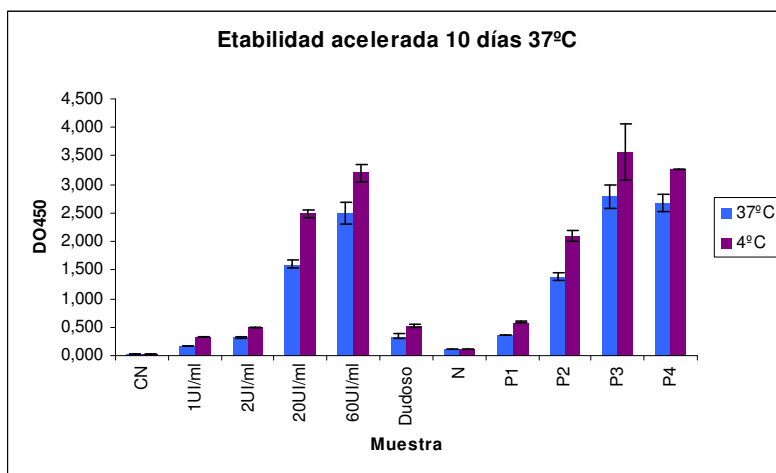


Figura 19- Reactividad de los calibradores (CN, 1, 2, 20 y 60 UI/ml) y muestras (N, P1-P4) con el kit almacenado a 37°C o a 4°C durante 10 días.

Validación

Una vez que se obtuvo el diseño final del ensayo, se produjo un lote piloto de 20 kits para llevar a cabo los estudios de validación. La validación de un ensayo se realiza para garantizar que el mismo sea capaz de clasificar muestras independientemente del operador, condiciones en las que se lleva a cabo el ensayo o la procedencia de las muestras [42].

Comparación con otros ensayos comerciales

Además de tener las muestras clasificadas según el ensayo de VIDAS, bioMérieux, comparamos algunas muestras, en especial las que tenían resultados discordantes, con el ensayo Platelia Toxo IgG, Biorad (figura 20). Este ensayo tiene el mismo formato que el nuestro.

Las muestras coinciden en su clasificación obteniéndose una DO mayor para nuestro ensayo en las muestras positivas y valores similares para las negativas.

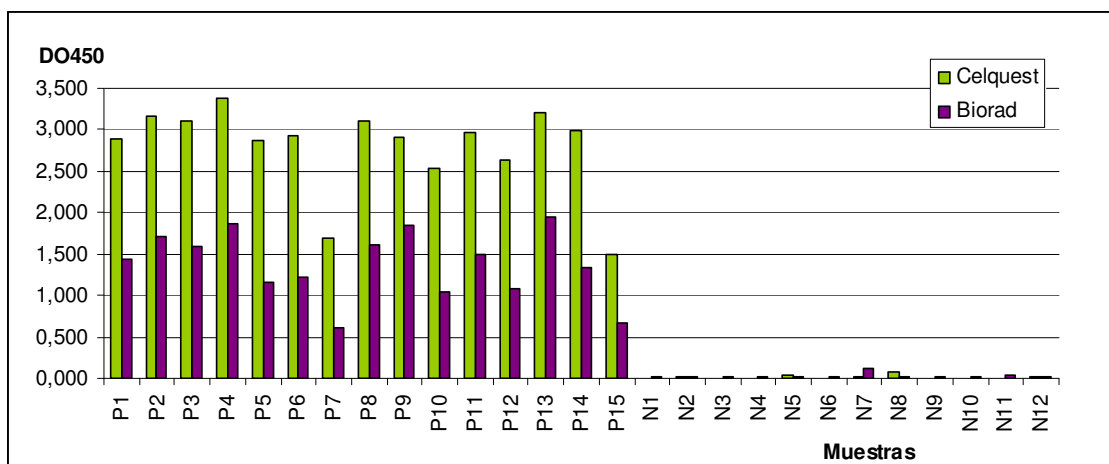


Figura 20 – Resultados de ELISA de 15 muestras positivas (P1-15) y 12 muestras negativas (N1-12) utilizando nuestro ensayo (Celquest) y uno comercial (Platelia Toxo IgG).

Evaluación diagnóstica

Lo ideal es que un ensayo sea capaz de discriminar la totalidad de las muestras positivas y negativas correctamente, con lo cual se tendrían valores de sensibilidad y especificidad del 100%. Sin embargo, esto casi nunca es posible y hay que establecer un equilibrio entre ambos parámetros [42]. Para el diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres embarazadas lo más importante es la especificidad del ensayo. Esto es así debido a que las pacientes con serología negativa son susceptibles a una primoinfección durante el embarazo y es importante brindarles información acerca de las medidas de prevención [32]. Por este motivo se optó por mantener la especificidad en 100% (intervalo de confianza al 95% entre 97.11% y 100.0%) aunque esto haga que la sensibilidad baje al 99,1% (IC 95% entre 95.13% y 99.98%).

Otros parámetros que definen al ensayo son los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN). Estos parámetros nos aportan más datos importantes, ya que además de la sensibilidad y especificidad del ensayo, dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población. En este caso, si consideramos una prevalencia del 40%, el VPP= 100% y el VPN= 99,4%.

Reproducibilidad

Se ensayó una muestra positiva de título medio durante varios días por un mismo operador. El objetivo del ensayo fue evaluar la variabilidad en el título obtenido en los diferentes ensayos.

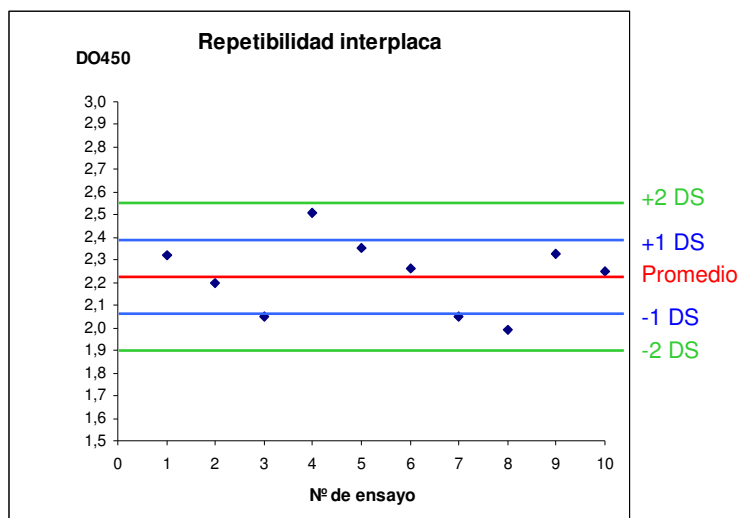


Figura 21- Lectura del calibrador de 20 UI/ml realizada en 10 corridas diferentes.

En el gráfico de la figura 21 se representa la DO del punto del estándar de 20UI/ml en los diferentes días. Se observa que en las 10 repeticiones, todos los puntos se encuentran dentro de los 2 desvíos estándar, obteniéndose un coeficiente de variación del 7,2%, lo cual se considera aceptable [42].

Repetibilidad inter-ensayo

	Muestra negativa	Muestra positiva débil	Muestra positiva	Muestra positiva fuerte
	DO			
Media	0,030	1,191	2,463	3,129
DS	0,004	0,125	0,197	0,104
%CV	12,5	10,5	8,0	3,3

Repetibilidad intra-ensayo

	Muestra negativa	Muestra positiva débil	Muestra positiva	Muestra positiva fuerte
	DO			
Media	0,018	0,700	1,532	2,391
DS	0,002	0,047	0,058	0,122
%CV	9,2	6,7	3,8	5,1

En general se acepta un coeficiente de variación < 10% para cada muestra dentro de un mismo ensayo y <15% para diferentes ensayos [42], por lo tanto los resultados fueron satisfactorios.

Validación por la Autoridad Sanitaria Nacional

La Dirección de Laboratorios de Salud Pública llevó a cabo una validación con muestras de paneles comerciales certificados y propios. Fueron testeadas 74 muestras positivas y 71 negativas obteniéndose 100% de sensibilidad y 100% de especificidad.

Evaluación externa

El kit fue evaluado en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Fueron testeadas un total de 90 muestras positivas y 90 muestras negativas. Se obtuvo un 100% de concordancia con el ELISA IgG TOXO IICS.

Estabilidad a tiempo real

Se estudió el comportamiento del kit cada tres meses durante un año. En la figura 22 se grafica la evolución de la DO y del título de 6 muestras positivas expresado como porcentaje con respecto al día 0. El día 0 corresponde al comportamiento del kit en la fecha en que se realizó el control de calidad final del lote. La DO de las muestras va disminuyendo progresivamente hasta que a los 12 meses se mantiene poco más del 60% de la inicial, sin embargo el título de las muestras fluctúa alrededor del 100% durante todo el período. En todos los ensayos la clasificación de las muestras positivas y negativas fue correcta. En resumen, a pesar de que la DO disminuye, se mantiene la capacidad de diagnosticar las muestras correctamente durante todo el período de vida útil del kit.

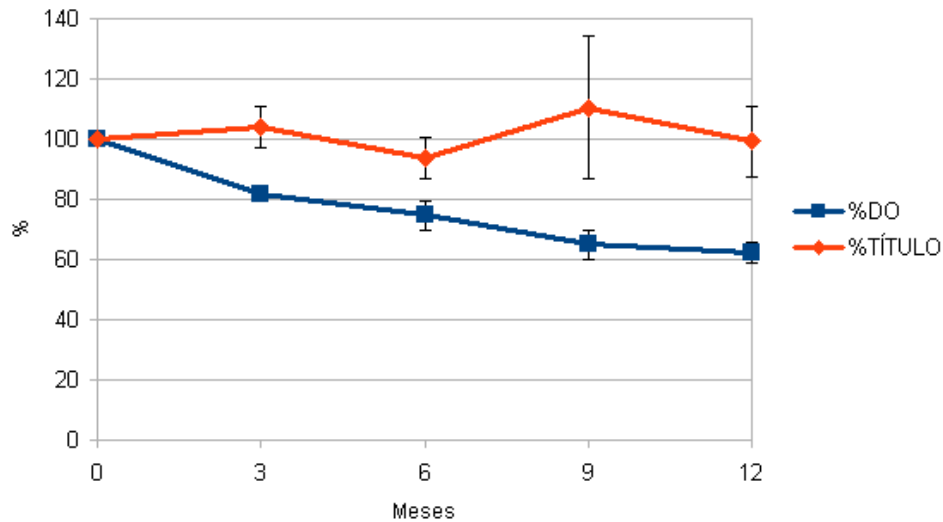


Figura 22- Evolución de la DO y el título de 6 muestras positivas durante 12 meses expresado como % con respecto al día 0.

Situación actual

El kit actualmente se encuentra registrado ante el Ministerio de Salud Pública por lo tanto ya está permitida su comercialización a nivel local. Además se está estudiando la estabilidad a tiempo real de 3 lotes del kit para corroborar los datos de estabilidad y reproducibilidad.

ELISA para la detección de IgM específica

Los kits de ELISA comerciales para la detección de IgM contra *Toxoplasma* se encuentran básicamente en dos formatos: ELISA de captura o ELISA indirecto con un “sorbente” en el diluyente de muestras [53].

En caso de utilizar un formato de ELISA indirecto común, se pueden observar dos tipos de efectos adversos provocados por las IgGs de la muestra [54]. Uno de ellos está dado por la competencia con las IgMs específicas por los sitios de unión al antígeno (figura 23 caso 1). En este caso se observa un descenso en la señal de una muestra IgM positiva pudiendo incluso detectarse como negativa (falso negativo). También existe interferencia en las muestras positivas a IgG y negativas a IgM que tienen factor reumatoideo (FR). El FR es un autoanticuerpo IgM que reconoce el Fc de las IgGs propias. En caso de haber FR en la muestra, este podría estar unido a IgGs específicas, que al reconocer el antígeno serían detectadas por el conjugado anti-IgM (figura 23 caso 2) y desarrollando color como si fuera una muestra positiva (falso positivo).

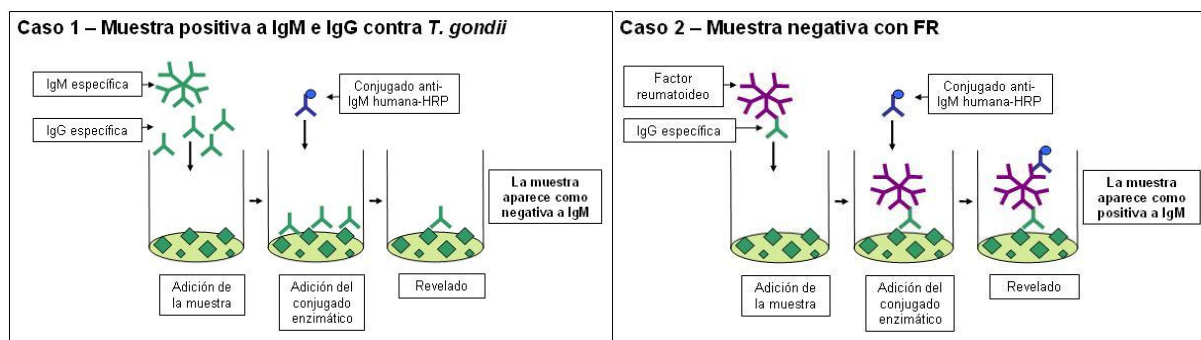


Figura 23- Posibles formas de interferencia de las IgGs en el ELISA para la detección de IgM.

En un estudio en el que comparan varios kits para la detección de IgM anti-*Toxoplasma* [55], no hallaron diferencias significativas en la performance -sensibilidad y especificidad- con los diferentes formatos de ELISA -indirecto o captura, anticuerpos monoclonales o policlonales. Se eligió trabajar con el sistema indirecto, por ser en un principio, el más simple de comenzar a trabajar. En este caso el ensayo es cualitativo, o sea, solo se determina si una muestra es positiva o negativa.

El kit consistirá en:

- una placa de 96 pocillos sensibilizada con proteínas de superficie de taquizoítos, bloqueada, estabilizada y envasada.

- frascos conteniendo soluciones de: diluyentes de muestras, conjugado enzimático anti-IgM humana, sustrato, lavado y frenado, estabilizadas.
- controles negativo y positivo.

Las muestras recibidas fueron clasificadas por Vidas Toxo IgM bioMérieux, IFI IgM, Platelia Toxo IgM Biorad y/o ImmunoComb Toxo IgM Organics. Dada la dificultad para definir si una muestra es IgM positiva o negativa – como se explica en la introducción – se consideraron positivas las muestras que fueron reactivas para 2 tests de un total de 3 realizados.

Desarrollo

Estudio del diluyente y dilución de las muestras

Según lo dicho en los párrafos anteriores, en este ensayo hay que tener en cuenta las interferencias provocadas por la presencia de IgG reactivas o FR en las muestras. Dichas interferencias pueden llevar a falsos positivos o falsos negativos en el diagnóstico de IgM específica. Una alternativa para evitar las interferencias es incubar las muestras con suero de cabra anti-IgG humana. La incubación con anticuerpos anti-IgG provoca la precipitación de las IgGs presentes en la muestra, impidiendo su unión al antígeno [53]. Mediante esta estrategia se eliminan las interferencias mostradas en la figura casos 1 y 2.

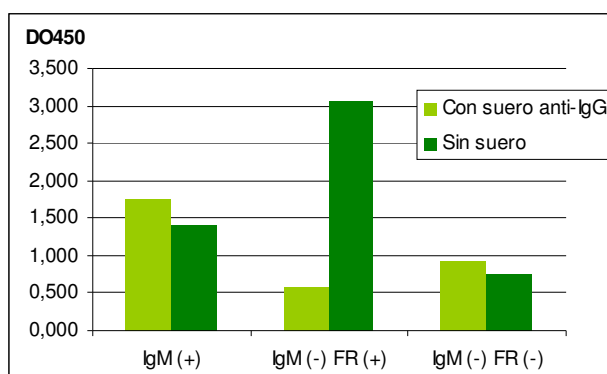


Figura 24: Efecto de la adición de suero de cabra anti-IgG humana en el diluyente en muestras con y sin factor reumatoideo (FR).

En la figura 24 se muestra como la adición de anti-IgG humana redujo la señal en la muestra que contiene factor reumatoideo. Si no se impide la unión de las IgGs, dicha muestra sería detectada como positiva, es decir, sería un falso positivo.

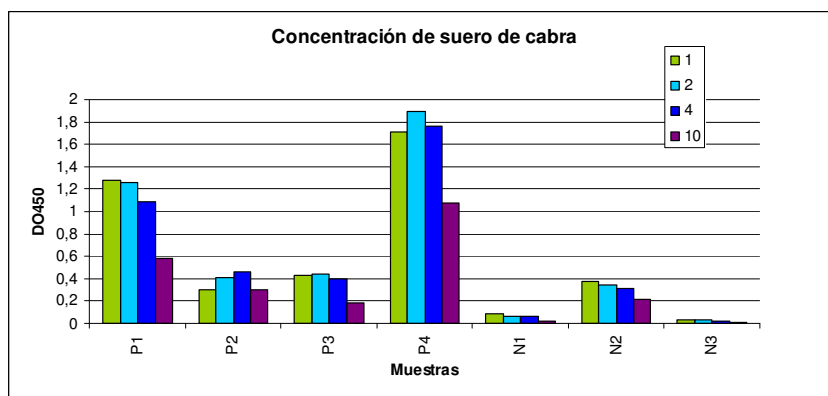


Figura 25- Evaluación de diferentes proporciones de suero de cabra anti-IgG humana en el diluyente de muestras, 1, 2, 4 y 10 µl suero de cabra por cada µl de muestra. Muestras positivas P1-P4, muestras negativas N1-N4.

Se ajustó luego la proporción óptima de suero de cabra con la que se obtuvo la mejor discriminación de muestras positivas y negativas (figura 25) a 2 µl por cada µl de muestra.

En los ensayos en que se detecta IgM generalmente se obtiene un mayor ruido de fondo que en los de IgG. En este ensayo se observaron mayores DO en las muestras negativas que las observadas con un kit comercial, siendo difícil establecer un punto de corte. Se estudiaron diferentes composiciones de diluyentes y diluciones de muestras. Finalmente optamos por diluir las muestras 1/100 en un diluyente con más agentes disociantes que el utilizado para el ensayo de IgG.

Con el objetivo de bajar el costo del suero de cabra anti-IgG humana, que es un reactivo comercial, se optimizó otro método de siembra de la muestra. En una primera instancia se siembra en todos los pocillos 50 µl de diluyente con el suero de cabra, y a continuación se agrega a los pocillos 50 µl de muestra diluida 1/50 en diluyente de muestras sin suero. La muestra se incubó 30 minutos a 37°C lo cual es suficiente para impedir la interferencia de las IgGs presentes en las muestras.

Controles y cálculo del cut-off

En este kit se va a suministrar un control positivo y uno negativo. Ambos van a ser utilizados para el cálculo de cut-off. Usar la DO de los controles para el cálculo de cut-off permite que cualquier factor que afecte al kit modifique también el punto de corte. Por ejemplo, a medida que el kit se acerca al fin de su vida útil va a bajar la DO de las muestras y controles, pero no se afecta el diagnóstico.

Mediante la construcción de una curva ROC, se encontró un punto de corte que nos permite detectar todas las muestras positivas sin afectar demasiado la especificidad del ensayo (Figura 26 A y B).

El cálculo de cut-off se realiza:

$$\text{Cut-off} = (\text{DOControl positivo} + \text{DOControl negativo}) \times 0,3$$

El factor de 0,3 se determinó de modo que el resultado de la operación coincidiera con el valor de cut-off obtenido a partir de la curva ROC.

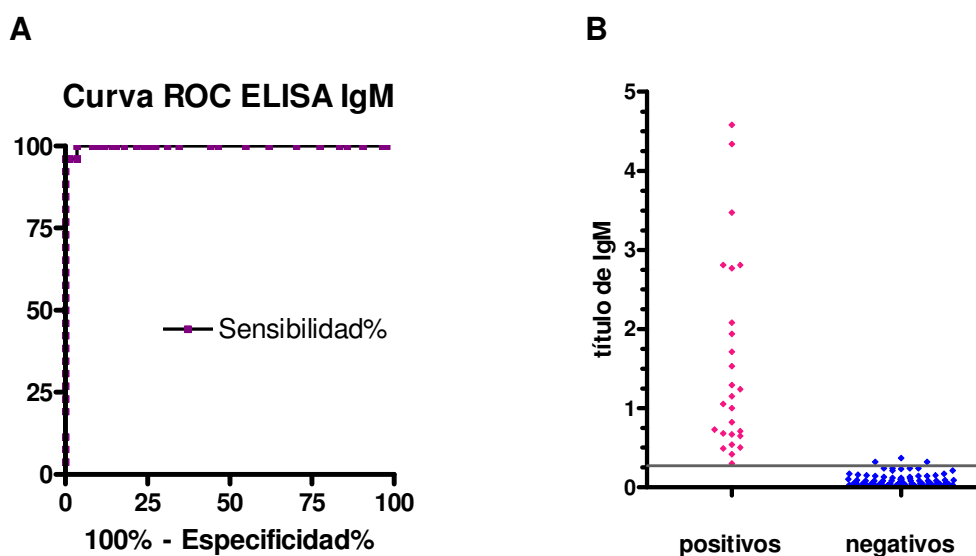


Figura 26: A: Curva ROC del ELISA IgM. B: Discriminación entre muestras positivas y negativas con el ELISA de IgM.

Evaluación por western blot

Se corrieron por western blot muestras positivas a IgM y algunas negativas que con el ensayo de ELISA dan reacción positiva. Mediante el ensayo (figura 27) se detecta una leve reacción en las muestras negativas con un patrón similar a las positivas. En el frente de corrida se observa una banda de mayor intensidad en las muestras positivas que puede deberse al reconocimiento del GPI proveniente de proteínas de membrana del parásito [56]. La banda cercana a los 30 kDa puede corresponder a la SAG1 y la de 35kDa a la P35. Estas se detectan mejor en la muestra IgM positiva aguda. Las bandas entre 55 y 70 kDa aparecen en todas las muestras. La banda de aproximadamente 55kDa podría corresponder a ROP1 [56], que es una proteína presente en la roptrias y es secretada durante la invasión de la célula huésped [57]. Previamente se describió que el GPI, ROP1, SAG1 y P35 son

reconocidos por las IgM de los pacientes cursando la fase aguda de la infección [56, 58]. Se sabe que la SAG1 es reconocida mayormente por su estructura tridimensional, en western blot donde la proteína se encuentra desnaturalizada, se detecta una menor reacción [59], entonces la banda observada en la figura 27 puede deberse a otra proteína que co-migra con la SAG1.

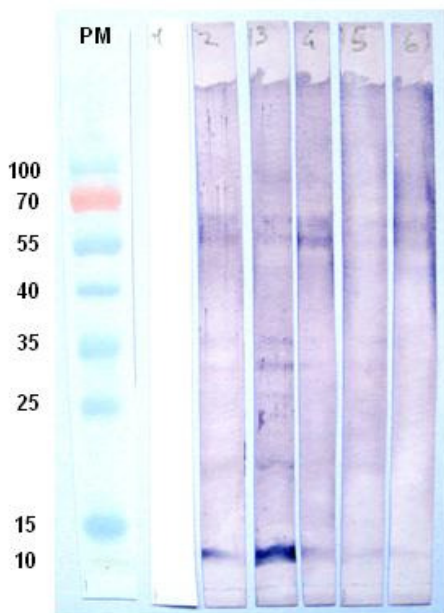


Figura 27: Western blot de IgM. 1- Blanco, 2 muestra IgM positiva crónica, 3- muestra IgM positiva aguda, 4 y 5- Muestras IgM negativas e IgG positivas que con nuestro ensayo dan positivo a IgM, 6- Muestra negativa alta a IgM e IgG negativa.

Estabilidad

Se produjeron dos lotes piloto para realizar los estudios de estabilidad acelerada y a tiempo real y toda la validación del ensayo.

Estabilidad acelerada

El kit del primer lote almacenado una semana a 37°C mantiene el 79% de la reactividad comparado con el control a 4°C, mientras que el segundo mantuvo el 89,5%. La concordancia en el diagnóstico fue del 100% para ambos lotes.

Estabilidad a tiempo real

Se almacenó un lote de 2 a 8 °C por el periodo de vida útil del kit – un año – para estudiar su performance durante ese período. En la figura 28 se puede ver que la DO fluctúa, probablemente debido a las variables independientes a cada ensayo, ya

que no se observa el descenso esperado debido a la degradación. La relación de la densidad óptica con respecto al cut-off (DO/CO) nos da una idea del comportamiento del kit frente a la clasificación de las muestras; este se mantiene durante todo el período alrededor del 100%. A lo largo del estudio no se afecta la concordancia diagnóstica de las muestras positivas y negativas. En suma, se considera que el ensayo se comporta de forma satisfactoria durante este período.

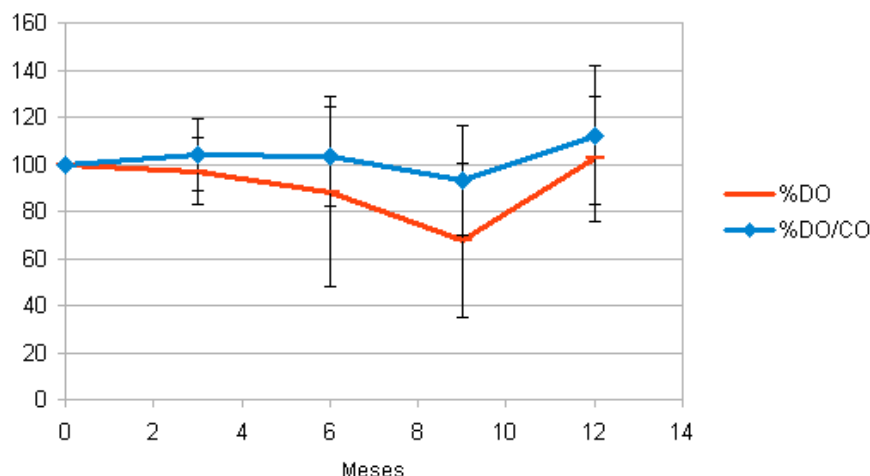


Figura 28– Evolución de la DO y DO/CO de 8 muestras positivas durante 12 meses expresado como % con respecto al día 0.

Validación

Evaluación diagnóstica

Se evaluó internamente un total de 26 muestras positivas a IgM y 84 muestras negativas a IgM y positivas a IgG. Con dichas muestras este ensayo presenta una sensibilidad del 100% (IC 95% entre 86,8% y 100.0%) y una especificidad del 96,4% (IC 95% entre 89,9% y 99,3%). En este caso es importante detectar todas las muestras positivas aunque esto signifique una bajada en la especificidad. En caso de obtener un resultado de IgM negativo se descarta la infección reciente, sin embargo, si la IgM es positiva se continúan los estudios del paciente.

Estudios de reproducibilidad

En los estudios de reproducibilidad intra e inter-placa se obtuvieron los siguientes valores:

Repetibilidad intra-ensayo

	Muestra negativa	Muestra positiva débil	Muestra positiva	Muestra positiva fuerte
	DO			
Media	0,030	0,200	0,782	1,823
DS	0,002	0,015	0,051	0,163
%CV	6,7	7,3	6,5	9,0

Repetibilidad inter-ensayo

	Muestra negativa	Muestra positiva débil	Muestra positiva	Muestra positiva fuerte
	DO			
Media	0,026	0,188	0,766	1,713
DS	0,005	0,028	0,058	0,124
%CV	19,0	14,7	7,6	7,2

En el estudio de reproducibilidad intra-ensayo se obtuvieron $CV < 10\%$ para todas las muestras. En el estudio inter-ensayo casi todas las muestras tuvieron una variación $< 15\%$. Todos estos resultados son satisfactorios, incluso para la muestra negativa ya que se obtuvo una desviación estándar muy baja.

Validación externa

Se llevó a cabo una validación por parte de la Dirección de Laboratorios de Salud Pública. Allí evaluaron la performance del ensayo utilizando paneles propios y comerciales. El resultado de la validación fue de 100% de sensibilidad y 100% de especificidad.

Situación actual

El producto se encuentra registrado ante el MSP y disponible para la venta. Continúan los estudios de estabilidad a tiempo real de los lotes producidos hasta el momento.

ELISA para la determinación de la aidez de los anticuerpos IgG específicos

El ELISA para la determinación de la aidez de las IgG específicas se realiza sobre la misma base del ELISA de IgG, incluyendo un paso de disociación de los anticuerpos de la muestra.

Desarrollo

Se parte de una placa sensibilizada en las mismas condiciones que se utiliza para la determinación de IgG. El primer paso para el desarrollo fue el ajuste de la concentración de agente disociante, en este caso se utiliza urea. Se evaluaron muestras previamente clasificadas como crónicas o agudas, según tuvieran anticuerpos con alto índice de aidez (C) o bajo índice (A), con diferentes concentraciones de urea (figura 28).

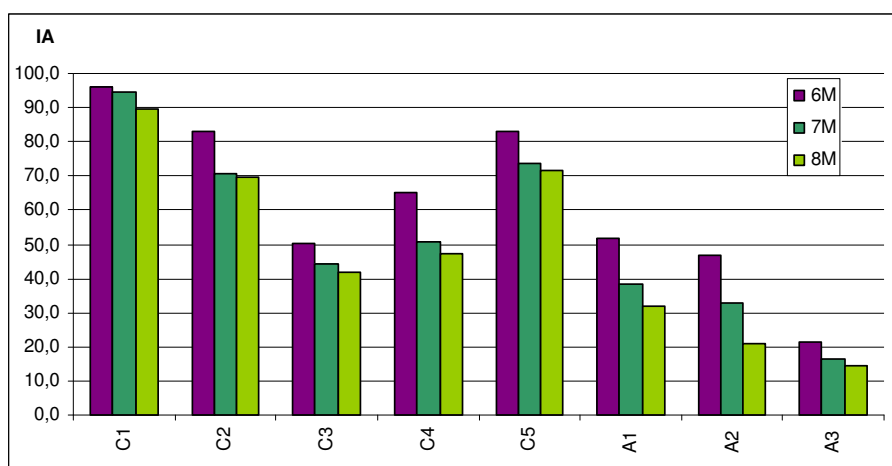


Figura 29: Índice de aidez (IA) medido como el porcentaje de disociación obtenido utilizando diferentes concentraciones de urea para disociar los anticuerpos de la muestra. C1 a C5 son muestras con alta aidez, A1 a A3 son muestras con baja aidez.

Se eligió la concentración con la que se obtuvo la mayor diferencia entre el IA de las muestras con bajo y alto IA previamente determinado por VIDAS® TOXO IgG Avidity. Se observa en la figura 29 que esto se logra con urea 8M. También se evaluaron diferentes tiempos y temperatura de incubación de las muestras y del disociante, así como la composición de la solución utilizada como control. Una vez que se fijaron estos parámetros, se ensayaron todas las muestras positivas o dudosas a IgM, para las cuales tuviéramos caracterización previa de aidez.

Si se corren todas las muestras a una misma dilución, 1/20, se observa un solapamiento en el IA de las muestras agudas y crónicas (figura 30 A). Esto se da porque en las muestras con muy alto título de IgG, la DO se encuentra en una meseta y es muy difícil de ver una disminución en las muestras tratadas con disociante. Esto se soluciona diluyendo las muestras que tengan título alto de anticuerpos IgG, para obtener un título entre 10 y 30 UI/ml al momento de sembrar. En estas condiciones, con el cut-off en un IA= 30%, se obtiene un 100% de sensibilidad y especificidad con respecto a la técnica de referencia (figura 30 B).

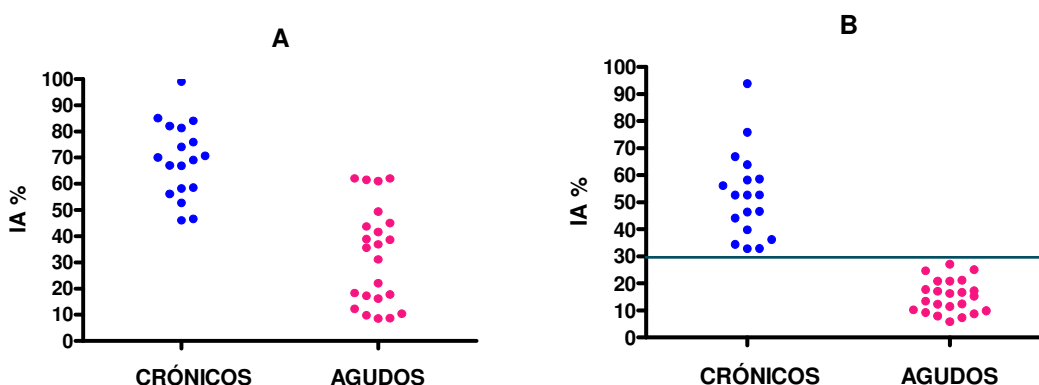


Figura 30: Índice de avidez de 18 muestras crónicas y 23 muestras agudas, A- todas sembradas a una dilución de 1/20 y B- ajustando la dilución de las muestras con alto título de IgG.

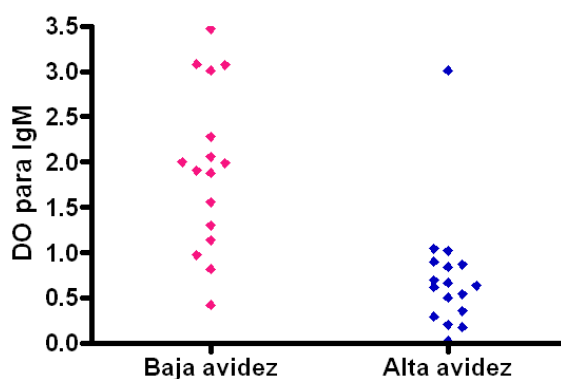


Figura 31: Relación entre la reacción para de IgM y la avidez de las IgGs de las muestras.

Se evaluó la relación que existe entre la reacción de IgM y la avidez de las IgGs. En la figura 31 se visualiza que existe una relación entre el “título” de IgM y la avidez en las muestras estudiadas.

Inmunoblot

Se analizaron muestras por inmunoblot de avidez (figura 32) con el objetivo de visualizar la afinidad de los anticuerpos frente a las diferentes proteínas antigénicas. Las tiras fueron incubadas de a pares con la misma muestra una aplicando disociante (D) y la correspondiente como control sin disociante (C).

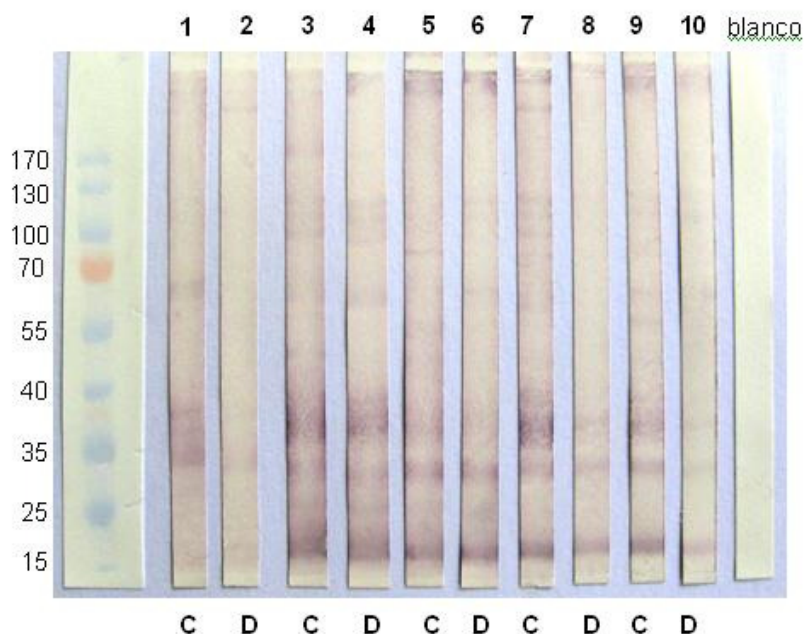


Figura 32: C-Control y D-Con disociante. 1,2- Control de baja avidez, 3,4- control de alta avidez, 5,6 muestra de alta avidez, 7,8- muestra de baja avidez, 9,10- muestra de baja avidez

En las muestras agudas se observa claramente un descenso en la intensidad de las bandas en las tiras incubadas con disociante, especialmente en la banda de masa relativa de 32-40kDa. Este dato es coincidente con lo descrito por Villavedra et al, 1999 [60], donde encuentran antígenos que presentan una mayor maduración de la afinidad que otros. Este dato puede ser útil, si es corroborado con más muestras, para el desarrollo de un ensayo de avidez con proteínas recombinantes.

Estabilidad

Estabilidad acelerada

En los dos lotes estudiados se observó que las muestras estudiadas no cambiaban de categoría (aguda – crónica) cuando se comparaba el kit almacenado a 37 °C con el control. Además, el promedio del IA en uno de los lotes se redujo al 87% y en el otro al 89%.

Estabilidad a tiempo real

En la figura 33 se muestra un estudio de estabilidad a tiempo real donde se observa el promedio del IA de muestras de baja avidez y de alta avidez cada tres meses hasta completar un año. El IA de las muestras fluctúa levemente pero el diagnóstico no se ve afectado a lo largo del estudio.

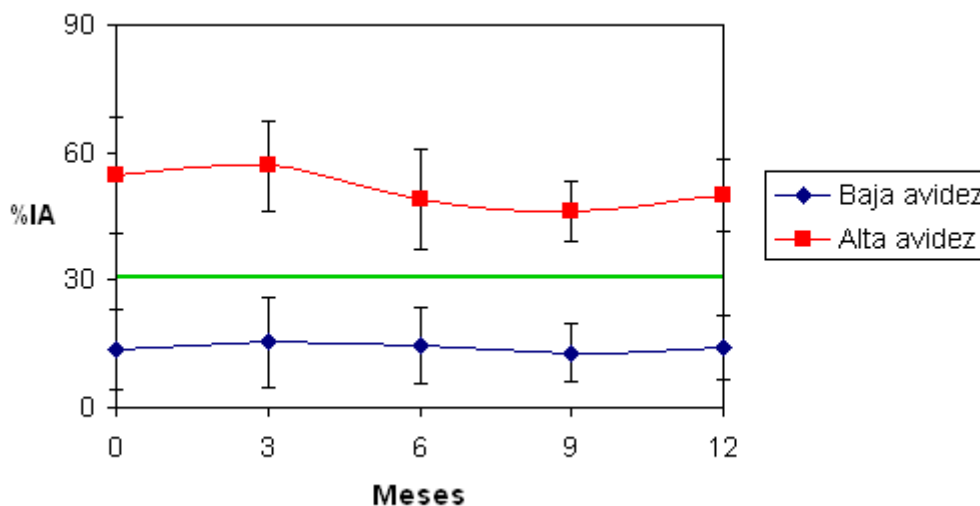


Figura 33: Evaluación del IA cada 3 meses utilizando 4 muestras de baja avidez (por debajo del 30%) y 4 de alta avidez (encima del 30%).

Validación

Validación interna

Se evaluaron 23 muestras agudas y 18 muestras crónicas. Todas fueron correctamente clasificadas por nuestro ensayo obteniéndose un 100% de sensibilidad (IC 95% entre 83,2% y 100%) y 100% de especificidad (IC 95% entre 81,5% y 100%).

Estudios de reproducibilidad

En los estudios de reproducibilidad intra e inter-placa se obtuvieron los siguientes coeficientes de variación:

Variación intraplaca

	DO CONTROL				DO CON DISOCIANTE			
	Muestra BA1/20	Muestra BA 1/200	Muestra AA 1/20	Muestra AA 1/200	Muestra BA1/20	Muestra BA 1/200	Muestra AA 1/20	Muestra AA 1/200
Media	0,841	0,349	1,105	0,926	0,052	0,007	0,540	0,576
DS	0,040	0,012	0,052	0,115	0,005	0,001	0,016	0,041
%CV	4,8	3,4	4,7	12,4	9,6	8,9	2,9	7,1

Variación interplaca

	DO CONTROL				DO CON DISOCIANTE			
	Muestra BA 1/20	Muestra BA 1/200	Muestra AA 1/20	Muestra AA 1/200	Muestra BA 1/20	Muestra BA 1/200	Muestra AA 1/20	Muestra AA 1/200
Media	1,676	0,685	2,030	1,905	0,094	0,032	1,081	1,191
DS	0,134	0,076	0,136	0,182	0,021	0,004	0,187	0,106
%CV	8,0	11,1	6,7	9,6	22,0	13,9	17,3	8,9

La variación interplaca es mayor en las muestras con disociante ya que se trata de valores muy bajos de DO. De todos modos estos resultados se consideran adecuados para un ensayo no cuantitativo.

Situación actual

El kit actualmente se encuentra en estudio por el Ministerio de Salud Pública para su registro. Además se está estudiando la estabilidad a tiempo real de 2 lotes del kit para corroborar los datos de estabilidad y reproducibilidad.

DISCUSIÓN GENERAL

Antígeno

El antígeno extraído de taquizoítos en el laboratorio se comporta de forma similar al comercial cuando se utiliza para el ensayo de detección de IgG, sin embargo, para la detección de IgM se observan marcadas diferencias entre ambos antígenos. Debido al precio y al control sobre la reproducibilidad que podemos tener por realizar la extracción en el laboratorio, elegimos este antígeno para todos los ensayos.

Los métodos de extracción con detergentes dieron mejores resultados que la sonicación. No se evaluaron variantes de la técnica de sonicación como para corroborar que con esta técnica no se obtenga un extracto adecuado, sin embargo, en un trabajo con *Neospora caninum*, que es un parásito relacionado, se obtuvieron resultados similares [61]. Incluso cuando se compararon los extractos comerciales, el extracto sonificado no era capaz de discriminar muestras positivas y negativas en IgM y mostraba una pobre discriminación en el de IgG.

Los taquizoítos utilizados en todos los casos, pertenecen a la cepa RH que forma parte del linaje clonal del tipo I [62]. Esta es una cepa mantenida en laboratorio por pasajes continuos en ratones o cultivo en células Vero [22]. A pesar de tratarse de una cepa que no es la que se acostumbra a encontrar en humanos, es ampliamente utilizada en ensayos de diagnóstico con los que se obtienen buenos resultados.

ELISA de IgG

Este ensayo es cualitativo y cuantitativo, permite determinar si el paciente está infectado y a su vez titular la muestra en Unidades Internacionales. Para lograr esto último, se construyó una curva de calibración que si bien, no se comporta de forma lineal, se puede linealizar para permitir la titulación. Para la cuantificación se utilizó el primer estándar internacional de la OMS de IgG humana anti-Toxoplasma, código 01/600 que contiene 20UI/ml [63]. Es útil conocer el título de los anticuerpos específicos para conocer la cinética de la respuesta y también puede ayudar con el pronóstico de la enfermedad. Por ejemplo, un título alto de IgG en pacientes con VIH ayuda a presumir encefalitis toxoplásmica [64]. También puede ayudar a diagnosticar una infección aguda si se detecta un aumento del título de IgG de 4 veces o más, en muestras extraídas de un mismo paciente con tres o cuatro semanas de diferencia [35].

Se escogió como punto de corte 2UI/ml y se estableció una zona gris entre 1,5 y 2,5UI/ml. Es difícil comparar este punto con el de otros ensayos, ya que la mayoría de los kits usan estándares previos como el TOXM o TOXS, los cuales cuantifican anticuerpos totales, a diferencia el 01/600 que contiene solamente IgG [65].

Con el punto de corte escogido, se obtiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 100%. En este ensayo es importante clasificar correctamente todas las muestras negativas con el objetivo de aconsejar a las pacientes sobre las formas de evitar la infección o detectar una primoinfección durante el embarazo.

ELISA de IgM y ELISA de Avidéz

El ensayo para la detección de IgM desarrollado en este trabajo se ajustó de forma de obtener una sensibilidad del 100%, bajando levemente la especificidad, que llegó al 96,4%. En este caso es importante detectar todas las muestras positivas a IgM, ya que a estas muestras/pacientes se las sigue estudiando para confirmar o descartar una infección aguda. Los tests para la determinación de infección reciente mediante detección de IgM, tienen un valor predictivo positivo bajo, menor al 50%. Sin embargo cuando se tienen en cuenta las muestras con alto título de IgM, este aumenta a más del 80%, siendo un buen indicador de infección aguda [66]. En este trabajo, tal como se describió previamente [67-68], se encontró una alta correlación entre la baja avidéz y el alto título de IgM. Cuando ambos están presentes, existe una alta probabilidad de que se trate de una muestra aguda. Sin embargo, la determinación del índice de avidéz por sí misma es confiable para diagnosticar infección pasada cuando se encuentran anticuerpos de alta avidéz, pero la persistencia en el tiempo de anticuerpos de baja avidéz no permite diferenciar una infección aguda de una pasada [69]. Por ello, es necesaria la combinación de las tres técnicas o el análisis de muestras seriadas para el diagnóstico certero de infección aguda.

CONCLUSIONES

Como resultado de este trabajo se obtuvo:

- Un método de extracción de proteínas de taquizoítos de *T. gondii* estandarizado y reproducible.
- ELISA para la detección de IgG cuantitativo con una sensibilidad del 99,1% y especificidad del 100%.
- ELISA para la detección de IgM con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,4%.
- ELISA para la determinación de la avidéz de los anticuerpos IgG que es capaz de clasificar correctamente todas las muestras.

Los ensayos desarrollados pueden producirse en formato de kit, ya que probaron ser estables, presentan una performance, presentación y manipulación comparable a otros kits comerciales y fueron validados y registrados por el Ministerio de Salud Pública. Además del valor individual de cada uno, es de destacar que los tres ensayos pueden ser utilizados en conjunto para realizar un diagnóstico serológico completo de toxoplasmosis en una única muestra.

Tareas a futuro

- Realizar ensayos de campo con muestras reales.
- Evaluar los ensayos con muestras de otras patologías, con diferentes anticoagulantes (en caso de trabajar con plasma).
- Comparar los extractos de RH con otras cepas aisladas de pacientes locales.
- Evaluar la fracción de 10-15kDa del antígeno por ELISA de IgM ya que es la que presenta mayor discriminación entre muestras positivas y negativas por WB.
- Estudiar la fracción de 32-40kDa por ELISA de avidéz, contra la que las IgGs específicas presentan una mayor maduración de la avidéz.
- Ampliar los ensayos de validación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] G. Pappas, *et al.*, "Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis," *Int J Parasitol*, vol. 39, pp. 1385-94, Oct 2009.
- [2] E. V. Carellos, *et al.*, "Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in minas gerais, Brazil," *PLoS One*, vol. 9, p. e88588, 2014.
- [3] S. R. Calegari Costa L, Gezuele E, Zanetta E, Acuña AM, Ballesté R, Basmadján Y, Rosa R, Puime A, Arteta Z, Russi C, Xavier B, Risso M, Cabrera MJ, González Arias M, Combol A, Acosta G, Da Rosa WD, González Curbelo M, Liporace YV., "Enfermedades parasitarias y micóticas en Uruguay - Reseña cuali-cuantitativa de situación 2004," 2004.
- [4] A. M. Tenter, *et al.*, "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans," *Int J Parasitol*, vol. 30, pp. 1217-1258, 2000.
- [5] I. J. Blader and J. P. Saeij, "Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence," *APMIS*, vol. 117, pp. 458-76, May 2009.
- [6] I. Villena, *et al.*, "Detection of specific immunoglobulin E during maternal, fetal, and congenital toxoplasmosis," *J Clin Microbiol*, vol. 37, pp. 3487-90., 1999.
- [7] D. Dunn, *et al.*, "Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling," *Lancet*, vol. 353, pp. 1829-33, May 29 1999.
- [8] R. E. Holliman, *et al.*, "The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity," *Epidemiol Infect*, vol. 112, pp. 399-408, 1994.
- [9] F. M. Lopes-Mori, *et al.*, "Programs for control of congenital toxoplasmosis," *Rev Assoc Med Bras*, vol. 57, pp. 594-9, Sep-Oct 2011.
- [10] M. Dedicoat and N. Livesley, "Management of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected adults--a review," *S Afr Med J*, vol. 98, pp. 31-2, Jan 2008.
- [11] D. Hill and J. P. Dubey, "*Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention," *Clin Microbiol Infect*, vol. 8, pp. 634-40, Oct 2002.
- [12] D. K. Howe and L. D. Sibley, "*Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease," *J Infect Dis*, vol. 172, pp. 1561-6, Dec 1995.
- [13] F. Robert-Gangneux and M. L. Darde, "Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis," *Clin Microbiol Rev*, vol. 25, pp. 264-96, Apr 2012.
- [14] D. K. Howe, *et al.*, "Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis," *J Clin Microbiol*, vol. 35, pp. 1411-4, Jun 1997.
- [15] H. F. Pena, *et al.*, "Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil," *Int J Parasitol*, vol. 38, pp. 561-9, Apr 2008.
- [16] A. K. Abbas, *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 4^a edición ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 2000.
- [17] A. M. Pollard, *et al.*, "Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*," *Infect Immun*, vol. 76, pp. 103-10, Jan 2008.
- [18] J. P. Dubey and C. P. Beattie, *Toxoplasmosis of animals and man*. Florida: CRC press, 1988.
- [19] L. Gras, *et al.*, "Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres," *Acta Paediatr*, vol. 94, pp. 1721-31, Dec 2005.
- [20] N. Gargano, Beguetto, E. and Spadoni, A., "Chimeric recombinant antigens of *Toxoplasma gondii*," 2008.

- [21] G. T. Maine, Patel, C.B., Ginsburg, S.R. and Bliese, T.R., "Genetically engineered P30 antigen, improved antigen cocktail, and uses thereof," 2006.
- [22] X. M. Sun, *et al.*, "Identification of antigenic proteins of *Toxoplasma gondii* RH strain recognized by human immunoglobulin G using immunoproteomics," *J Proteomics*, vol. 77, pp. 423-32, Dec 21 2012.
- [23] M. Gorgievski-Hrisoho, *et al.*, "Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*," *J Clin Microbiol*, vol. 34, pp. 1506-11, Jun 1996.
- [24] R. Kaul, *et al.*, "Detection of immunoglobulin M antibodies specific for *Toxoplasma gondii* with increased selectivity for recently acquired infections," *J Clin Microbiol*, vol. 42, pp. 5705-9, Dec 2004.
- [25] P. A. Jenum and B. Stray-Pedersen, "Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women," *J Clin Microbiol*, vol. 36, pp. 2907-13, 1998.
- [26] D. Filisetti and E. Candolfi, "Immune response to *Toxoplasma gondii*," *Ann Ist Super Sanita*, vol. 40, pp. 71-80, 2004.
- [27] M. H. Bessieres, *et al.*, "IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis," *J Clin Pathol*, vol. 45, pp. 605-8, 1992.
- [28] C. a. L. S. Institute, "Clinical Use and Interpretation of Serologic Tests for *Toxoplasma gondii*; Approved Guideline," vol. 24, ed: NCCLS, 2004.
- [29] A. B. Sabin and H. A. Feldman, "Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*)," *Science*, vol. 108, pp. 660-663, Dec 10 1948.
- [30] I. Reiter-Owona, *et al.*, "The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis," *Bull World Health Organ*, vol. 77, pp. 929-35, 1999.
- [31] B. Magi and L. Migliorini, "Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis," *New Microbiol*, vol. 34, pp. 93-5, Jan 2011.
- [32] R. Durlach, *et al.*, "[Argentine Consensus of Congenital Toxoplasmosis]," *Medicina (B Aires)*, vol. 68, pp. 75-87, 2008.
- [33] M. D. D. Bruce Burlington. (1997, *FDA Public Health Advisory: Limitations of Toxoplasma IgM Commercial Test Kits*. Available: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucm062411.htm>
- [34] M. Wilson, *et al.*, "Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group," *J Clin Microbiol*, vol. 35, pp. 3112-5, Dec 1997.
- [35] J. G. Montoya, "Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis," *J Infect Dis*, vol. 185 Suppl 1, pp. S73-82, Feb 15 2002.
- [36] J. S. Remington, *et al.*, "Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis," *J Clin Microbiol*, vol. 42, pp. 941-5, Mar 2004.
- [37] G. R. Pullen, *et al.*, "Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution," *J Immunol Methods*, vol. 86, pp. 83-7., 1986.
- [38] MSP, "Guías en salud sexual y reproductiva," *Ministerio de Salud Pública Dirección General de la Salud Programa Nacional Prioritario de Salud de la Mujer y Género*, 2007.
- [39] I. A. Conti Díaz, Freyre, A.; Queiruga, G., Noya, C., Méndez, J., Gedda, C., Reig, B., Acosta, M., López Jordi, J., González Banfi, G. , "Estudio de la toxoplasmosis en la Unidad de Perinatología del BPS en el período 1991-1996," *Revista Médica del Uruguay*, vol. 14, pp. 226 - 235, 1998.
- [40] S. Skariah, *et al.*, "*Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion," *Parasitol Res*, vol. 107, pp. 253-60, Jul 2010.
- [41] U. Gross, *et al.*, "Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis," *Ann Ist Super Sanita*, vol. 40, pp. 65-70, 2004.

- [42] J. R. Crowther, *The ELISA guidebook*, Second edition ed.: Humana Press, 2009.
- [43] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, pp. 680-5, Aug 15 1970.
- [44] C. Ketzoian, Ed., *Estadística médica. Conceptos y aplicaciones al inicio de la formación médica* (Línea de Métodos Cuantitativos. Montevideo, 2004, p.^pp. Pages.
- [45] H. Ahmed, *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization*: CRC Press, 2005.
- [46] J. D. Dunn, *et al.*, "The *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7 is phosphorylated upon invasion and forms an unexpected association with the rhoptry proteins ROP2 and ROP4," *Infect Immun*, vol. 76, pp. 5853-61, Dec 2008.
- [47] V. Conseil, *et al.*, "Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43, pp. 1358-61, Jun 1999.
- [48] M. S. Roiko and V. B. Carruthers, "New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress," *Cell Microbiol*, vol. 11, pp. 1444-52, Oct 2009.
- [49] T. J. Dowse, *et al.*, "Roles of proteases during invasion and egress by *Plasmodium* and *Toxoplasma*," *Subcell Biochem*, vol. 47, pp. 121-39, 2008.
- [50] J. P. Gosling, *Immunoassays : a practical approach*. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2000.
- [51] P. Rigsby, Rijpkema, S., Guy, E.C., Gaines Das, R., "International collaborative study. Evaluation of a candidate replacement international standard preparation for anti-*Toxoplasma* serum, human," *Expert Committee on biological standardization. WHO*, 2003.
- [52] S. S. Deshpande, *Enzyme immunoassays : from concept to product development*. New York: Chapman & Hall, 1996.
- [53] T. B. Martins, *et al.*, "An evaluation of the effectiveness of three immunoglobulin G (IgG) removal procedures for routine IgM serological testing," *Clin Diagn Lab Immunol*, vol. 2, pp. 98-103, Jan 1995.
- [54] J. M. Chatterton, *et al.*, "Absorption of IgG does not enhance toxoplasma IgM and IgA immunoblotting," *J Med Microbiol*, vol. 48, pp. 593-5, Jun 1999.
- [55] C. Verhofstede, *et al.*, "Comparison of six commercial enzyme linked immunosorbent assays for detecting IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*," *J Clin Pathol*, vol. 42, pp. 1285-90, Dec 1989.
- [56] B. Meek, *et al.*, "Igm recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by sera of acutely or latently infected humans," *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 45, pp. 45-52., 2003.
- [57] I. Coppens and K. A. Joiner, "Parasitehost cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention?," *Expert Rev Mol Med*, vol. 2001, pp. 1-20, Jan 15 2001.
- [58] B. Lu, *et al.*, "*Toxoplasma gondii*: expression pattern and detection of infection using full-length recombinant P35 antigen," *Exp Parasitol*, vol. 113, pp. 83-90, Jun 2006.
- [59] B. Meek, *et al.*, "Dissecting the IgM antibody response during the acute and latent phase of toxoplasmosis," *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 41, pp. 131-7, Nov 2001.
- [60] M. Villavedra, *et al.*, "IgG recognizing 21-24 kDa and 30-33 kDa tachyzoite antigens show maximum avidity maturation during natural and accidental human toxoplasmosis," *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, vol. 41, pp. 297-303, 1999.
- [61] A. Zintl, *et al.*, "Comparison of different methods for the solubilisation of *Neospora caninum* (Phylum Apicomplexa) antigen," *Vet Parasitol*, vol. 135, pp. 205-13, Feb 18 2006.

- [62] J. P. Saeij, *et al.*, "Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host," *Trends Parasitol*, vol. 21, pp. 476-81, Oct 2005.
- [63] "54th report: Number 927," *WHO Expert committee on biological standardization technical report series*.
- [64] J. E. Vidal, *et al.*, "Importance of high IgG anti-*Toxoplasma gondii* titers and PCR detection of *T. gondii* DNA in peripheral blood samples for the diagnosis of AIDS-related cerebral toxoplasmosis: a case-control study," *Braz J Infect Dis*, vol. 15, pp. 356-9, Jul-Aug 2011.
- [65] P. Rigsby, *et al.*, "Evaluation of a candidate international standard preparation for human anti-*Toxoplasma* immunoglobulin G," *J Clin Microbiol*, vol. 42, pp. 5133-8, Nov 2004.
- [66] M. De Paschale, *et al.*, "Revision of the positive predictive value of IgM anti-*Toxoplasma* antibodies as an index of recent infection," *New Microbiol*, vol. 31, pp. 105-11, Jan 2008.
- [67] M. Leite, *et al.*, "Correlation between specific IgM levels and percentage IgG-class antibody avidity to *Toxoplasma gondii*," *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, vol. 50, pp. 237-42, Jul-Aug 2008.
- [68] K. H. Horváth, Szénási, Z., Danko, J., and Kucsera, I., "Value of the IgG avidity in the diagnosis of recent toxoplasmosis: A comparative study of four commercially available anti-*Toxoplasma gondii* IgG avidity assays," *Acta Parasitologica*, 2005, 50(3), 255–260; ISSN 1230-2821, vol. 50, pp. 255-260, 2005.
- [69] D. Ashburn, *et al.*, "Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy?," *J Clin Pathol*, vol. 51, pp. 312-5, Apr 1998.