

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Estandarización y evaluación de un ELISA indirecto
para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma
gondii* en población peruana**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Miguel Vicente Mogollón Almidón

ASESOR

Juan Atilio Jiménez Chunga

Lima - Perú

2016

*Dedicado a Filomena, por acompañarme desde que mis
ojos conocieron la luz y los suyos dejaron de percibirla.
Por su cariño, sus enseñanzas y por no dejarme solo.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por haber contribuido en mi formación profesional y sentirme orgulloso de ser Sanmarquino.

Al Dr. Juan Jiménez Chuga, mi asesor y mentor; por iniciar y alimentar mi interés por la investigación científica, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de la tesis y otras ocasiones, además de su gentil amistad.

A la Dra. Dolores Correa Beltrán, mi co-asesora; por confiar en mí, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme aprender de ella, y por la satisfacción de poder contar con ella a nivel académico y personal.

A la Dra. Maritza Calderón Sánchez, por las enseñanzas y constante apoyo recibido durante los años que la conozco.

A la Dra. Rosa Martínez Rojas, por permitirme trabajar esta tesis en su laboratorio y por toda la ayuda que recibí de su parte.

A todo el grupo del Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría de México, por la valiosa ayuda para la ejecución de este trabajo y por hacerme sentir como en casa durante las capacitaciones en la Ciudad de México.

A mis padres, Miguel y Sonia, por ser un claro ejemplo de lucha y perseverancia para ofrecer un mejor futuro a sus hijos. Gracias también por darme dos hermanos a quienes quiero mucho.

A mi familia, por depositar su confianza en mí y por su constante apoyo en todo sentido. De manera especial a Roni y Carmen por contribuir a que mis sueños se hagan realidades.

A mis amigos, de manera especial a Cristina, Carla, Raúl, Ana, Joseph y Cristian, por los buenos momentos vividos durante los años del pregrado y por su gran amistad.

A Diego, mi mejor amigo, por su valiosa e incondicional amistad a lo largo de todos estos años. Por acompañarme en los buenos y malos momentos, y por todo el camino que nos toca recorrer, salud por ello.

RESÚMEN

La infección por *Toxoplasma gondii* es una zoonosis de amplia distribución mundial cuyo impacto en salud pública se circunscribe mayormente a los cuadros clínicos de toxoplasmosis congénita, ocular y cerebral. A la fecha, se han implementado y adaptado una variedad de técnicas serológicas para el diagnóstico y estudio de esta parasitosis; sin embargo, son escasos los estudios en torno a la evaluación y validación de las mismas.

El objetivo del presente estudio fue estandarizar y evaluar un ELISA casero para la detección de anticuerpos IgG anti *T. gondii* en población peruana.

Se sometió a evaluación mediante un estuche referencial de ELISA mexicano, un total de 178 sueros de personas de Perú, los cuales fueron catalogados como positivos o negativos a la presencia de anticuerpos IgG anti *T. gondii*. Para la determinación del punto de corte del ELISA casero se emplearon curvas ROC y se determinaron los parámetros diagnósticos de la técnica; así como la correlación inter e intra ensayo.

Como resultado se obtuvo de punto de corte un índice de reactividad de 1.0; una sensibilidad del 85.9%, especificidad del 70.1%, valor predictivo positivo del 65.6% y valor predictivo negativo del 88.2%. En las evaluaciones inter e intra ensayo se obtuvieron coeficientes de 0.93, 0.88, 0.57, 0.95, y 0.975, respectivamente. La frecuencia de anticuerpos IgG anti *T. gondii* fue del 39.8%.

La técnica de ELISA estandarizada y evaluada para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en población peruana, es una técnica altamente sensible, por lo cual puede ser empleada en estudios de tamiz o seroprevalencia; debido a su fácil ejecución y bajo costo.

Palabras clave: Evaluación, ELISA, anticuerpos IgG, *Toxoplasma gondii*, Perú

ABSTRACT

Toxoplasma gondii infection is a zoonosis with worldwide distribution which public health impact is related to congenital, ocular and cerebral toxoplasmosis. To date, a variety of serological diagnostic techniques had been implemented and adapted to study this parasitosis; however, few studies about their evaluation and validation have been carried. The aim of this research was the standardization and evaluation of an *in house* ELISA for IgG antibodies against *T. gondii* in Peruvian population.

Was evaluated a sample of 178 Peruvian sera, which were cataloged as positives or negatives in comparison to a ELISA reference test. To determine cut-off and diagnostic parameters of the *in house* ELISA we employed ROC curves. Also we established inter and intra assay variation coefficients.

The result was a cut-off was a reactivity index of 1.0; with 85.9% sensibility, 70.1% specificity, 65.6% positive predictive value and 88.2% negative predictive value. A correlation inter and intra assay correlation of 0.93, 0.88, 0.57, 0.95, and 0.975, respectively, was obtained. The IgG antibodies frequency to *T. gondii* was 39.8%.

The *in house* ELISA evaluated and standardized for IgG antibodies against *T. gondii* in Peruvian population, is a technique with high sensitivity, thus can be used in screening or seroprevalence studies; besides it is easy to perform and of low cost.

Key words: Evaluation, ELISA, IgG antibodies, *Toxoplasma gondii*, Peru

ABREVIATURAS

CFA:	Ensayo de fijación del complemento
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
HAI:	Prueba de hemaglutinación indirecta
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
MAT:	Ensayo de aglutinación modificada
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RHA:	Reacción de hemaglutinación
ROC:	Característica operativa del receptor
TORCH:	Perfil de toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus y herpes simple

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Biología de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.2. Toxoplasmosis en humanos	5
2.3. Epidemiología	7
2.4. Métodos diagnósticos	9
2.5. Toxoplasmosis en el Perú	12
2.5.1. Toxoplasmosis en animales	12
2.5.2. Toxoplasmosis en humanos	17
2.6. Validación de pruebas diagnósticas	25
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS	30
V. MATERIAL Y MÉTODOS	31
VI. RESULTADOS	37
VII. DISCUSIÓN	46
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. RECOMENDACIONES	50
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
XI. ANEXOS	63

I. INTRODUCCIÓN

La Toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria de amplia distribución mundial. Si la infección se adquiere durante la gestación, puede causar morbi-mortalidad significativa en las madres y sus hijos, siendo uno de los cuadros clínicos de mayor impacto, al igual que en pacientes inmunosuprimidos (Elsheikha, 2008; Petersen, 2007; Weiss & Dubey, 2009).

La Organización Mundial de la Salud, en el marco de las prioridades de investigación en zoonosis e infecciones marginalizadas, destaca la necesidad de desarrollar técnicas diagnósticas que sean económicas y seguras para el estudio de la toxoplasmosis congénita y encefálica (WHO, 2012).

El conocimiento de la infección por *Toxoplasma gondii* y la toxoplasmosis en nuestro país es limitado; los pocos registros publicados indican una seroprevalencia en humanos que oscila entre el 40 y 56.7 %, considerando que las técnicas empleadas no han sido validadas en nuestra población y han sido estudios aislados de las últimas dos décadas (Calderón et al., 1992; Soria et al., 2004).

Es importante validar pruebas diagnósticas para grupos humanos de un determinado espacio geográfico, como por ejemplo un país, en el cual serán aplicadas; especialmente para estudios seroepidemiológicos (Caballero-Ortega et al., 2014), ya que los parámetros diagnósticos pueden variar entre personas de diferentes regiones geográficas, por el grado de exposición y los antígenos del parásito que pueden variar; de hecho se ha reportado que muchos antígenos de *Toxoplasma gondii* son polimórficos, por lo que un individuo expuesto a variantes locales podría no reaccionar adecuadamente a los antígenos de estuches comerciales fabricados con antígenos de parásitos prevalentes en otros lugares.

La necesidad de estandarizar y evaluar un ELISA capaz de detectar anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* se fundamenta en el hecho que representa una técnica serológica práctica, económica y con capacidad para evaluar un mayor número de muestras en

comparación con otros ensayos; por lo cual representa una herramienta no solo para diagnóstico sino también epidemiológico.

Por lo tanto, es preciso estandarizar y validar estas pruebas diagnósticas para ejecutar estudios seroepidemiológicos en nuestro país, debido a la falta de información sobre la situación actual de la toxoplasmosis en Perú; ello con miras a recoger cifras epidemiológicas a nivel nacional, las cuales permitan promover a futuro campañas de diagnóstico, prevención y control en nuestro país.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Biología de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un protozooario parásito intracelular obligado capaz de infectar vertebrados de sangre caliente tanto de ambientes marinos como terrestres, incluido el ser humano (Tenter et al., 2000). Desde su descubrimiento en 1908 por Nicolle y Manceaux, se han realizado numerosos estudios los cuales resaltan el carácter cosmopolita de *T. gondii* (Goater et al., 2014).

El ciclo de vida de *T. gondii* es un aspecto clave para la comprensión de la biología del parásito y el impacto que tiene en salud pública. Tiene como hospederos definitivos a especies de la familia Felidae, tanto domésticos como de fauna silvestre, los cuales post infección liberan ooquistes al ambiente a través de las heces. Posterior a la ingesta de los ooquistes esporulados en el ambiente, en el nuevo hospedero se desarrollará la fase de taquizoito (fase aguda), la cual es de rápida y agresiva replicación dentro de vacuolas de células nucleadas. Como parte de la respuesta del hospedero continúa una fase de contención denominada bradizoito (fase crónica), el cual estará dentro de quistes distribuidos en todo el cuerpo. Los quistes pueden persistir por meses o años luego de la infección siendo una fuente importante para la continuidad del ciclo del parásito en hospederos definitivos e intermediarios (Fig. 1) (Roberts & Janovy, 2009; Schlüter et al., 2014).

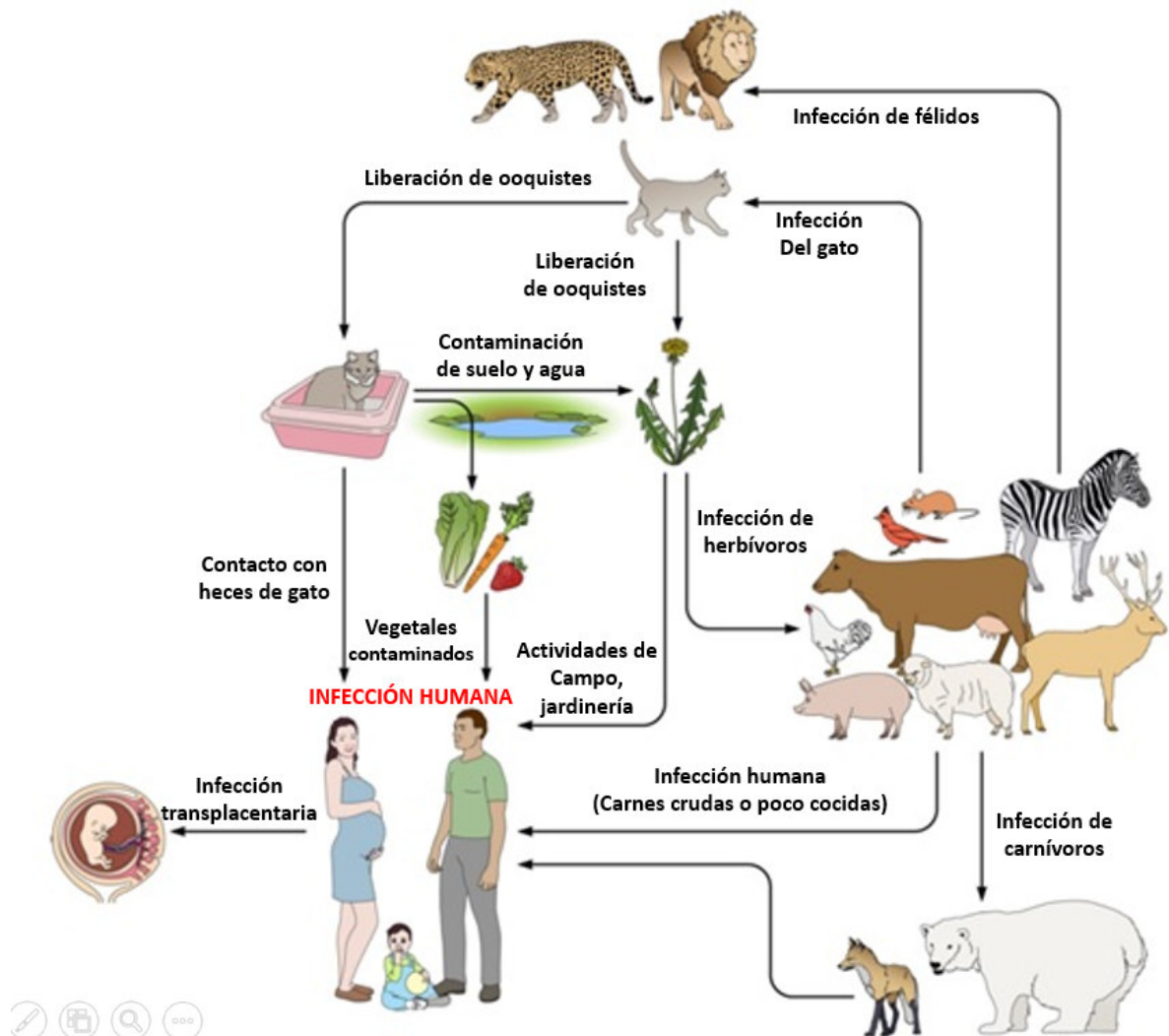


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.

Tomado y modificado de: Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 264-296.

2.2. Toxoplasmosis en humanos

La toxoplasmosis es una zoonosis de amplia distribución mundial, aunque se reporta una mayor incidencia en áreas tropicales, la misma que disminuye conforme aumenta la latitud (Fig. 2) (Petersen, 2007b). Actualmente es catalogada como una enfermedad tropical desatendida y marginalizada (Hotez, 2013; WHO, 2012).

Frecuentemente la infección en humanos se da por dos vías: adquirida y congénita. La vía adquirida se produce mediante la ingesta accidental de ooquistes presentes en el ambiente (agua, suelo, vegetales y frutas); o por la ingesta de carnes poco cocidas de animales infectados. Actualmente la toxoplasmosis se considera dentro del grupo de enfermedades transmitidas por alimentos, siendo éste un aspecto clave para el control y la prevención desde la crianza de animales hasta el ámbito doméstico. La vía congénita está asociada a la transmisión transplacentaria al feto cuando la madre se infecta durante el embarazo. Otra vía de transmisión ha sido reportadas tal como el trasplante de órganos (Kijlstra & Jongert, 2008; Sepúlveda-Arias et al., 2014; Weiss & Dubey, 2009).

Los cuadros clínicos asociados son diversos y se relacionan con el estado del hospedero, así como con las características del parásito tal como su virulencia.

En la mayoría de los individuos inmunocompetentes la infección primaria es asintomática, aunque algunos pueden presentar fiebre, linfadenopatía cervical, mialgia u otros signos inespecíficos que pueden confundirse con resfriados (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

Los mayores índices de morbilidad y mortalidad se registran en fetos o pacientes inmunosuprimidos, en los cuales se han descrito cuadros tales como la toxoplasmosis congénita y encefálica, respectivamente. La toxoplasmosis congénita se da cuando la

infección ocurre en la madre durante la gestación y conlleva a una transmisión vertical, la misma que puede o no conllevar a manifestaciones clínicas en el neonato o durante su desarrollo; entre ellas se incluyen compromisos a nivel de sistema nervioso, ocular, oído y sistémico (Rorman et al., 2006). Por su parte, la toxoplasmosis cerebral resulta de la reactivación de una infección latente producto del declinamiento en la inmunidad celular en pacientes con drogas inmunosupresoras o con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), siendo así una de las principales causa de muerte en este grupo humano (Ferreira et al., 2008).

2.3. Epidemiología

Con base en estudios seroepidemiológicos se estima que un tercio de la población mundial ha estado expuesta al parásito. Los datos sugieren que existe una gran variación entre áreas geográficas, condiciones ambientales, prácticas culturales, grupos étnicos, y otros factores asociados al parásito tales como su genotipo (Sepúlveda-Arias et al., 2014; Tenter et al., 2000).

Se ha observado una baja seroprevalencia en Norteamérica, Sudeste asiático, Norte Europeo y países de la franja Sahariana de África (10 a 30%). En países de Europa central y Europa del sur hay una seroprevalencia moderada (30 a 50%); mientras que una alta seroprevalencia ha sido encontrada en países de América Latina y África (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

En América del Sur es común la infección por *T. gondii*; numerosos estudios demuestran una correlación entre alta prevalencia y prácticas sanitarias deficientes en poblaciones nativas americanas, pues tienen un acceso limitado a servicios de saneamiento (Pappas et al., 2009). A lo anterior se suma la diversidad genética del parásito en esta región, la cual está asociada a su virulencia y a los cuadros clínicos. Los estudios realizados en Brasil y Colombia reportan la existencia de cepas con genotipos atípicos o recombinantes, los cuales se asocian a casos de toxoplasmosis ocular (Cañón-Franco et al., 2014; Petersen, 2007).

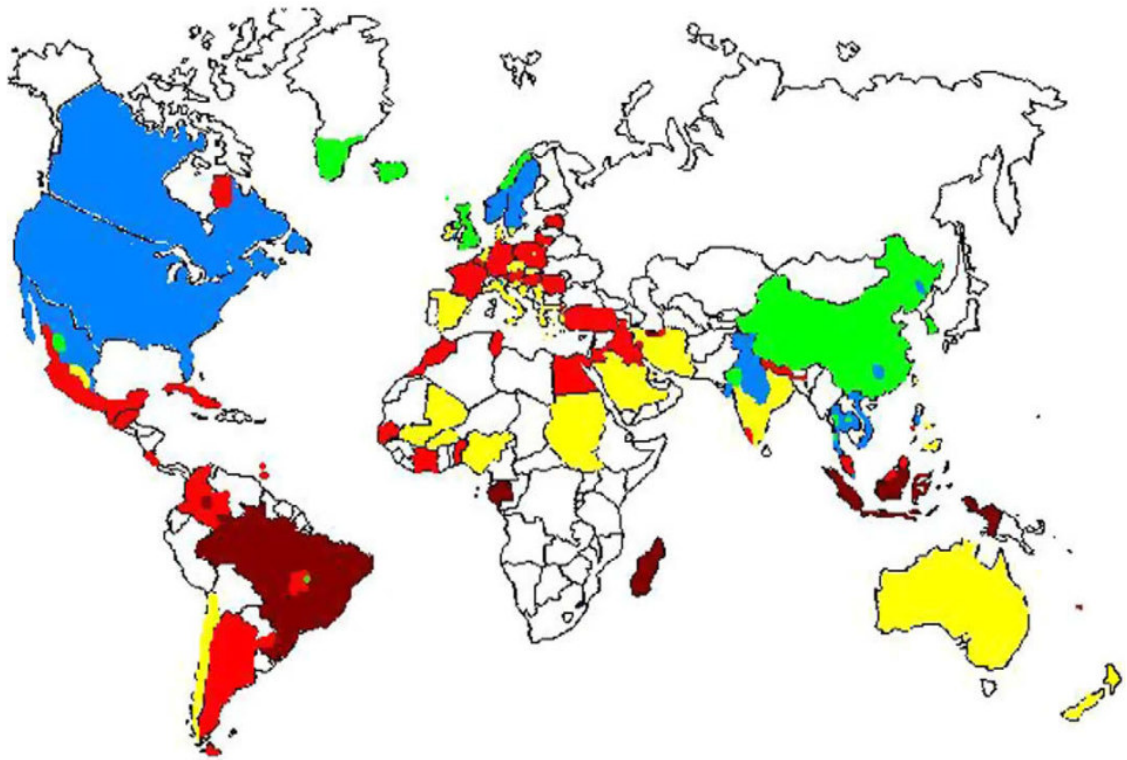


Figura 2. Estado global de la infección por *Toxoplasma gondii*.

Las zonas marrones indican una seroprevalencia sobre el 60%, las rojas entre 40 y 60%, las amarillas entre 20 y 40%, las azules entre 10 y 20% y las verdes menor al 10%. Los países en blanco representan ausencia de datos.

Fuente: Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385-1394.

2.4. Métodos diagnósticos

El diagnóstico de la infección por *Toxoplasma gondii* se basa en el uso de técnicas biológicas, serológicas, moleculares e histopatológicas de manera independiente o en conjunto (Dubey 2010); para ello, se parte de muestras biológicas de diferente naturaleza (sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico o tejidos), las cuales se seleccionan dependiendo de los antecedentes clínicos y los objetivos del protocolo (Xicoténcatl, 2010).

Las pruebas diagnósticas pueden ser divididas en dos grupos: indirectas y directas. Las primeras abarcan la detección de anticuerpos específicos contra el parásito en muestras de suero o plasma (pruebas de aglutinación, Inmunofluorescencia, ELISA, Western Blot), mientras que las segundas demuestran la presencia del parásito en una muestra determinada (aislamiento, histopatología, biología molecular) (Rico-Torres, 2005).

2.4.1. Aislamiento

El aislamiento directo de *T. gondii* a partir de muestras de sangre o fluidos es un indicativo de una fase aguda de la infección. Para tal fin se pueden emplear técnicas *in vivo* como inoculación en ratones, o *in vitro* haciendo uso de cultivos celulares (Montoya, 2002). Su uso se remonta a la década de los 80's cuando se inoculaban ratones con líquido amniótico para diagnóstico de infección fetal, cuando había sospecha e infección materna; actualmente se hace principalmente de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

2.4.2. Serología

Estas técnicas se basan en la detección de anticuerpos específicos anti *T. gondii*. Su uso se ha extendido a estudios epidemiológicos, pero se usa para manejo, desprendiéndose de este último una serie de indicadores que facilitan la intervención y tratamiento especialmente en toxoplasmosis congénita.

Desde que en 1942 Warren y Sabin desarrollaron la primera prueba de fijación del complemento (Complement Fixation Assay, CFA), le siguieron otras técnicas como el ensayo del colorante (“Dye Test” o de “Sabin & Feldman”), la hemaglutinación indirecta, la Aglutinación Modificada (MAT), la Aglutinación en Látex, la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), el ELISA y el Western Blot. Estas dos últimas se han adaptado para realizar los ensayos de avidéz que permiten sospechar la fase de la infección. Cabe resaltar que el éxito de un ensayo depende de los parámetros diagnósticos que éste presente, por lo que se recomienda seguir un adecuado constructo diagnóstico a fin de recoger la mayor cantidad de evidencia posible (Dubey 2004; Montoya 2002; Remington et al., 2004).

2.4.3. Histopatología

Es posible aplicar protocolos anatomopatológicos como cortes histológicos procedentes de biopsias o tejidos procedentes de necropsias, en los cuales puedan observarse estructuras propias de *T. gondii* tales como taquizoitos o quistes tisulares que indicarían estadíos agudo y crónico, respectivamente. El uso de la técnica de Inmunohistoquímica permite confirmar el diagnóstico histopatológico e identificar estadios infecciosos; esta técnica ha sido muy útil para demostrar la presencia del parásito en el sistema nervioso central de pacientes con SIDA y en animales domésticos y silvestres (Cedillo-Peláez, 2009; Montoya, 2002).

2.4.4. *Biología molecular*

La técnica más usada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La detección del DNA del parásito en fluidos corporales y tejidos por PCR es efectiva para diagnosticar la toxoplasmosis congénita, ocular y cerebral (Weiss & Kim, 2007). La ventaja de esta técnica es su alta sensibilidad, especificidad y relativa rapidez. Sin embargo, el valor predictivo de la prueba es bajo, dado que el parásito se distribuye en los tejidos y se encuentra en circulación con baja frecuencia; sin embargo, una PCR positiva es altamente confiable y actualmente permite medir la carga parasitaria, si se usa la variante de PCR en tiempo real (Dubey 2010; Sterkers et al. 2010).

2.5. La toxoplasmosis en el Perú

2.5.1. Toxoplasmosis en animales

Para nuestro país son más numerosos los estudios publicados respecto a la infección por *T. gondii* en animales que en humanos; pudiendo servir estos índices como indicativos de la presencia y el potencial riesgo zoonótico en las regiones evaluadas (Cuadro 1).

Uno de los primeros trabajos realizados en animales en el Perú, y el primero en ganado ovino, fue el realizado por Contreras y Tejada (1974) quienes evaluaron mediante la reacción de hemaglutinación (RHA) 250 ovejas procedentes de Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Ica, Lima y Puno. Este estudio reportó una seroprevalencia del 83.2%; lo cual además de evidenciar la presencia del parásito en estas zonas, indica un alto índice de infección para la época.

Suárez-Aranda et al. (2000) hicieron una evaluación serológica en cerdos de Lima (Perú) y Sao Paulo (Brasil) mediante la técnica de ELISA y Western Blot, obteniendo una prevalencia del 32.3% y 9.6% para Perú y Brasil, respectivamente. Otro estudio realizado por Saavedra & Ortega (2004) en cerdos de Lima (Perú) y Georgia (Estados Unidos) usando la técnica de Western Blot reporta una prevalencia de 27.7% para cerdos de Perú y 16.4% para cerdos de Estados Unidos. Estos resultados ponen en evidencia el riesgo que existe en la infección transmitida por el consumo de carnes de cerdo poco cocidas en Lima y otras partes del mundo.

Dubey et al. (2004) realizaron un estudio en pollos de traspatio provenientes del distrito de San Juan de Miraflores, Perú, mediante la técnica de aglutinación modificada (MAT) y

posterior caracterización molecular, y encontraron que el 28% presentaba anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* (Dubey et al., 2004).

Otros estudios han sido desarrollados en camélidos sudamericanos de zonas alto andinas. Suárez et al. (2004) evaluaron la prevalencia de la toxoplasmosis en alpacas del sur del Perú mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI); la positividad alcanzó 34.5%. Además, se observó una mayor frecuencia en hembras y en animales de mayor edad. Saravia et al. (2004) determinó la seroprevalencia de *T. gondii* en llamas hembras adultas de dos unidades de producción ubicadas en Puno, mediante la prueba de IFI hallaron que el 10.2% presentaban anticuerpos para el parásito. Por otro lado, Ramírez et al. (2005) estudiaron la presencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en alpacas de una comunidad de Cuzco mediante la técnica de IFI, encontraron una seroprevalencia del 35.7%. Finalmente, Chang et al. (2009) reportaron una seropositividad del 13.7% mediante IFI en llamas hembras de la sierra central del Perú.

La presencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* también ha sido evaluada en vicuñas, producto de lo cual se reportó una seroprevalencia del 14.9% en vicuñas de Puno (Pastor et al., 2003) y un 5.8% en vicuñas de la Reserva Nacional de Pampa Galeras, Ayacucho (Zuzunaga et al., 2006).

Estos estudios en los andes peruanos ponen en evidencia la exposición de estos animales al parásito posiblemente por la contaminación de ambientes de pastoreo con ooquistes liberados por felinos domésticos o silvestres; además el impacto que podría generar en la economía de las localidades debido a la mortalidad y la posible infección del hombre por el consumo de estas carnes como parte de su dieta (Chang et al., 2009; et al., 2004).

En cuanto al hospedero definitivo en ambientes urbanos, Castillo et al. (2012) estudiaron los tipos de crianza de gatos de Lima y el riesgo que supone para la infección con *T. gondii*;

para ello realizaron una evaluación serológica por hemaglutinación indirecta (HAI) acompañada de una encuesta a los dueños. Como resultado obtuvieron que el 19% tenía anticuerpos anti *T. gondii*, aunque no hubo asociación entre el tipo de crianza y la infección. Cerro et al. (2009) determinaron la frecuencia de anticuerpos anti *T. gondii* en gatos de Lima Metropolitana mediante IFI y HAI, con lo cual reportaron una frecuencia de 17.9% (IFI) y 11.2 % (HAI). Otro estudio realizado por Cerro et al. (2014) reportó una seropositividad del 11% usando hemaglutinación indirecta (HAI) y ausencia de ooquistes en heces luego de realizar un análisis coproparasitológico. La relevancia de estos estudios se basa en el hecho de que los gatos representan un foco de contaminación de ambientes urbanos, el mismo que se ve reforzado por algunas prácticas de crianza de los dueños como alimentarlos con carnes crudas o poco cocidas incrementando así la posibilidad de infección (Castillo et al., 2012; Cerro et al., 2014; Cerro et al.,2009).

La infección por *T. gondii* también ha sido estudiada en animales silvestres de la selva peruana. Un estudio realizado en monos en cautiverio (*Cebus apella*) reportó una frecuencia de reactividad del 90.3% para la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) (Muñoz et al., 2005). Romero et al. (2010) encontró una frecuencia del 89.1% de anticuerpos para *T. gondii* en sajinos (*Tayassu pecari*) de Madre de Dios. Otro estudio evaluó esta parasitosis en un grupo de manatíes amazónicos (*Trichechus inunguis*) mediante la prueba de aglutinación modificada (MAT), con lo cual se detectó la infección en un 63.2% de los animales evaluados (Delgado et al., 2013).

Cuadro 1. Frecuencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en animales domésticos y silvestres del Perú (2000 – 2014)

Grupo animal	Región	Técnica ¹	n ²	Frecuencia	Referencia
Ovejas	Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Ica, Lima y Puno	HAI	250	83.2 %	Contreras & Tejada, 1974
Cerdos	Lima	ELISA	96	32.3 %	Suárez-Aranda et al., 2000
Cerdos	Lima	Western Blot	137	27.7 %	Saavedra & Ortega, 2004
Pollos	Lima	MAT	50	26 %	Dubey et al., 2004
Alpacas	Cusco	IFI	278	34.5 %	Suárez et al., 2004
Alpacas	Cusco	IFI	272	35.7 %	Ramírez et al., 2005
Llamas	Puno	IFI	157	10.2 %	Saravia et al., 2004
Llamas	Junín	IFI	249	13.7 %	Chang et al., 2009
Vicuñas	Puno	HAI	101	14.9 %	Pastor et al., 2003
Vicuñas	Ayacucho	IFI	191	5.8 %	Zuzunaga et al., 2006
Gatos	Lima	HAI	106	19 %	Castillo et al., 2012

1 Técnica: ELISA, ensayo inmunoenzimático; MAT, aglutinación modificada; IFI, Inmunofluorescencia indirecta; HAI, hemaglutinación indirecta.

2 n: número de muestras evaluadas

Cuadro 1. Continuación

Grupo animal	Región	Técnica¹	n²	Frecuencia	Referencia
Gatos	Lima	IFI	178	17.9 %	Cerro et al., 2009
Gatos	Lima	HAI	154	11 %	Cerro et al., 2014
Monos	Lima	HAI	62	90.3 %	Muñoz et al., 2005
Sajinos	Madre de Dios	MAT	101	89.1 %	Romero et al., 2010
Manatíes	Loreto	MAT	19	63.2 %	Delgado et al., 2013

1 Técnica: ELISA, ensayo inmunoenzimático; MAT, aglutinación modificada; IFI, Inmunofluorescencia indirecta; HAI, hemaglutinación indirecta.

2 n: número de muestras evaluadas

2.5.2. *Toxoplasmosis en humanos*

Para el Perú, son pocos los estudios realizados y publicados en torno a la toxoplasmosis humana (Cuadro 2 y 3).

El primer registro clínico de la infección por *T. gondii* para nuestro país fue reportado por Pinkerton et al. en 1940, en un peruano de 22 años que además presentaba Bartonelosis (Cornejo et al., 1971; Náquira et al., 1972). En 1967 se ejecutó una de las primeras investigaciones epidemiológicas en cuatro centros poblados pertenecientes a los departamentos de Huánuco, Loreto, Moquegua y Puno, en los cuales se hallaron frecuencias de infección del 75%, 43%, 17% y 23%, respectivamente (Náquira et al., 1972).

Dos investigaciones de la década del 70 registran el uso de la Reacción de Fijación del Complemento (R.F.C) y Reacción de Hemaglutinación (R.H.A.) como pruebas diagnósticas referenciales.

Cornejo et al. (1971) realizaron una evaluación serológica en 32 pacientes que asistieron a los servicios de medicina, oftalmología y obstetricia del Hospital Obrero de Lima, haciendo uso de la reacción de fijación del complemento y la reacción de hemaglutinación. Como resultado obtuvieron que el 45.87% presentaba serología positiva a *T. gondii* y una asociación con manifestaciones oculares y episodios de aborto.

Náquira et al. (1972) estudiaron 312 sueros humanos provenientes de los departamentos de San Martín, Huánuco, Junín y Lima, mediante la reacción de hemaglutinación. Se determinó una seroprevalencia del 34.3% y una mayor positividad en poblaciones de ciudades de selva y costa a comparación de la sierra.

Morales et al. (1979) determinaron la prevalencia de infección por *T. gondii* en niñas escolares de Ancash, mediante la prueba de intradermorreacción con toxoplasmina. Como resultado reportaron una seroprevalencia del 12.3%.

Otro estudio en las tres regiones del Perú fue realizado por Calderón et al. (1992) quienes evaluaron la presencia de anticuerpos IgG anti *T. gondii* en 308 sueros procedentes de Lima, Junín y San Martín; para lo cual emplearon las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), ELISA y Electro Inmuno Trans Blotting (EITB). Como resultado obtuvieron los siguientes índices de seropositividad: Por IFI 52% (Costa), 27% (Sierra) y 58% (Selva); por ELISA 50% (Costa), 31% (Sierra) y 57% (Selva), y por EITB 40% (Costa), 23% (Sierra) y 52% (Selva). Además, resaltaron la ventaja del ELISA y EITB por sus altos valores de sensibilidad y especificidad; y la mayor prevalencia en la región selva, seguida de la costa y en menor grado la sierra.

Tori (1998) reportó el caso clínico de una niña de 6 años que presentaba fiebre alta, dolor abdominal, adenopatías cervicales dolorosas, presencia de exudado amigdalino severo y presencia de anticuerpos IgM anti *Toxoplasma gondii*. En este estudio se reportó la asociación entre toxoplasmosis y adenopatías de diferente localización.

Maguiña et al. (1998) realizaron un estudio prospectivo en el cual evaluaron a 80 pacientes en fase aguda anemizante de Bartonelosis en el Hospital Nacional Cayetano Heredia (Lima), encontrando que un 36.7% (25/68) presentó complicaciones infecciosas diferentes a la Enfermedad de Carrión, en un 20% (5/25) de los cuales se hallaron episodios de toxoplasmosis reactivada.

Un estudio retrospectivo fue desarrollado por García et al. (2002), quienes evaluaron fichas clínicas de 1 306 pacientes que asistieron al servicio de úvea del Instituto Nacional de

Oftalmología (Lima). Como resultado hallaron un 88.7% de frecuencia de infección *Toxoplasma gondii* en pacientes con uveítis.

Cáceda et al. (2000) ejecutaron un estudio retrospectivo con pacientes en estadio SIDA en el Hospital Nacional Cayetano Heredia (Lima) con diagnóstico de toxoplasmosis cerebral. Luego de analizar las características epidemiológicas, clínicas, tomográficas, serológicas y evolución clínica, se reportaron 65 casos en los cuales los hallazgos clínicos más frecuentes fueron lesiones cerebrales, hemiparesia, compromiso sensorio y convulsiones; siendo la toxoplasmosis cerebral la primera causa de muerte (57%) en esta población.

Eza et al. (2006) reportaron los resultados de un análisis retrospectivo realizado a 16 cadáveres de pacientes VIH en estadio SIDA en el Hospital Nacional Dos de Mayo (Lima) cuyo objetivo fue el de determinar infecciones oportunistas causantes de mortalidad. Posterior a la revisión de antecedentes clínico-epidemiológicos y evaluación histopatológica se determinó que el 68.8% (11/16) falleció a causa de infecciones oportunistas dentro de las cuales el 18.2% (2/11) se asoció a toxoplasmosis con compromiso del Sistema Nervioso Central.

Un caso excepcional fue reportado por Nunura & col (2010) en el cual se describe la ocurrencia de un marino destacado a la Amazonía peruana hospitalizado en Iquitos a causa de dolor en el lado derecho de la cadera y cojera. Análisis preliminares evidenciaron neumonía y hepatitis; además retinocoroiditis, títulos positivos de IgG e IgM para *Toxoplasma gondii*, presencia de taquizoitos de *T. gondii* en frotis de gota gruesa y presencia de bradizoitos de *T. gondii* en una biopsia de la cadera derecha. Este cuadro clínico de toxoplasmosis se asocia a los factores de riesgo al cual estuvo expuesto el

paciente, tales como consumo de carnes de animales de fauna silvestre y consumo de agua proveniente de arroyos.

Una aproximación a la relación entre toxoplasmosis y enfermedades mentales fue abordada por Marocho & col. (2012) quienes evaluaron la presencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en 114 pacientes del Hospital Hermilio Valdizán, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas y Hospital Nacional Dos de Mayo, cuyo diagnóstico previo fue de esquizofrenia y otras enfermedades mentales. Posterior a la evaluación serológica por el método de ELISA se demostró una reactividad positiva en el 69% (20) de pacientes esquizofrénicos, con lo cual establecen una asociación estadística entre la seropositividad a *T. gondii* y el diagnóstico de esquizofrenia en el grupo estudiado.

En relación a la Toxoplasmosis congénita son más escasos los estudios publicados en nuestro país, lo cual es un limitante para establecer planes de control y prevención.

Cubillas et al., (2000) evaluó a 122 gestantes del Hospital Nacional Cayetano Heredia (Lima), para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM anti *Toxoplasma gondii* mediante la prueba de IFI. La seroprevalencia obtenida fue del 54,9% y 4,9% para IgG e IgM, respectivamente.

Reátegui & Vela (2011) determinaron la relación entre factores económicos y la seroprevalencia de la toxoplasmosis en mujeres gestantes que asistían a sus controles en dos hospitales de la región Loreto; para lo cual incluyeron a 355 gestantes y aplicaron una entrevista, visita domiciliaria y análisis de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* haciendo uso de un estuche comercial de ELISA. Como resultado reportaron una prevalencia del 94.5% en el Hospital Regional y un 86.8% en el Hospital de Iquitos; además de hallar una

relación significativa entre hábitos alimenticios como la ingesta de vegetales sin lavar y la presencia de mascotas con seropositividad.

Lacunza & Boza (2012) presentaron un caso clínico en el que se comunica un signo ecográfico poco frecuente de la toxoplasmosis congénita en una mujer de 27 años que ingresó a la unidad de embarazo patológico del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (Callao) con 34 semanas de embarazo y amenaza de parto pre término. A partir de una ecografía se evidencia hidropesía fetal con ascitis, edema subcutáneo y otros hallazgos clínicos los cuales conllevaron a terminar la gestación por cesárea de emergencia. El examen clínico del neonato evidenció hepatoesplenomegalia y coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*; la prueba TORCH aplicada tanto la madre como al neonato dio positiva la IgM para Toxoplasmosis e intermedia para Citomegalovirus, mientras que la madre sólo presentó seropositividad a IgM para *T. gondii*.

Finalmente, Salmavides et al. (2014) comunicaron tres casos clínicos de neonatos con toxoplasmosis congénita atendidos en el Hospital Nacional Cayetano Heredia (Lima). Aunque el compromiso neurológico, basado en análisis clínicos-radiológicos, fue diferente en los tres casos, hubo presencia de seropositividad a IgM anti *Toxoplasma gondii*, hepatomegalia, compromiso ocular y disfunciones motoras; sólo un caso mostró presencia de taquizoitos de *T. gondii* posterior al análisis microscópico del líquido cefalorraquídeo. En los tres casos los neonatos fueron medicados y en su evolución se observó sordera, pérdida de agudeza visual y retardo en el desarrollo, por lo que tuvieron que recibir terapia física.

Por lo anteriormente expuesto, puede afirmarse que existe evidencia de que en nuestro país la toxoplasmosis, tanto en animales como en seres humanos, se encuentra ampliamente distribuida a nivel nacional; pero los pocos estudios epidemiológicos

realizados no han evaluado sus técnicas diagnósticas, limitando así una mejor aproximación a la situación real de la infección por *Toxoplasma gondii* en nuestro país. Por lo anterior, es necesario realizar estudios que aporten al conocimiento de esta zoonosis con datos actualizados y de mayor abarcamiento geográfico.

Cuadro 2. Frecuencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en población peruana (1967 – 2011)

Grupo humano	Año	Región	Técnica ¹	n ²	Frecuencia	Referencia
Población general	1967	Huánuco	HAI	-	75 %	Náquira et al., 1972
		Loreto			43 %	
		Moquegua			17 %	
		Puno			23 %	
Población general	1971	Lima	RFC, HAI	32	45.87 %	Cornejo et al., 1971
Población general	1972	San Martín	HAI	312	19.4 %	Náquira et al., 1972
		Huánuco			34.4 %	
		Junín			12.5 %	
		Lima			44 %	
Escolares	1979	Ancash	Intradermo-reacción	300	12.3 %	Morales et al., 1979
Población general	1992	Lima	ELISA, WB e IFI	308	50 %	Calderón et al., 1992
		Junín			31 %	
		San Martín			57 %	
Mujeres gestantes	2000	Lima	IFI	122	54.9% (IgG), 4.9% (IgM)	Cubillas et al., 2000
Pacientes con esquizofrenia	2012	Lima	ELISA	114	69 %	Marocho et al., 2012
Mujeres gestantes	2011	Loreto	ELISA	124	94.5 %	Reátegui & Vela, 2011
				231	86.8%	

1 Técnica: RFC, reacción de fijación del complemento; ELISA, ensayo inmunoenzimático; MAT, aglutinación modificada; IFI, Inmunofluorescencia indirecta; HAI, hemaglutinación indirecta; WB: Western blot

2 n: tamaño muestral

Cuadro 3. Otros estudios de la infección humana por *Toxoplasma gondii* en el Perú (1985 – 2014)

Grupo / Reporte de caso	Año	Región	Pruebas diagnósticas¹	n²	Hallazgo	Referencia
Pacientes con uveítis	1985 - 1999	Lima	Clínica, histopatología	1306	Toxoplasmosis ocular	García et al., 2002
Reporte de caso	1998	Lima	ELISA	1	Toxoplasmosis asociada a adenopatías	Tori. 1998
Pacientes con Bartonelosis	1998	Lima	ELISA, IFI	80	Toxoplasmosis reactivada	Maguiña et al., 1998
Pacientes SIDA con Toxoplasmosis cerebral	2000	Lima	Clínica, tomografías, WB	65	Toxoplasmosis cerebral como primera causa de muerte	Cáceda et al., 2000
Cadáveres de pacientes con SIDA	2006	Lima	Clínica, histopatología	16	Toxoplasmosis asociada a SNC	Eza et al., 2006
Reporte de caso	2010	Loreto	Clínica, ELISA	1	Toxoplasmosis aguda en paciente inmunocompetente	Nunura et al., 2010
Reporte de caso	2012	Callao	Ecografía, perfil TORCH	1	Hidropesía fetal como signo ecográfico de toxoplasmosis congénita	Lacunza & Boza, 2012
Reporte de caso	2014	Lima	Clínica, ELISA	3	Compromiso neurológico por toxoplasmosis congénita	Salmavides et al., 2014

1 Pruebas: ELISA, ensayo inmunoenzimático; IFI, Inmunofluorescencia indirecta; WB: Western Blot; TORCH, toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus, herpes simple.

2 n: tamaño muestral

2.6. Validación de pruebas diagnósticas

Las pruebas diagnósticas se definen como herramientas que en la práctica médica permiten diferenciar entre estados (salud – enfermedad) o discernir entre categorías de las mismas (Xicoténcatl, 2010). Además, según el objetivo de su uso estas pueden tener un carácter diagnóstico o de tamiz si es que se busca detectar una enfermedad o si se busca individuos que aún no presentan sintomatología, respectivamente (Ortíz-Alegría, 2004).

Como parte de la vigilancia de enfermedades y el diagnóstico clínico es necesario el manejo de resultados validados los cuales pueden ser obtenidos a partir de ensayos validados como parte de un sistema de gestión de calidad y que conlleven a la obtención de un diagnóstico con certeza conocida (Conraths & Schares, 2006). El acceso limitado a pruebas diagnósticas de calidad, conduce al manejo inadecuado de programas de salud en espacios donde las enfermedades infecciosas son las mayores causas de muerte (Peeling et al., 2010).

La evaluación de métodos se da mediante estudios de desempeño en los cuales los resultados son comparados con un método referencial indicando un objetivo deseado en una población determinada. La bondad diagnóstica de cualquier prueba se mide con los parámetros: sensibilidad, especificidad, valores predictivos, entre otros (Bruehl et al., 2006).

La sensibilidad diagnóstica de una prueba se define como la proporción de individuos infectados que dan un resultado positivo a la prueba; mientras que la especificidad diagnóstica se refiere a la proporción de individuos no infectados que dan resultado negativo. Por otra parte, el valor predictivo positivo se refiere a la proporción de sujetos verdaderamente infectado del total que dio un resultado positivo en la prueba, mientras que

el valor predictivo negativo se refiere a la proporción de sujetos no infectados del total que no reaccionó en la prueba. Aunque los valores predictivos interesan en la práctica clínica, no son útiles al momento de comparar entre dos pruebas diagnósticas ya que se ven afectados por la prevalencia de la infección; ante ello se determinan los cocientes de probabilidad (o de verosimilitud), los cuales ya no dependen de la cantidad de individuos positivos, sino tan solo de la sensibilidad y especificidad. En términos prácticos, considerando una prueba diagnóstica A y otra B, un mayor cociente de probabilidad positivo en A indicaría una mejor capacidad para diagnosticar la presencia de infección respecto a B; mientras que un menor cociente de probabilidad negativo A indicaría una mejor capacidad para diagnosticar la ausencia de infección respecto a B (Jacobson, 1998; Gambino, 2012).

Para el cálculo de los parámetros diagnósticos, es necesario contar con una prueba referencial que permita distinguir entre individuos infectados y no infectados. Dichos resultados son sometidos a contraste con los obtenidos por la prueba a evaluar, para lo cual se construye una tabla de contingencia (Fig. 3).

		Presencia de infección	
		Sí	No
Resultado de la prueba a evaluar	Positiva	A	B
	Negativa	C	D

Figura. 3. Tabla de contingencia

Con base en los datos obtenidos y ordenados en la tabla de contingencia, es posible hacer la determinación de los parámetros diagnósticos señalados anteriormente, aplicando las siguientes fórmulas (Conraths y Schares, 2006; Greiner y Gardner, 2000):

$$\text{Sensibilidad diagn\u00f3stica (SD)} = \frac{A}{A + C}$$

$$\text{Especificidad diagn\u00f3stica (ED)} = \frac{D}{B + D}$$

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)} = \frac{A}{A + B}$$

$$\text{Valor predictivo negativo (VPN)} = \frac{D}{C + D}$$

$$\text{Cociente de probabilidad positivo (CPP)} = \frac{SD}{1 - ED}$$

$$\text{Cociente de probabilidad positivo (CPP)} = \frac{SD}{1 - ED}$$

Donde:

A: verdaderos positivos

B: falsos positivos

C: falsos negativos

D: verdaderos negativos

Otro par\u00e1metro que es necesario determinar cu\u00e1ndo se trabaja en una prueba diagn\u00f3stica que involucra variables num\u00e9ricas continuas, como las absorbancias en el ELISA, es el punto de corte. Este se entiende como aquel valor que permite clasificar la muestra entre casos y no casos (Greiner y Gardner, 2000). Una herramienta estad\u00edstica que permite determinar el punto de corte es la curva ROC (del ingl\u00e9s *Receiver-Operator Characteristic*)

es una representación gráfica que contrasta la sensibilidad (eje Y) con la especificidad (expresada como 1-especificidad, para tener una curva positiva), obtenidas para varios puntos de corte (Fig.4). Gráficamente, el punto de corte que otorga una mayor sensibilidad y especificidad, es aquel que se ubica en el punto más cercano al ángulo superior izquierdo del gráfico (Cerde y Cifuentes, 2012).

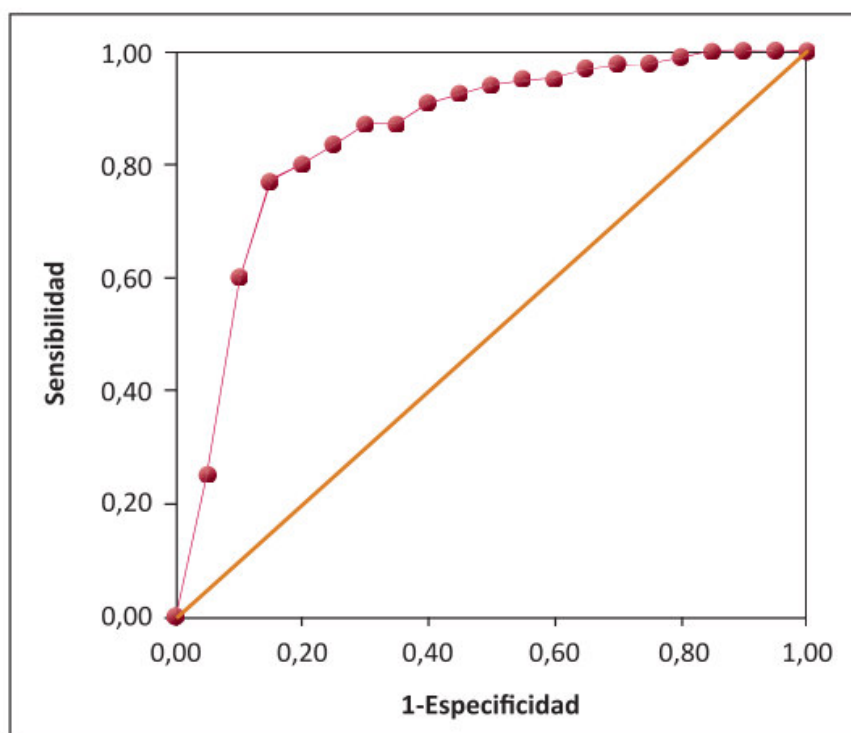


Figura 4. Curva ROC

Fuente: *Rev Chil Infect* 2012; 29(2): 138-141

III. HIPÓTESIS

El ELISA es un ensayo altamente sensible y específico capaz de detectar anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en muestras de población peruana.

IV. OBJETIVOS

General:

- Estandarizar y evaluar un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en población peruana.

Específicos:

- Estandarizar un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii*.
- Determinar el grado de correlación entre el ELISA estandarizado y otro estuche de ELISA referencial.
- Evaluar los parámetros diagnósticos del ELISA estandarizado.
- Determinar la frecuencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en muestras séricas humanas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Consideraciones generales

a) Tipo de estudio

Validación de una prueba diagnóstica

b) Lugar de ejecución

El presente estudio se ejecutó en el Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre y Zoonosis de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicada en el distrito de Lima, provincia de Lima, departamento de Lima.

c) Sujetos de estudio

Se muestrearon a voluntarios peruanos, mayores de edad, de ambos sexos, procedentes de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima), la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima), y el Hogar Clínica San Juan de Dios (Cusco). La toma de muestra fue posterior a la firma de un consentimiento informado.

Además, se tuvo acceso a muestras de la seroteca del Laboratorio de Neurocisticercosis del Hospital Nacional de Ciencias Neurológicas (Lima).

d) Aprobación ética:

El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Código de proyecto 0291.

e) **Tamaño muestral**

El tamaño de la muestra fue obtenido de acuerdo a lo propuesto por Jacobson (1998) y Flahault (2005) para la evaluación y validación de pruebas diagnósticas:

- *Número de casos* (Jacobson, 1998)

$$N_{casos} = \frac{(SnD) (1 - SnD) (c)^2}{e^2}$$

Considerando una sensibilidad diagnóstica (SnD) del 97% (Caballero-Ortega et al., 2014), error (e) del 5% y un intervalo de confianza (c) del 95% ($\alpha=1.96$), resultó un total de 45 sueros positivos.

- *Número de controles* (Flahault et al., 2005)

$$N_{controles} = N_{casos} [(1 - Prev)/Prev]$$

Considerando 45 casos y una prevalencia del 31% para el Perú (Calderón et al., 1992). Con lo cual se obtuvo un total de 100 sueros negativos.

f) **Procesamiento de las muestras**

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa en el antebrazo haciendo uso de un sistema de extracción al vacío y agujas estériles, las mismas que fueron codificadas y seguidamente centrifugadas a 2 300 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se separaron los sueros en microtubos de 1.5 ml para ser almacenados a -20°, hasta su uso.

6.2. Métodos

a) Transferencia tecnológica

Como parte de un proceso de transferencia tecnológica, se evaluó el desempeño operativo de un estuche de ELISA desarrollado y validado en el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría de México (LIE-INP), México D.F. Ello consistió en la evaluación de 20 sueros mexicanos por un técnico peruano y otro mexicano para determinar el grado de correlación entre las pruebas.

b) Obtención del antígeno

Para el desarrollo de la técnica de ELISA, se preparó un antígeno a partir de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* cepa RH. Se infectaron ratones BALB/C hembras de 4 semanas de edad por vía intraperitoneal con taquizoitos de *T. gondii* cepa RH y al cabo de 4 días se recuperó el exudado peritoneal en solución de PBS 0.01M pH 7.2. Se contaron los parásitos en una cámara de Neubauer y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendieron los parásitos colectados en PBS 0.01M pH 7.2 con PMSF (Fluoruro de fenil metil sulfonilo) (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración final de 10 mM. Se procedió a sonicar en frío con el Ultrasonic Liquid Processors XL 2000 (Misonix, USA) 4 veces a 10 000 Hz por periodos de un minuto con descansos intermedios de 3 minutos. El producto se centrifugó a 6000 rpm durante 1 hora, el sobrenadante se alicuotó y se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

c) Estandarización y optimización del ELISA

Se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno, suero y conjugado anti-IgG humana. Se emplearon placas de fondo plano para ELISA NuncMaxisorp (Thermo Scientific, USA). Se sensibilizaron las placas con 100 ul/pozo del antígeno a dos concentraciones (1 ug/mL y 2 ug/mL) en solución amortiguadora de carbonatos 0.015 M pH 9.6, y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se lavó 4 veces con 200 ul/pozo de PBS-Tween 20, 0.005% (PBS-T). Seguidamente se incubó con leche descremada al 5% en PBS-T durante 30 minutos a 37°C y se lavó con PBS-T para retirar el exceso de la solución de bloqueo. Se prepararon las diluciones de suero positivos y negativos a evaluar (1:500, 1:1000, 1:2000) en PBS-T y se colocaron por duplicado 100ul/pozo; se incubó a 37°C durante dos horas y se lavó con PBS-T. Luego de la incubación de los sueros, se prepararon diluciones de conjugado anti-IgG (Sigma, USA) (1:5 000, 1:10 000), a cada pozo se le añadieron 100ul, se incubó durante 2 horas a 37°C y se lavó con PBS-T. Para el revelado se emplearon 100 ul/pozo de la solución de cromógeno-sustrato que contiene 5 mL de ácido cítrico 0.1M, 5mL de citrato de sodio 0.1M, 4mg de O-fenilendiamina y 4 ul de peróxido de hidrógeno al 30%. Se incubó durante 5 minutos y se detuvo la reacción con 50ul/pozo de ácido sulfúrico 1 N. La absorbancia se registró a 492 nm haciendo uso de un lector de placas de ELISA Microplate reader ER500 (Sinnowa, China).

d) Evaluación de sueros mediante un kit de ELISA referencial

Todas las muestras de suero colectadas fueron sometidas a evaluación de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* mediante la técnica de ELISA desarrollada y validada por el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría de México, México D.F; siguiendo el protocolo establecido, y tomando como controles positivos y negativos a sueros mexicanos confirmados. Esta técnica presenta una sensibilidad diagnóstica del 98.4% y una especificidad diagnóstica del 65%.

e) Evaluación de sueros mediante la técnica de ELISA estandarizada

Se emplearon placas de fondo plano para ELISA NuncMaxisorp (Thermo Scientific, USA). Se sensibilizaron las placas con 100 ul/pozo del antígeno a una concentración de 2ug/mL en solución amortiguadora de carbonatos 0.015 M pH 9.6, y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se lavó por 4 veces con 200 ul/pozo de PBS-Tween 20, 0.005% (PBS-T). Seguidamente se incubó con leche descremada al 5% en PBS-T por 30 minutos a 37°C y se lavó con PBS-T para retirar el exceso de la solución de bloqueo. Se prepararon las diluciones de sueros problema a 1:500 en PBS-T y se colocaron 100ul/pozo por duplicado; se incubó a 37°C durante dos horas y se lavó con PBS-T. Luego de la incubación de los sueros, se preparó una dilución 1:5 000 de conjugado anti-IgG humana ligado a peroxidasa (Sigma, USA), se añadió 100ul/pozo, se incubó por 2 horas a 37°C y se lavó con PBS-T. Para el revelado se empleó 100 ul/pozo de la solución de cromógeno-sustrato que contenía 5 mL de ácido cítrico 0.1M, 5mL de citrato de sodio 0.1M, 4mg de O-fenilendiamina y 4 ul de peróxido de hidrógeno al 30%. Se incubó durante 5 minutos y se detuvo la reacción con 50ul/pozo de ácido sulfúrico 1 N. La absorbancia se registró a 492 nm haciendo uso de un lector de placas de ELISA Microplate reader ER500 (Sinnowa, China).

El punto de corte para cada placa se determinó como el promedio de las absorbancias de tres sueros negativos más tres desviaciones estándar. El índice de reactividad para cada muestra se obtuvo como el cociente de su absorbancia dividido entre el punto de corte (Caballero-Ortega, 2014).

f) Evaluación inter e intra ensayo

La evaluación inter ensayo consistió en la determinación de la correlación entre el registro de absorbancias de las muestras mediante la evaluación de los sueros peruanos usando el estuche de ELISA estandarizado en dos momentos diferentes.

La evaluación intra ensayo se realizó a partir de la correlación entre los registros de absorbancia obtenidos para cada muestra de suero evaluada por duplicado (pozo 1 y pozo 2) en una misma placa.

g) Análisis de datos

Las evaluaciones de correlación inter e intra ensayo se hicieron por medio de la prueba de Pearson; la distribución normal de los registros de absorbancia de los sueros negativos mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. La bondad diagnóstica del ELISA estandarizado se determinó por medio de la curva ROC. Para todo lo anterior se usaron los programas SPSS 20 y Excel 2013.

h) Determinación de la frecuencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*

Se determinó la frecuencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* con un intervalo de confianza del 95%. Se corrigió la frecuencia obtenida mediante la fórmula de Rogan-Gladen haciendo uso de los parámetros de sensibilidad (SD) y especificidad (ED) del ELISA estandarizado:

$$RG = \frac{AP + DSp - 1}{DSe + DSp - 1}$$

Dónde: AP = frecuencia aparente; DSp= sensibilidad diagnóstica y DSe= especificidad diagnóstica (Conraths y Schares, 2006).

VI. RESULTADOS

6.1. Transferencia tecnológica

Luego de la evaluación de las 20 muestras de sueros de pacientes mexicanos mediante el ELISA del LIE-INP por un técnico peruano y uno mexicano, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.829, lo cual representa una asociación significativa entre el desempeño operativo entre técnicos (Figura 5).

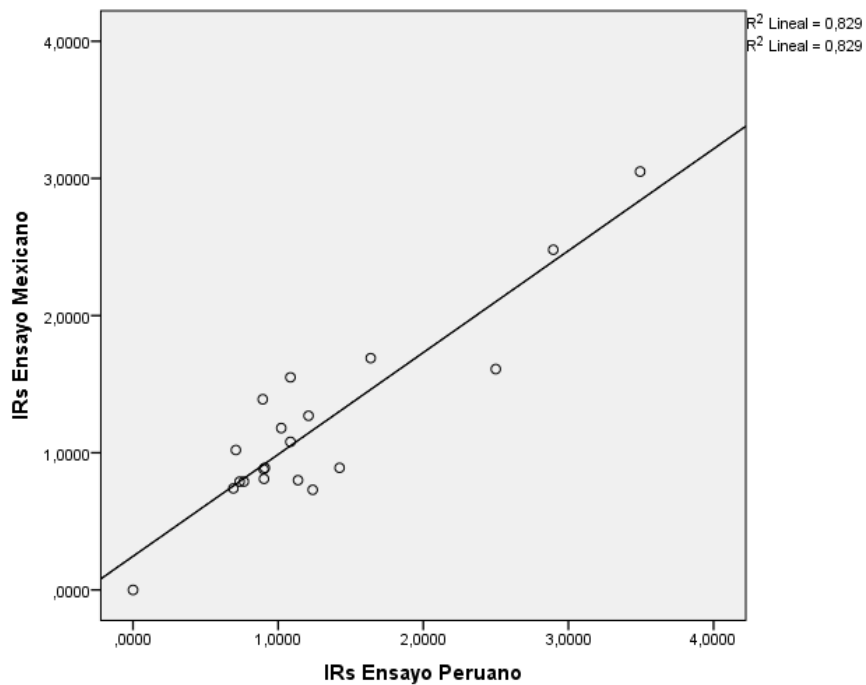


Figura 5. Dispersión de índices de reactividad (IRs) obtenidos por un técnico mexicano y uno peruano.

6.2. Estandarización y optimización de la técnica de ELISA

Se diseñaron cuatro constructos para la optimización del ELISA en base a la concentración de antígeno (1ug/ml y 2 ug/ml), dilución de suero (1:500, 1: 1000 y 1:2000), y dilución de conjugado anti IgG ligado a peroxidasa (1:5000 y 1:10000); se evaluaron tres sueros positivos y tres negativos bajo el criterio de mejor discernimiento entre ambos grupos, con base en la diferencia de absorbancias (Figura 6). Se obtuvo que el mejor contraste entre sueros positivos y negativos fue con las concentración de antígeno de 2ug/ml, suero 1:500 y conjugado 1: 5000.

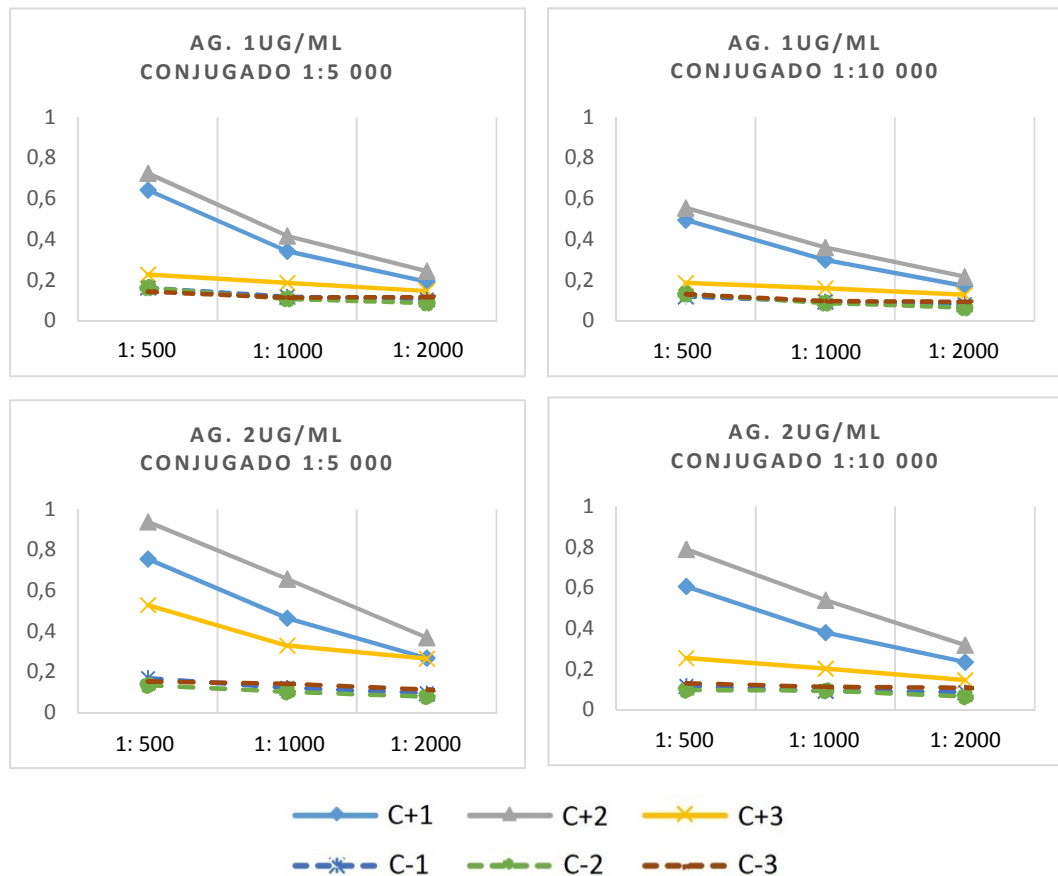


Figura 6. Resultados de la optimización del ELISA. Concentración de antígeno, suero y conjugado.
C+1, C+2, C+3: sueros positivos; C-1, C-2, C-3: sueros negativos
AG: Antígeno de *Toxoplasma gondii*

6.3. Evaluación de sueros mediante estuche de ELISA referencial

Se evaluaron los 178 sueros de voluntarios peruanos mediante el ELISA desarrollado y validado por el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría de México (LIE-INP), México D.F; de acuerdo a las especificaciones descritas por Caballero-Ortega et al (2014). Se consideró como suero positivo a aquellos que tuvieran un índice de reactividad mayor o igual a 1.1. De los 178 sueros se hallaron 107 no reactivos y 71 reactivos para anticuerpos IgG anti -*Toxoplasma gondii* (Figura 7).

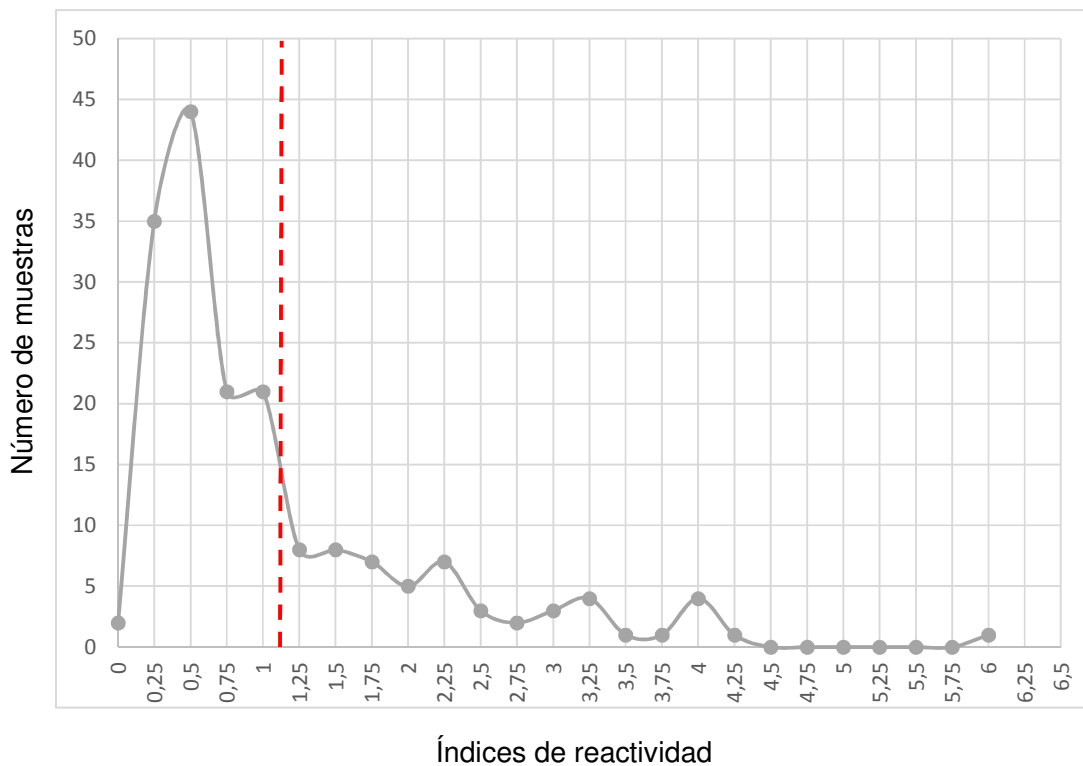


Figura 7. Distribución de frecuencias de los índices de reactividad (IRs) de los sueros evaluados mediante el estuche de ELISA referencial. La línea cortada representa el punto de corte (IR = 1.1).

6.4. Ensayo de normalidad

Las absorbancias procedentes de muestras de sueros negativos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si sus frecuencias seguían una distribución normal. Como resultado se obtuvo un nivel de significación de 0.015, menor a 0.05 por lo que se asumió que los datos no siguen una distribución normal (Figura 8 y 9).

		ABS NEG NORM MX
N		107
Parámetros normales ^{a,b}	Media	,097093
	Desviación típica	,0815034
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,563
Sig. asintót. (bilateral)		,015

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Figura 8. Prueba de Kolmogorov – Smirnov para los sueros negativos.

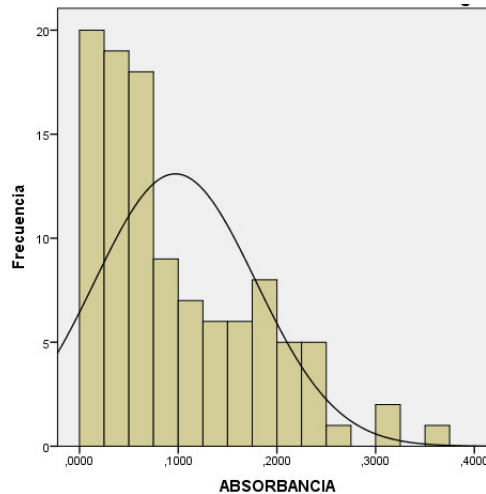


Figura 9. Distribución de frecuencias de las absorbancias de sueros negativos.

6.5. Determinación del punto de corte

El óptimo punto de corte para el ELISA estandarizado se determinó mediante curvas ROC mediante el programa SPSS versión 20.

Se obtuvo un área bajo la curva de 0.877 y como óptimo punto de corte un índice de reactividad de 1, con el cual se obtiene una sensibilidad del 85,9% y una especificidad del 71%.

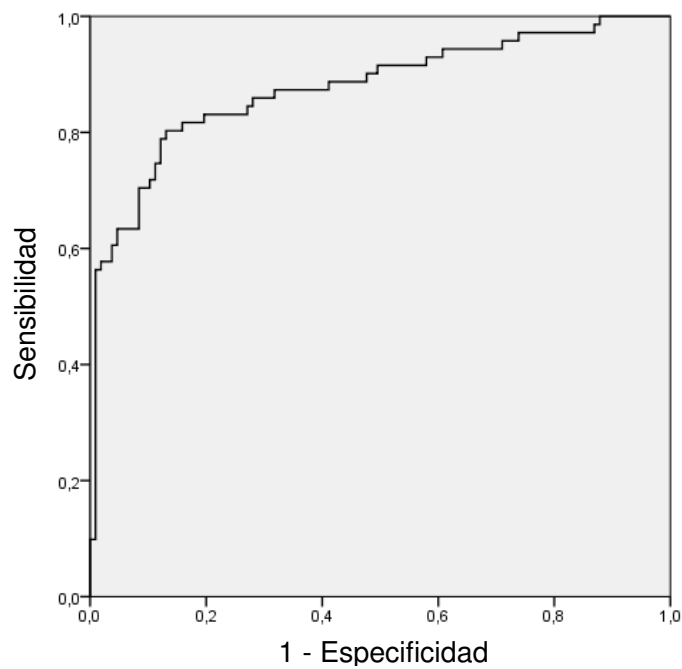


Figura 10. Curva ROC.

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,967255	,859	,308
,985741	,859	,299
1,000904	,859	,290
1,013137	,859	,280
1,038281	,845	,280



Figura 11. Posibles puntos de corte y sus respectivos valores de sensibilidad y especificidad. La flecha indica el óptimo punto de corte.

6.6. Parámetros diagnósticos

Como parte de la evaluación de la técnica estandarizada, se calcularon los valores de sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica, valores predictivos positivos y negativos, coeficientes de verosimilitud positivos y negativos, y el coeficiente kappa; considerando como prueba referencial al kit de ELISA Mexicano (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4. Tabla de contingencia. Se muestran los resultados para las 178 muestras evaluadas por el ELISA estandarizado y el ELISA referencial.

		ELISA referencial		Total
		Ausencia	Presencia	
ELISA estandarizado	Ausencia	75	10	85
	Presencia	32	61	93
Total		107	71	178

Cuadro 5. Parámetros diagnósticos del ELISA estandarizado

Sensibilidad diagnóstica (SD)	85.9 %
Especificidad diagnóstica (ED)	70.1 %
Valor predictivo positivo (VPP)	65.6 %
Valor predictivo negativo (VPN)	88.2 %
Coficiente de verosimilitud positivo (CVP)	2.87
Coficiente de verosimilitud negativo (CVN)	0.20
Kappa	0.53

6.7. Evaluación inter ensayo

Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson para las absorbancias obtenidas por grupos de muestras en dos fechas diferentes. Se obtuvieron coeficientes de 0.93, 0.88, 0.57 y 0.95 para el primer, segundo, tercer y cuarto ensayo, respectivamente; lo cual se resumen en la existencia de correlaciones positivas inter ensayo.

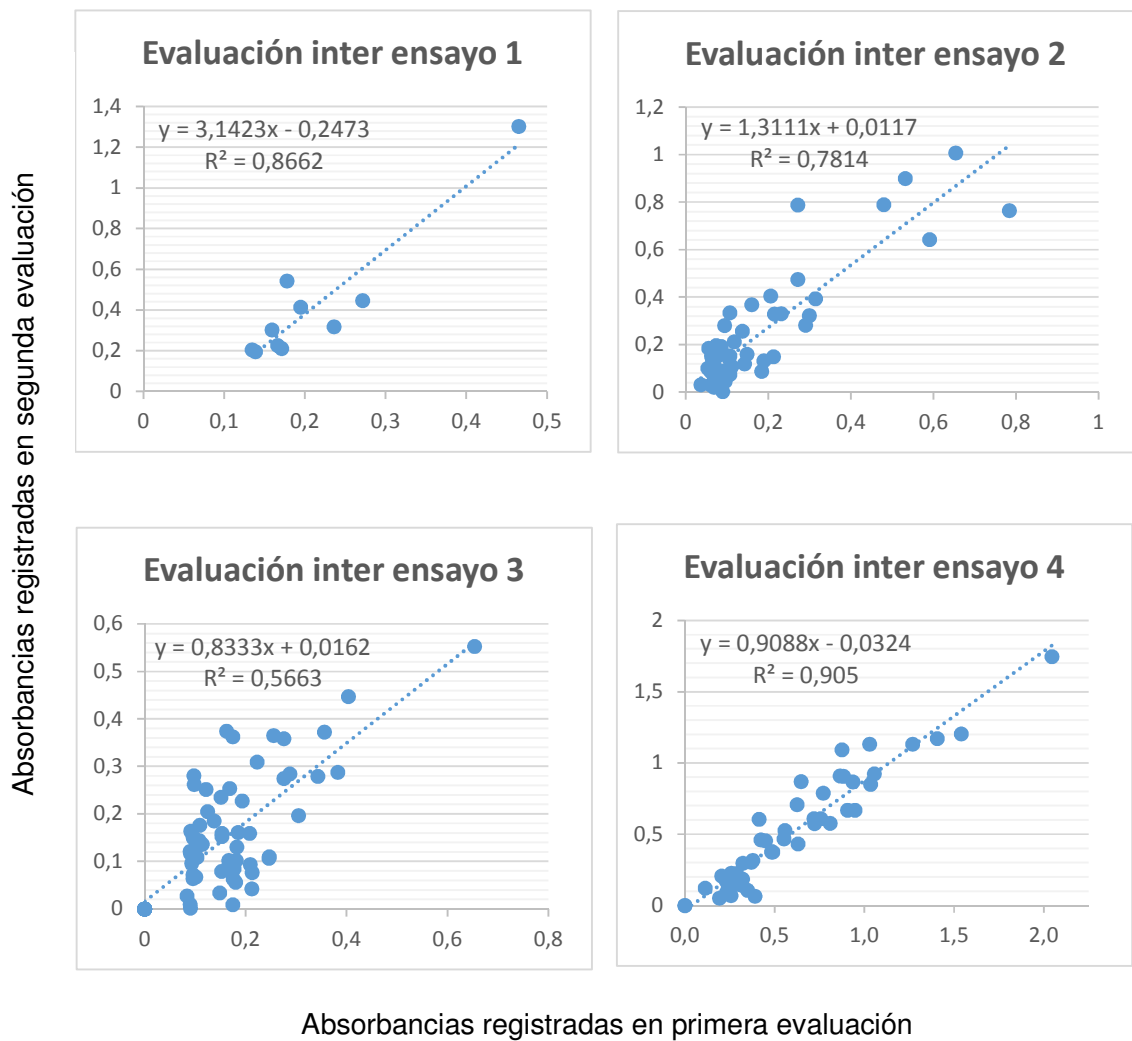


Figura 12. Dispersión de los valores de absorbancia obtenidos durante las evaluaciones inter ensayo. Se evaluaron las 178 muestras por la técnica de ELISA estandarizada. en dos fechas distintas.

6.8. Evaluación intra ensayo

Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.975 para los duplicados de las 178 muestras de suero evaluadas en una misma placa y en una misma fecha.

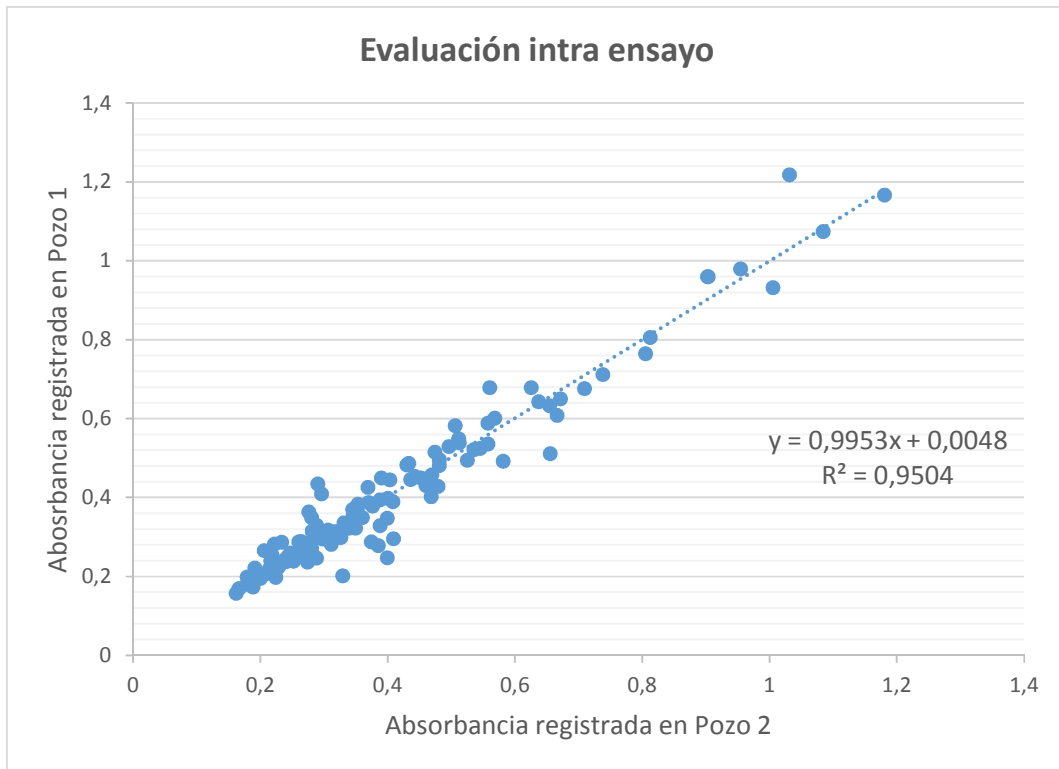


Figura 13. Dispersión de los valores de absorbancia obtenidos las evaluaciones intra ensayo.

6.9. Frecuencia de anticuerpos IgG en población evaluada

Considerando un total de 93 sueros positivos, se determinó una frecuencia aparente del 52.2%. Sin embargo, tomando en cuenta los parámetros diagnósticos de la prueba obtenidos (SD: 85.9 y ED: 70.1) y un intervalo de confianza del 95%, fue posible obtener una frecuencia corregida de $39.8 \pm 0.072\%$ de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en la muestra evaluada.

VII. DISCUSIÓN

La infección causada por el protozooario parásito *Toxoplasma gondii* es una de las zoonosis más frecuentes a nivel mundial; ello debido a que, en comparación de otras parasitosis, el hombre como hospedero accidental se halla expuesto a varias vías de infección siendo la alimentaria la más frecuente (El-Tras et al., 2012). La importancia que representa el estudio de la infección por *Toxoplasma gondii* y la toxoplasmosis, reside en los cuadros clínicos asociados a grupos de riesgo como pacientes VIH-SIDA y gestantes en los cuales se presenta la toxoplasmosis en su forma ocular - cerebral y congénita, respectivamente (Sepúlveda et al., 2014). En ese sentido, el desarrollo de técnicas diagnósticas seguras para la confirmación de casos en la clínica o en estudios epidemiológicos, es una necesidad que se debe abordar y adaptar a contextos locales considerando la practicidad, seguridad y economía de las mismas (Caballero-Ortega et al, 2014; WHO, 2012). A fin de brindar una mejor aproximación al estado de infección, es necesario someter estas técnicas a un proceso de validación en el cual se evalúa su idoneidad para el proceso que el investigador requiera (WOAH, 2014; Van den Bruel et al., 2006; Knottnerus et al., 2002). Para el Perú, son escasos los reportes epidemiológicos sobre la infección por *T. gondii*; además en ninguno de ellos se sometieron las técnicas a un proceso de evaluación apropiada. Por ello, esta investigación fue orientada al desarrollo y evaluación de un ELISA capaz de detectar anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en población peruana, con el objetivo de contar con una herramienta útil para estudios subsecuentes en la epidemiología de esta zoonosis en el país.

El primer paso consistió en una transferencia tecnológica y la evaluación de la reproducibilidad de la técnica de ELISA referencial, previamente validada, entre un técnico mexicano y un técnico peruano. En esta etapa se obtuvo una alta correlación. La reproducibilidad se entiende como la capacidad de un método para que sus resultados sean

coherentes al aplicarlo a alícuotas de las mismas muestras analizadas en distintos laboratorios (WOAH, 2014).

En la fase de estandarización se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno, suero y conjugado como parte de la optimización de los mismos para el mejor desempeño en la discriminación entre muestras positivas y negativas. Los parámetros obtenidos concuerdan con lo descrito por Ortíz-Alegría (2004) quien estandarizó y validó un ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti *T. gondii* en mujeres gestantes, y obtuvo como concentraciones óptimas 5 ug/mL de antígeno, 1:1000 de suero y 1:5000 de conjugado. Un aspecto importante a destacar en este sentido es que entonces se requiere apenas un microlitro de suero para hacer la evaluación por esta técnica, lo cual facilita el proceso aun cuando haya dificultades en la toma de muestra o esta deba ser pequeña.

Las 178 muestras colectadas como parte de este estudio fueron evaluadas mediante el estuche ELISA de referencia, con el cual se obtuvo un total de 107 sueros negativos y 71 positivos, con lo cual se completó el mínimo de muestras requeridas para el proceso de evaluación. Se demostró que las muestras negativas no seguían una distribución normal.

Mediante el análisis de índices de reactividad mediante curvas ROC, fue posible determinar el punto de corte óptimo con el cual se obtiene la mejor sensibilidad y especificidad, lo cual resultó en un 85.9% y 71%, respectivamente. Estos valores aunque no igualan o superan a los estuches disponibles en el mercado, permiten una buena captación de positivos y negativos, por lo que para fines diagnósticos tendría que estar acompañada de una prueba confirmatoria con alta especificidad como el Western Blot. Con base en los coeficientes de verosimilitud, el ELISA estandarizado tiene una mejor capacidad para confirmar presencia de infección respecto al estuche ELISA referencial, en tanto que la situación es inversa si se trata de confirmar ausencia de infección. (Caballero-Ortega, 2014).

Tanto en las evaluaciones de reproducibilidad inter e intra ensayos se obtuvieron buenas correlaciones, lo cual demuestra la estabilidad del proceso en el tiempo y el buen desempeño en la ejecución de la técnica, respectivamente.

Tekkesin et al. (2011) realizaron un estudio comparativo entre dos estuches comerciales que detectan anticuerpos IgG: Cobas 6000 Toxo IgG assay (Roche Diagnostics, USA; SD= 99.5%, ED= 98.8%) y AxSYM Toxo IgG assay (Abbott Laboratories, USA; SD= 99.7%, ED= 99.1%). De acuerdo a sus valores de sensibilidad y especificidad, tienen una resolución casi perfecta para calificar las muestras como positivas o negativas en comparación con el ELISA desarrollado en el presente trabajo; sin embargo, es importante considerar que ambos estuches involucran antígenos recombinantes y procesos automatizados, lo cual eleva su costo y restringe su uso para estudios exploratorios de tipo epidemiológicos.

Son escasos los trabajos publicados respecto a la validación de las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii*, ya que para la mayoría de casos los estudios epidemiológicos usan estuches comerciales. El ELISA desarrollado como parte de este trabajo de investigación obtuvo valores aceptables de sensibilidad y especificidad, por lo que podría ser empleado en estudios de seroprevalencia o diagnóstico si en el caso de esta última se acompaña de una prueba confirmatoria.

Haciendo uso del ELISA evaluado, fue posible obtener una frecuencia de seropositividad del 39.8% luego de hacer el respectivo ajuste en base a la sensibilidad y especificidad de la prueba en mención. Este valor corresponde a lo reportado por Calderón et al. (1992) quienes encontraron una seropositividad del 50% en población de la costa y 31% en población de la sierra.

VIII. CONCLUSIONES

- El ELISA estandarizado y evaluado para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii*, es una técnica con sensibilidad significativa, por lo cual puede ser empleado en estudios de tamiz o seroprevalencia; además de su fácil ejecución y bajo costo.
- El ELISA validado por el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría de México, México D.F, es útil para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* no sólo en población mexicana, sino también peruana.
- La frecuencia de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en población de Lima y Cusco (39.8%) se halla en el promedio reportado a nivel mundial y de la región latinoamericana para población sana.

IX. RECOMENDACIONES

- Estandarizar y evaluar otras técnicas serológicas para el diagnóstico y confirmación de la infección por *Toxoplasma gondii* en nuestro país.
- Realizar estudios seroepidemiológicos en población humana de las diferentes regiones del Perú.
- Ejecutar estudios de tamiz serológico para toxoplasmosis a mujeres en edad fértil y gestantes.
- Evaluar el estado de infección por *Toxoplasma gondii* en animales domésticos y destinados al consumo humano en zonas urbanas y rurales.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bruel, A. Van Den, Aertgeerts, B., & Buntinx, F. (2006). Results of diagnostic accuracy studies are not always validated. *Journal of Clinical Epidemiology*, 59, 559-566.

Caballero-Ortega, H., Castillo-Cruz, R., Murrieta, S., Ortíz-Alegría, L. B., Calderón-Segura, E., Conde-Glez, C. J. & Correa, D. (2014). Diagnostic-test evaluation of immunoassays for anti-Toxoplasma gondii IgG antibodies in a random sample of Mexican population. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8, 642-647.

Cáceda Sánchez, R., Seas Ramos, C., Echevarría Zárate, J., Samalvides Cuba, F., León Rojas, Y., & Gotuzzo Herencia, E. (2000). Toxoplasmosis cerebral en pacientes con SIDA en el Hospital Nacional Cayetano Heredia entre 1989 y 1999. *Revista Médica Herediana*, 11(1), 15-21.

Calderón, M., Madico, G., Gilman, R., Montenegro, T., Castillo, R., & Miranda, E. (1992). Detección de anticuerpos IgG contra Toxoplasma gondii en tres áreas geográficas del Perú por IFI, ELISA Y EITB. *Memorias del X Congreso Nacional de Biología del Perú*, 333-338.

Cañón-Franco, W., López-Orozco, N., Gómez-Marín, J., & Dubey, J. P. (2014). An overview of seventy years of research (1944 – 2014) on Toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasites & Vectors*, 7, 427.

Castillo, L., Noé, N., Falcón, N., & Chávez, A. (2012). Tipos de crianza de felinos domésticos como factor de riesgo para la presentación de infección por *Toxoplasma gondii*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(4), 448-453.

Cedillo-Peláez, C. (2009). Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre de México. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cerda, J. & Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teóricos-prácticos. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2): 138-141.

Cerro, L., Chávez, A., Casas, E., Suárez, F., & Rubio, A. (2009). Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en gatos de Lima Metropolitana y concordancia entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(2), 285-290.

Cerro, L., Rubio, A., Pinedo, R., Mendes-de-Almeida, F., Brener, B., & Labarthe, N. (2014). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus* , Linnaeus 1758) living in Lima , Peru. *Brazilian journal of veterinary parasitology*, 23(1), 90-93.

Chang, K., Chávez, A., Li, O., Falcón, N., Casas, E., & Casas, G. (2009). Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en llamas hembras de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(2), 306-311.

Conraths, F. J., & Schares, G. (2006). Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Veterinary Parasitology*, 136, 91-98.

Contreras, O. & Tejada, A. (1974). Estudio serológico sobre toxoplasmosis en ganado ovino beneficiado en Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 1(2), 147-153.

Cornejo, A., Cubas, E., Gonzáles, J., Pilares, R., & Náquira, F. (1971). Toxoplasmosis en Pacientes del Hospital Obrero de Lima. *Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 54(1), 58-71.

Cubillas, R., Maguiña, C., Saona, P., Chinga, E. & Llanos, F. (2000). Prevalencia de anticuerpos anti - *Toxoplasma gondii* en gestantes del Hospital Cayetano Heredia (Lima). *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 13(3),

Delgado, P., Sánchez, N., Delgado, J., Biffi, C., Malheiros, A. & Dávila, C. (2013). Detection of infection with *Toxoplasma gondii* in manatees (*Trichechus inunguis*) of the Peruvian Amazon. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 211-216.

Dubey, J. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd Edition. Florida: CRC Press. 313pp.

Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126, 57-72.

Dubey, J. P., Levy, M. Z., Sreekumar, C., Kwok, O. C. H., Shen, S. K., Dahl, E., & Lehmann, T. (2004). Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *The Journal of parasitology*, 90(5), 1015-1018.

El-Tras, W., Tayel, A.A. & El-Kady, N. (2012). Source diversity of *Toxoplasma gondii* infection during meal preparation. *Journal of Food Safety*,32:1-5.

Eza, D., Cerrillo, G., Moore, D. a J., Castro, C., Morales, D., Cabanillas, J., & Alfaro, A. (2006). Postmortem findings and opportunistic infections in HIV- positive patients from a public hospital in Peru. *Pathology Research Practice*, 202(11), 767-775.

Ferreira, I. M. R., Vidal, J. E., Costa-Silva, T. a., Meira, C. S., Hiramoto, R. M., Penalva de Oliveira, A. C., & Pereira-Chiocola, V. L. (2008). *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental Parasitology*, 118, 221-227.

Flahault, A., Cadilhac M., & Thomas G. (2005). Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *Journal of Clinical Epidemiology*, 58, 859-862.

Gambino, B. (2012). The validation of screening tests: Meet the new screen same as the old screen?. *Journal of Gambling Studies* 28: 573-605.

García, M., Chávez, A., Casas, E., Díaz, D., Avendaño, J., Campos, B. & Loayza, F. (2002). Estudio de las zoonosis parasitarias de localización ocular en el Instituto de Oftalmología (INO) (Periodo 1985-1999). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 13(2), 78-83.

Greiner, M. & Gardner, I.A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 45, 3-22.

Goater, T., Goater, C., & Esch, G. (2014). *Parasitism*. 2nd Edition. New York: Cambridge University Press. 497pp.

Hotez, P. (2013). *Forgotten People Forgotten Diseases: The Neglected Tropical Diseases and their Impact on Global Health and Development*, Second Edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press.

Jacobson R.H. (1998). Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 17(2), 507-526.

Kijlstra, A., & Jongert, E. (2008). Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *International Journal for Parasitology*, 38, 1359-1370.

Knottnerus, J.A., Van Weel, C. & Murriss, J.W. (2002). Evaluation of diagnostic procedures. *BMJ*, 324, 477-480.

Lacunza-Paredes, R. O., & Boza-Marroquín, M. (2012). Hidropesía fetal como signo ecográfico de toxoplasmosis congénita. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 58(1), 55-58.

Maguiña, C., Gotuzzo, E., Alvarez, H., Carcelen, A., Irrivaren, J., Soto, J., & Cok, J. (1998). Toxoplasmosis en Bartonellosis Humana. *Revista Médica Herediana*, 9(1), 14-20.

Marocho, L., Zegarra, J., Almendras, N., Valencia, E., Romero, G., Solano, L., & Chumpitaz, J. (2012). Estudio comparativo de la reactividad serológica a *Toxoplasma gondii* en pacientes atendidos con diagnóstico de esquizofrenia versus controles. *Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 73(1), 42.

Montoya, J. G. (2002). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases*, 185 Suppl , S73-S82.

Morales, F., Gil, A., Villanueva, V. & Gómez, F. (1979). Prevalencia de infección por *Toxoplasma* en escolares. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 86(4), 306-310.

Náquira, F., Cornejo, A., Náquira, C., Vílchez, M., Castillo, C., & Cáceres I. (1972). Estudio Serológico de la Toxoplasmosis en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Tropical de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 1(1), 28-32.

Nunura, J., Vásquez, T., Endo, S., Salazar, D., Rodriguez, A., Pereyra, S., & Solis, H. (2010). Disseminated Toxoplasmosis in an immunocompetent patient from peruvian amazon. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 52(2), 111-112.

Ortíz-Alegría, L. B. (2004). Validación de Técnicas de Laboratorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385-1394.

Pastor, J., Chávez, A., Casas, E. & Serrano, E. (2003). Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en vicuñas de Puno. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 14(1): 79-82.

Peeling, R. W., Smith, P. G., & Bossuyt, P. M. M. (2010). A guide for diagnostic evaluations. *Nature reviews. Microbiology*, 8(11), S2-S6. doi:10.1038/nrmicro1568

Petersen, E. (2007). Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 12, 214-223.

Ramírez, J., Chávez, A., Casas, E., Rosadio, R., & Falcón, N. (2005). Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en alpacas de comunidades de la provincia de Canchis, Cusco. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 16(2), 169-174.

Reátegui, C., & Vela, L. (2011). Factores socioeconómicos-epidemiológicos y su relación con la seroprevalencia de Toxoplasmosis en gestantes atendidas en los hospitales «Felipe Arriola» y «Cesar Garayar», Iquitos, Perú, 2009. *Neotropical Helminthology*, 5(1), 31-40.

Remington, J. S., Thulliez, P., & Montoya, J. G. (2004). Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 941–945.

Rico-Torres, C. (2005). Estandarización y validación a nivel laboratorio de una prueba de PCR para la detección directa de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas. Tesis para obtener el título de Química Farmaceutica Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México.

Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 264-296.

Roberts, L., & Janovy, J. (2009). *Foundations of Parasitology*. 8th Edition. New York: Mc Graw Hill. 701pp.

Romero, M., Gennari, S., Soares, H., Dubey, J.P., Zúñiga, A. & Ferreira, F. Toxoplasma gondii antibodies in wild white-lipped peccary (Tayassu pecari) from Peru. *Journal of Parasitology*, 96 (6), 1232.

Rorman, E., Zamir, C. S., Rilgis, I., & Ben-David, H. (2006). Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of Toxoplasma gondii infection. *Reproductive Toxicology*, 21, 458-472.

Saavedra, G. M., & Ortega, Y. R. (2004). Seroprevalence of Toxoplasma gondii in swine from slaughterhouses in Lima, Peru, and Georgia, U.S.A. *The Journal of Parasitology*, 90(4), 902-904.

Samalvides, S. K., Milla, L. M., Vila, J. R., Espinoza, I., & Guillén, D. (2014). Tres formas clínico-radiológicas de compromiso neurológico por toxoplasmosis congénita. *Revista de Neuropsiquiatria*, 77(3), 188-195.

Saravia, M., Chávez, A., Casas, E., Falcón, N., & Pinto, W. (2004). Seroprevalencia de Toxoplasma gondii en llamas de una empresa pecuaria en Melgar, Puno. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 15(1), 49-55.

Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Groß, U., Pleyer, U., & Lüder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 917-929.

Sepúlveda-Arias, J. C., Gómez-Marin, J. E., Bobić, B., Naranjo-Galvis, C., & Djurković-Djaković, O. (2014). Toxoplasmosis as a travel risk. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 592-601.

Serrano-Martínez, E., Collantes-Fernández, E., Chávez-Velásquez, a., Rodríguez-Bertos, a., Casas-Astos, E., Risco-Castillo, V., & Ortega-Mora, L. M. (2007). Evaluation of Neospora caninum and Toxoplasma gondii infections in alpaca (Vicugna pacos) and llama (Lama glama) aborted fetuses from Peru. *Veterinary Parasitology*, 150, 39-45.

Soria, J., Pinto, R., & Tejada, A. (2004). Estudio clínico serológico de la Toxoplasmosis. *Revista Peruana de Medicina Tropical*, 9(1), 33-50.

Sterkers, Y., Varlet-Marie, E., Cassaing, S., Brenier-Pinchart, M. P., Brun, S., Dalle, F., & Bastien, P. (2010). Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of Toxoplasma gondii from simulated specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3216-3222.

Suárez, F., Flores, W., Chávez, A., Rivera, H., & Huanca, W. (2004). Toxoplasmosis en alpacas de la sierra altoandina. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 15(2), 170-173.

Suaréz-Aranda, F., Galisteo, A. J., Hiramoto, R. M., Cardoso, R. P., Meireles, L. R., Miguel, O., & Andrade, H. F. (2000). The prevalence and avidity of Toxoplasma gondii IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Veterinary Parasitology*, 91, 23-32.

Switaj, K., Master, A., Skrzypczak, M., & Zaborowski, P. (2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 170-176.

Tekkesin, N., Keshin, K., Kilinc, C., Orgen, N., & Molo, M. (2011). Detection of immunoglobulin G antibodies to *Toxoplasma gondii*: Evaluation of two commercial immunoassay systems. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 44: 21-26.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, 1217-1258.

Tori, C. (1998). Toxoplasmosis y amigdalitis . *Revista Médica Herediana*, 9(2), 89-94.

Van den Bruel, A., Aertgeerts, B. & Buntinx, F. (2006). Results of diagnostics accuracy studies are not always validated. *Journal of Clinical Epidemiology*,5: 559-566.

Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 895-901.

Weiss, L. M., & Kim, K. (2007). *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. 1st Edition. London: Academic Press. 777pp.

World Health Organization (WHO). (2012). Research Priorities for Zoonoses and Marginalized Infections - Technical report of the TDR Disease Reference Group on Zoonoses and Marginalized Infectious Diseases of Poverty. Vol. 971. Ginebra. 119pp.

World Organization for Animal Health (WOAH). (2014). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 1.1.5. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. OIE, París, 1-18.

Xicoténcatl, L. (2010). Estandarización y evaluación de un ELISA indirecto para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii* en mamíferos domésticos y su uso posterior en animales silvestres en cautiverio. Tesis para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista. Universidad Nacional Autónoma de México.

Zuzunaga, M., Chávez, A., Li, O. & Evaristo, R. (2006). *Toxoplasma gondii* en vicuñas de la Reserva Nacional de Pampa Galeras. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17 (2): 173 - 177.

XI. ANEXOS

1. Amortiguador de carbonatos 0.015 M, pH 9.6

- Pesar 1.59 g. de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 1.26 g. de bicarbonato de sodio (NaHCO_3).
- Disolver los carbonatos en 800 ml de agua bidestilada.
- Ajustar el pH a 9.6.
- Aforar a 1000 ml
- Mantener a 4°C.

2. Solución salina de fosfatos (PBS) (NaCl 0.15M, pH 7.2)

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

*PB 10X: 2.62 g de Fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) más 11.5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4).
Disolver en 200 ml de agua destilada (calentar hasta disolver los cristales) y aforar a 1 litro.

3. Amortiguador de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)
 - A un litro de PBS pH 7.2 añadir 500 ul de Tween 20.
 - Mantener a 4°C

4. Solución de bloqueo (Leche descremada al 5%)
 - Pesar 5 g de leche descremada en polvo
 - Disolver en 100 ml de PBS-Tween 20, 0.05%
 - Guardar a -20°C

5. Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa
 - Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD)
 - Añadir 5 ml de ácido cítrico 0.1M y 5 ml de citrato de sodio 0.1M
 - Adicional 4 ul de H₂O₂ al 30%.
 - Preparar esta solución inmediatamente antes de usarla y mantenerla en oscuridad.

6. Solución de ácido sulfúrico 2N
 - Tomar 98.08 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄)
 - Añadir cuidadosamente a 850 ml de agua bidestilada
 - Aforar a 1 litro.