



**EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES SAG1, GRA7 Y  
ROP1 EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EN  
EL DEPARTAMENTO DE SUCRE**

**KELLY ESTELA OROZCO MÉNDEZ**

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Biología

UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
SINCELEJO  
2016



**EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES SAG1, GRA7 Y  
ROP1 EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EN  
EL DEPARTAMENTO DE SUCRE**

**KELLY ESTELA OROZCO MÉNDEZ**

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Biología

Director

Yosed Patricia Anaya Chávez, Msc

Co-Director:

Pedro José Blanco Tuirán, PhD

UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS

SINCELEJO

2016

**Notas de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Firma de presidente del jurado**

---

**Firma del jurado 2**

---

**Firma del jurado 3**

**Sincelejo, (15, Febrero, 2016)**

## DEDICATORIA

*A Dios, por su infinito amor y permitirme alcanzar una nueva meta.*

*A mis padres Isa Méndez y Bilio Orozco, por sus sabios consejos y esfuerzo que hicieron convertirme en lo que soy.*

*A mi esposo Arturo, por creer en mí y por enseñarme que con constancia y perseverancia se pueden lograr las metas. Gracias por tu amor y apoyo incondicional en todo este tiempo.*

*A mis hermanas Patry, Arleth, Sixta, Leidis y Yeimi, por estar siempre a mi lado apoyándome.*

*A mis sobrinos José, Yuliana y Sara, quienes con su alegría han llenado mi vida, y fueron motivo de inspiración para mí.*

*Kelly Orozco Méndez*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por ser mi guía y compañero permanente en todo lo que hago.

A mi familia, fuente de apoyo constante e incondicional en todas las metas propuestas.

A mi esposo Arturo Luna, por brindarme su amor, comprensión y todo su apoyo.

Al Doctor Pedro Blanco Tuirán, por su apoyo, orientación y motivación, que han sido fundamentales en mi formación como investigadora.

A Yosed Anaya, por su dedicación y orientación en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigas y compañeras Yina Montero y Yulenis Assia, por su amistad, comprensión y cooperación en la realización de esta investigación.

A Erwin Camacho, por sus valiosos aportes en el desarrollo de este trabajo.

A las gestantes participantes, por su colaboración para llevar a cabo este proyecto. A los jefes de los programas PIP de los centros de salud de los municipios del estudio, por abrirnos las puertas de estas entidades.

A mis compañeros de maestría y del grupo Investigaciones Biomédicas, por su apoyo y acompañamiento.

A COLCIENCIAS, por brindar apoyo financiero a esta investigación (Proyecto Código: 112949326224).

A la Universidad de Sucre, por su formación de postgrado.

Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo.  
Artículo 12 Resolución 02 – 03.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	18
1. MARCO REFERENCIAL .....	22
1.1. MARCO DE ANTECEDENTES .....	22
1.2. MARCO TEÓRICO .....	25
1.2.1. Agente etiológico .....	25
1.2.2. Genética .....	32
1.2.3. Principales proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	33
1.2.4. Epidemiología .....	37
1.2.5. Respuesta inmune .....	42
1.2.6. Manifestaciones clínicas .....	44
1.2.7. Diagnóstico .....	48
2. OBJETIVOS .....	52
2.1. Objetivo General .....	52
2.2. Objetivos Específicos .....	52
3. METODOLOGÍA .....	53
3.1. Tipo de estudio .....	53
3.2. Área de estudio .....	53
3.3. Población de estudio .....	53
3.4. Tamaño de la muestra .....	54
3.5. Criterios de inclusión .....	55
3.6. Procedimientos en el laboratorio .....	55
3.6.1. Obtención de muestras .....	55
3.6.2. Detección de anticuerpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por la prueba ELISA empleando antígenos nativos (an-ELISA IgG) .....	55
3.6.3. Detección de anticuerpos IgM anti- <i>Toxoplasma</i> por la prueba ELISA de captura (cap-ELISA) .....	57
3.6.4. Detección de anticuerpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por la prueba ELISA utilizando antígenos recombinantes (rec-ELISA IgG) .....	59

3.6.5. Detección de anticuerpos IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por ELISA utilizando antígenos recombinantes (rec-ELISA IgM) .....	61
3.7. Análisis de Datos .....	63
3.8. Criterios diagnósticos.....	64
3.8.1. Manejo de pacientes.....	64
3.9. Aspectos éticos.....	65
4. RESULTADOS .....	66
4.1. Población de estudio .....	66
4.2. Características de la población de estudio .....	66
4.3. Detección de anticuerpos IgG anti- <i>Toxoplasma</i> por la prueba an- ELISA .....	67
4.4. Detección de anticuerpos IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por la prueba cap-ELISA.....	70
4.5. Detección de anticuerpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	72
4.6. Detección de anticuerpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por rec- ELISA.....	73
4.7. Detección de anticuerpos IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por rec- ELISA.....	75
4.8. Determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas an- ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> , rec-ELISA IgG y rec-ELISA IgM con los antígenos rSAG1, rGRA7 y rROP1 .....	76
4.8.1. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba an- ELISA IgG .....	76
4.8.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba rec- ELISA IgG empleando los antígenos rSAG1, rGRA7 y rROP1 .....	78
4.8.3. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba rec- ELISA IgM empleando los antígenos recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1 .....	79
4.9. Análisis de concordancia para las pruebas an-ELISA IgG, rec- ELISA IgG y rec-ELISA IgM anti- <i>Toxoplasma</i> frente a la prueba de IFI.....	81

4.9.1. Análisis de Kappa de Cohen para las pruebas an-ELISA IgG y rec-ELISA IgG frente a la técnica IFI .....	81
4.9.2. Análisis de Kappa de Cohen para la pruebas rec-ELISA IgM frente a la técnica cap-ELISA IgM .....	82
4.10. Prueba ELISA IgG e IgM anti- <i>Toxoplasma</i> y factores de riesgo.....	82
5. DISCUSIÓN .....	86
6. CONCLUSIONES .....	99
7. RECOMENDACIONES .....	100
8. REFERENCIAS.....	101
ANEXOS .....	125

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Agente etiológico de la toxoplasmosis. ....	26
Figura 2. Estadios de <i>T. gondii</i> .....	28
Figura 3. Órganos secretores.....	29
Figura 4. Ciclo de vida.....	32
Figura 5. Respuesta inmune humoral. ....	43
Figura 6. Respuesta inmune celular.....	44
Figura 7. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis. ....	47
Figura 8. Área de estudio. ....	54
Figura 9. Prueba ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgG anti- <i>T. gondii</i> empleando antígenos nativos.....	56
Figura 10. Prueba cap-ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgM anti- <i>T. gondii</i> .....	58
Figura 11. Prueba rec-ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgG anti- <i>T. gondii</i> .....	60
Figura 12. Prueba rec-ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgM anti- <i>T. gondii</i> .....	62

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Controles usados en la prueba an-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	57
Tabla 2. Interpretación de resultados prueba an-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	57
Tabla 3. Controles usados en la prueba cap-ELISA IgM.....	58
Tabla 4. Interpretación de resultados cap-ELISA IgM. ....	59
Tabla 5. Características antígenos recombinantes de <i>T. gondii</i> .....	61
Tabla 6. Concentración reactivos usados en la prueba rec-ELISA IgM anti- <i>Toxoplasma</i> .....	63
Tabla 7. Número de gestantes por municipio.....	66
Tabla 8. Resultados de IFI IgG anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	72
Tabla 9. Resultados de la prueba rec-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	73
Tabla 10. Resultados de la prueba rec-ELISA IgM. ....	75
Tabla 11. Resultados encontrados por la prueba an-ELISA. ....	76
Tabla 12. Sensibilidad y especificidad de la prueba an-ELISA IgG.....	76
Tabla 13. Resultados prueba rec-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> frente a la prueba de referencia (IFI).....	78
Tabla 14. Sensibilidad y especificidad de la prueba rec-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> .....	79
Tabla 15. Resultados encontrados por la prueba rec-ELISA IgM anti- <i>Toxoplasma</i> frente a la prueba cap-ELISA IgM. ....	80
Tabla 16. Sensibilidad y especificidad de la prueba rec-ELISA IgM anti- <i>Toxoplasma</i> .....	80
Tabla 17. Resultados del índice de Kappa ( $\kappa$ ) de las pruebas an-ELISA IgG y la prueba rec-ELISA IgG. ....	81
Tabla 18. Resultados del índice de Kappa ( $\kappa$ ) de la prueba rec-ELISA IgM.....	82

## LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Características de la población de estudio. ....	67
Gráfica 2. Punto de corte de la prueba an-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	68
Gráfica 3. Frecuencia de detección de anticuerpos tipo IgG anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	69
Gráfica 4. Resultados de la prueba an-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> en gestantes del departamento de Sucre. ....	70
Gráfica 5. Punto de corte de cap-ELISA IgM anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	71
Gráfica 6. Frecuencia de detección de anticuerpos IgM anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	72
Gráfica 7. Evaluación de los antígenos recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1 mediante la prueba rec-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	74
Gráfica 8. Evaluación de los antígenos recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1 mediante la prueba rec-ELISA IgM anti- <i>Toxoplasma</i> . ....	77
Gráfica 9. Factores asociados con la presencia de anticuerpos IgG anti- <i>Toxoplasma</i> en gestantes del departamento de Sucre. ....	84

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Folleto entregado a las gestantes del estudio. ....	125
Anexo 2. Consentimiento informado .....	127
Anexo 3. Formato de colección de información tipo encuesta. ....	129
Anexo 4. Protocolo prueba Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos IgG anti- <i>Toxoplasma</i> .....	130
Anexo 5. Fórmulas empleadas en el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y grado de concordancia Kappa de Cohen.....	131
Anexo 6. Relación entre factores de riesgo y positividad para anticuerpos tipo IgG anti- <i>Toxoplasma</i> .....	133
Anexo 7. Relación de las variables edad y periodo de gestación con resultados positivos por la prueba an-ELISA IgG anti- <i>Toxoplasma</i> .....	134
Anexo 8. Relación entre factores de riesgo y positividad para anticuerpos tipo IgM anti- <i>Toxoplasma</i> .....	135

## RESUMEN

La toxoplasmosis congénita puede causar graves secuelas como problemas visuales y neurológicos en el feto y el recién nacido. Se estima que en Colombia cada año aparecen de 2 a 10 casos por cada mil nacidos vivos, constituyéndose en una de las tres primeras causas de infección prenatal, con serias complicaciones neurológicas y oftalmológicas. Ante la falta de síntomas específicos en la infección por *Toxoplasma gondii*, se requiere la confirmación por técnicas serológicas. Por tal motivo se hace necesario validar nuevas metodologías que permitan aumentar la sensibilidad y especificidad de las técnicas disponibles con el fin de reducir el número de casos y las secuelas causadas por *T. gondii*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad de los antígenos recombinantes SAG1, ROP1 y GRA7 en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita en gestantes del departamento de Sucre.

La sensibilidad, especificidad y grado de concordancia de los ensayos ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma* con antígenos nativos (an-ELISA) y recombinantes (rec-ELISA) se determinaron al emplear como pruebas de referencia la inmunofluorescencia indirecta y prueba IgM de captura, respectivamente. Para la prueba an-ELISA IgG se encontró una sensibilidad de 93.3% y una especificidad de 70% con grado de concordancia bueno (0.65), mientras que para rec-ELISA IgG con el antígeno rSAG1 la sensibilidad fue de 93.3% y especificidad de 90%, con grado de acuerdo excelente (0.83). Para el antígeno rGRA7 la sensibilidad y especificidad fue de 86.7% y de 80% respectivamente, con grado de concordancia bueno (0.66) y para el antígeno rROP1 fue de 33.3% y 50%, respectivamente, con grado de acuerdo deficiente (-0.15%). La sensibilidad y especificidad de la prueba rec-ELISA IgM para el antígeno rSAG1 fue de 35.7% y 75.8% respectivamente, con grado de acuerdo deficiente (0.036), para rGRA7 fue 92.9% y 89.8% con grado de acuerdo aceptable (0.548) y para rROP1 fue de 85.7% y 87.6%, con grado de acuerdo aceptable (0.41). Esto demuestra que la prueba rec-ELISA es un buen método

para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma* en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita.

**Palabras clave:** Toxoplasmosis, ELISA, Antígenos recombinantes, anticuerpos, gestantes.

## ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis is the result of the affection of the fetus as a consequence of primary infection with *Toxoplasma gondii* in pregnant women; it can cause serious consequences such as visual and neurological problems in the fetus and newborn child. It is estimated that each year in Colombia there are 2 to 10 cases of congenital toxoplasmosis per thousand live births, becoming one of the top three causes of prenatal infection, with serious neurological and ophthalmologic complications for the fetus and newborn. In the absence of specific symptoms in *T. gondii* infection, confirmation by serological techniques is required. Therefore, it is necessary to validate new methodologies with the aim of increasing sensitivity and specificity of the available techniques in order to reduce the number of cases and the sequelae caused by *T. gondii* infection. In consequence, the objective of this study was to evaluate the utility of the recombinant antigens rSAG1, rROP1 and rGRA7 in the diagnosis of congenital toxoplasmosis in pregnant women in the Department of Sucre.

The sensitivity, specificity and degree of agreement of the ELISA assay for the detection of IgG and IgM anti-*Toxoplasma* using native (an-ELISA) and recombinant antigens (rec-ELISA) were determined with the indirect immunofluorescence (IFI) assay and IgM capture tests as benchmarks, respectively. For the an-ELISA IgG test a sensitivity of 93.3% and specificity of 70%, with good degree of concordance (0.65) were found, whereas for rec-ELISA IgG with the antigen rSAG1 sensitivity was 93.3% and specificity 90%, with excellent degree of agreement (0.83). For rec-ELISA IgG with the rGRA7 sensitivity and specificity was 86.7% and 80%, respectively, with good degree of agreement (0.66), whereas for rROP1 was 33.3% and 50%, respectively, with poor degree of agreement (-0.15%). Sensitivity and specificity of the rec-ELISA IgM test with rSAG1 was 35.7% and 75.8%, respectively, with poor degree of agreement (0.036); with rGRA7 was 92.9% and 89.8%, respectively, with acceptable degree of agreement (0.548); and with rROP1 was 85.7% and 87.6%, respectively, with acceptable level of agreement (0.41). This shows that the rec-ELISA test is a good

method for the detection of IgG and IgM anti-*Toxoplasma* in the diagnosis of congenital toxoplasmosis.

**Keywords:** Toxoplasmosis, ELISA, Recombinant antigens, antibodies, pregnant women.

## INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una infección ocasionada por el parásito protozoo *Toxoplasma gondii* (Carrada, 2005), que tiene como hospedero definitivo los felinos tanto domésticos como salvajes, y al hombre y otros animales de sangre caliente como sus hospederos intermediarios (Ospina, 1993). La importancia médica de la toxoplasmosis radica en la infección congénita y de pacientes inmunodeprimidos, en los cuales puede provocar grave sintomatología, mientras que en personas inmunocompetentes la infección pasa desapercibida por no presentar síntomas específicos (Gómez & Pinon, 2001). La toxoplasmosis congénita es el resultado de la afectación del feto como consecuencia de la infección materna. La posibilidad y el grado de afectación fetal dependen del período de gestación en que se produce la infección primaria en la embarazada. La posibilidad de contagio del feto se incrementa con la edad de la gestación, siendo mayor durante el tercer trimestre con un 65%, seguido de 25%-54% en el segundo y de 10%-17% en el primer trimestre. Por el contrario, el grado de afectación fetal es mayor cuando la infección se produce en las primeras semanas del embarazo y va disminuyendo a medida que transcurre la gestación. Es así como la infección en el primer trimestre puede producir retraso mental, convulsiones, defectos neurológicos o resultar en un aborto, mientras que en el segundo y tercer trimestre las manifestaciones clínicas varían desde hidrocefalia, epilepsia, coriorretinitis y problemas visuales (Njunda et al., 2011).

Si se tiene en cuenta que no hay programas públicos destinados a detectar casos de toxoplasmosis congénita y ofrecer tratamiento durante el embarazo, del 40% al 50% de las madres transmitirán la infección al feto (Gomez-Marin, Montoya-de-Londono, & Castaño-Osorio, 1997; Machado, Manrique, Ruiz, & Blanco, 2004) y entre el 85% al 90% de los recién nacidos nacerán sin evidencia de compromiso clínico. Sin embargo, de permanecer sin tratamiento más del 80% desarrollarán secuelas que incluyen retraso mental, convulsiones, alteraciones visuales graves (Praga, 1998).

En Colombia, Juliao y col. en 1983 mediante la detección de anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii*, encontraron que el 47% de la población ha tenido contacto con el parásito. De igual forma reportan que la tasa de seroprevalencia observada en mujeres en edad fértil era variable (entre 42.5% y 54.4%) y tuvo una distribución desigual en las diferentes regiones del país, siendo mayor en las región Atlántica (56.8%-73%) y Oriental (57.7%-66.2%) en comparación con la región Pacífica (33%-37.6%) y Central (31.6%-41.7%) (Juliao, Corredor, & Moreno, 1983). Estudios realizados posteriormente muestran que ciudades colombianas como Armenia, Valledupar, Cali, Villavicencio y Cúcuta presentan una seroprevalencia en mujeres embarazadas de 60%, 58%, 46.2%, 52.5% y 31.1% respectivamente (Rosso, Les, Agudelo, & Villalobos, 2006; Castro, Góngora & González, 2008; Cardenas et al., 2015).

En el departamento de Sucre estudios realizados por Machado y colaboradores determinaron una seroprevalencia de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma* de 56% con una incidencia del 2% en gestantes de la ciudad de Sincelejo (Machado et al., 2004), Además en otro estudio realizado en la misma ciudad se detectó ADN de *T. gondii* en 12 de 100 mujeres gestantes seronegativas para anticuerpos y de estas cuatro seroconvirtieron (Blanco, Assia, Montero & Orozco, 2011).

Las cifras anteriores, revelan que la toxoplasmosis es un problema de salud pública importante en Colombia. Se estima que cada año se presentan de 2 a 10 casos de infección congénita por cada mil nacidos vivos. Entre 800 y 3000 niños nacen infectados por *T. gondii* debido a la falta de tratamiento específico a las gestantes (Gómez & Pinon, 2001), constituyéndose en una de las tres primeras causas de infección prenatal con serias complicaciones neurológicas y oftalmológicas (Serrano & Cárdenas, 1999). La anterior afirmación se evidencia en el primer estudio multicéntrico neonatal sobre toxoplasmosis realizado entre los años 2009 al 2010 en las ciudades de Barranquilla, Bogotá, Florencia, Armenia, Riohacha, Cúcuta y Bucaramanga; en el cual se diagnosticaron 218 niños con infección congénita sintomáticos y asintomáticos, con una letalidad del 25% en los niños sin tratamiento clínico (Gomez-Marin et al., 2011).

La toxoplasmosis al no presentar síntomas específicos, requiere la confirmación por técnicas de laboratorio. El diagnóstico rápido y preciso de la infección aguda en la mujer embarazada es de vital importancia para ofrecer un tratamiento oportuno y reducir el riesgo de transmisión y la gravedad de la enfermedad en el recién nacido. Un diagnóstico incorrecto puede resultar en un aborto innecesario o en el tratamiento con fármacos potencialmente teratogénos (Liang et al., 2011). Además, las técnicas serológicas juegan un papel crucial para determinar la etiología de esta infección parasitaria puesto que permiten conocer el estado inmunológico de la gestante frente a *T. gondii* y determinan si la infección es clínicamente importante (Gómez, 2000).

Actualmente, el diagnóstico de la toxoplasmosis se realiza a través de técnicas serológicas. Estas consisten en la detección de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE anti-*T. gondii* con antígenos nativos del parásito como los taquizoítos intactos o extractos antigénicos solubles (Gómez, 2000). Sin embargo, existen dificultades en las pruebas serológicas que emplean este tipo de antígenos para la detección de los tipos de inmunoglobulinas. En el caso de la detección de IgM, ésta puede aparecer en concentraciones bajas y algunas veces indetectables cuando hay infección por una cepa poco virulenta o cuando la persona se encuentra inmunodeprimida (Li, Galvan, et al., 2000).

Otras dificultades que presentan las técnicas que emplean antígenos nativos es que requieren alta producción de parásitos en fluidos peritoneales de ratones infectados o producción en masa en cultivos para la obtención de taquizoítos; además, la producción de parásitos confiables y de alta calidad es laboriosa y costosa (Beghetto, Spadoni, Bruno, Buffolano, & Gargano, 2006). Por otra parte, el uso de extractos de taquizoítos pueden resultar en reacciones falsas positivas o falsas negativas debido a que los extractos antigénicos pueden contener materiales de los medios de cultivos, proteínas y otras macromoléculas que influyen en los resultados de las pruebas y dificultan su estandarización (Dai et al., 2012). También, la mayoría de los estuches utilizan los extractos de parásitos en el estadio de taquizoítos y no en otros estadios que también están presentes en

las etapas de la infección, como por ejemplo los bradizoítos (Saadatnia et al., 2012). Asimismo, las diferentes metodologías para la colección y purificación de estos antígenos pueden hacer variar la cantidad y la calidad de los antígenos obtenidos (Beghetto et al., 2006).

Debido a que la toxoplasmosis es un problema de salud pública importante en nuestro país y que las técnicas serológicas actualmente utilizadas para el diagnóstico de la infección por *T. gondii* presentan limitaciones de especificidad y sensibilidad, se hace necesario validar nuevas metodologías que permitan superar tales limitaciones con el fin de obtener una prueba que brinde resultados altamente confiables y un diagnóstico preciso, que pueda detectar la mayoría de los casos de toxoplasmosis y permita reducir el número de eventos de transmisión congénita y sus secuelas.

Los antígenos recombinantes no ocasionan reacciones cruzadas y disminuyen los falsos positivos y negativos, además de proporcionar mayor reproducibilidad de los ensayos (Pietkiewicz et al., 2007). En este sentido, los antígenos recombinantes SAG1, ROP1 y GRA7 han sido previamente evaluados y caracterizados por su capacidad para detectar anticuerpos específicos contra el parásito (Li, Maine, et al., 2000); además, han demostrado mayor sensibilidad y especificidad (97%) con respecto a los antígenos nativos (29%) utilizados en kits serológicos (Aubert et al., 2000). Por lo tanto, se plantea evaluar el empleo de los antígenos recombinantes SAG1, ROP1 y GRA7 como una alternativa para potenciar la especificidad y sensibilidad del diagnóstico serológico temprano de la infección congénita por *T. gondii* en el departamento de Sucre.

## 1. MARCO REFERENCIAL

### 1.1. MARCO DE ANTECEDENTES

La toxoplasmosis es una zoonosis causada por el protozoo intracelular obligado *T. gondii*, que puede infectar a humanos y muchas otras especies de animales de sangre caliente (mamíferos y aves) (EFSA, 2007; Martín & García, 2003). Presenta una distribución mundial, con seroprevalencia que varía del 10% al 50% en países desarrollados de clima templado hasta más del 80% en países subdesarrollados, principalmente del trópico (Perna et al., 2012). La mayoría de las infecciones por este parásito transcurren en forma asintomática. Solo un 20% de las personas inmunocompetentes manifiesta alguna sintomatología que comprende fiebre o adenopatías cervicales, mesentéricas y axilares, entre otras (Halonen & Weiss, 2013). Las principales formas clínicas de esta parasitosis son la toxoplasmosis congénita, toxoplasmosis ocular y toxoplasmosis en pacientes inmunodeprimidos (Martín & García, 2003; Remington, McLeod, Thulliez, & Desmonts, 2006).

Las primeras descripciones de toxoplasmosis humana fueron realizadas en 1913 por Castellani, pero se toma conciencia de su existencia en los estudios de 1923 realizados por el oftalmólogo Janku (Ospina, 1993). En 1939 la infección congénita es descrita por Wolf al aislar el parásito en lactantes con encefalomiелitis (Pantoja & Pérez, 2001). En Colombia, el parásito *T. gondii* fue reportado por primera vez en 1944 por el doctor Toro Mejía (Corredor, 1981). Luego Patiño, Camargo y otros describieron el primer caso de toxoplasmosis en humanos en el país (Ospina, 1993). Según Rosso y cols., en Colombia la prevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* es de 47% en la población en general, la cual aumenta con la edad y varía de acuerdo a la región. Se reporta mayor seroprevalencia en la región Caribe y oriental (56.8%-73%), y menor en la región pacífica y central (31.6%-41.7%), mientras que la seroprevalencia en embarazadas varía entre 46.2%-60% (Rosso, Agudelo, Isaza, & Montoya, 2007).

Para el diagnóstico de la toxoplasmosis se han empleado diversas técnicas serológicas y moleculares. Las primeras son las más utilizadas, permiten detectar anticuerpos específicos contra *T. gondii* y posibilitan conocer el estado inmunológico frente a este parásito, mientras que las técnicas moleculares detectan ADN del parásito en diferentes muestras, indicando presencia de *T. gondii* en líquidos y tejidos.

Uno de los primeros estudios realizados en gestantes tuvo lugar en la ciudad de Medellín, utilizando 120 muestras de sueros de embarazadas, las cuales fueron analizadas por la prueba DyeTest y se encontró una tasa de seroconversión alta de 8.3% (Restrepo, Jaramillo, & Kurtzer, 1976). Esta prueba es un método clásico y altamente específico debido a que no se encuentran reacciones cruzadas con otros protozoos o agentes infecciosos, pero presentan algunas desventajas como son su alto costo humano y el peligro de utilizar organismos vivos. Además, necesita un factor accesorio (complemento sérico humano) proveniente de personas sanas. El uso rutinario de esta técnica es limitado y solo se considera como una prueba de referencia (Dubey, 1986).

Gómez utilizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para IgG en una población de 960 gestantes y encontró una tasa de seroconversión baja de 1.7% (Gómez, 2002) frente a la reportada por Restrepo y cols (Restrepo et al., 1976). En otro estudio con una población de 166 gestantes y utilizando la misma técnica, Castro y cols encontraron una incidencia de 0% (Castro, Góngora, & González, 2008). En otra investigación en la ciudad de Armenia en la que se empleó la misma técnica IFI, se encontró una prevalencia de 63% y una incidencia de 1.3% en una población de 896 gestantes (Gómez, Montoya, Castaño, & Rios, 2003).

Otra herramienta importante para el diagnóstico de la enfermedad ha sido la prueba de ELISA. En estudios realizados en el departamento del Quindío con una población de 10780 gestantes en los que se detectó anticuerpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, se encontró una seroprevalencia de 62% y una incidencia de 0.71% (González, Castaño, Jiménez, Barrera, & Gómez, 2004), mientras que en la

ciudad de Armenia fue de 1.1% mediante la detección simultánea de IgM e IgA contra el parásito (Montoya, Gómez-Marín, Ruiz, & Castaño, 2000).

Para mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico mediante la técnica de ELISA, se han implementado variantes del ELISA convencional como por ejemplo el Ensayo de Fluorescencia Ligado a Enzima (ELFA). Ésta técnica ha sido utilizada en estudios realizados en la ciudad de Sincelejo. Uno de ellos encontró una prevalencia de 56% y una incidencia del 2% en gestantes (Machado et al., 2004), mientras que otro reportó seroconversión en 4 de 12 gestantes que fueron positivas por PCR anidada (Blanco, Assia, Montero, & Orozco, 2011).

Numerosas proteínas recombinantes han sido diseñadas y expresadas en *Escherichia coli* y evaluadas por su potencial como antígenos diagnósticos para infecciones por *T. gondii* en humanos. Estos antígenos han demostrado una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos con respecto a los antígenos que emplean las técnicas convencionales. Li y cols., usando los antígenos recombinantes SAG2, P25, GRA7, GRA8 determinaron que estas proteínas por separado o en combinación pueden ser útiles en la detección de infección aguda así como en infección crónica, reportando una sensibilidad y especificidad de 90% y 97% respectivamente (Li, Galvan, et al., 2000). También, en mujeres embarazadas se demostró una alta utilidad del antígeno GRA7 en la detección de casos de seroconversión, ofreciendo un 98.4% de sensibilidad (Aubert et al., 2000; Li, Maine, et al., 2000), seguido del SAG1 con una sensibilidad del 91.6% y una especificidad del 100% para el diagnóstico de infección aguda (Kotresha & Noordin, 2010). Asimismo se ha confirmado la utilidad del antígeno ROP1, mostrando una sensibilidad del 94.6% en la detección de anticuerpos tipo IgG en muestras de pacientes con infección aguda (Nigro et al., 2003).

Estos estudios evidencian la utilidad de los antígenos recombinantes como una herramienta importante para el diagnóstico de la toxoplasmosis y han proporcionado bases para el mejoramiento de las pruebas serológicas. De otro lado, considerando los diversos inconvenientes que presentan los métodos

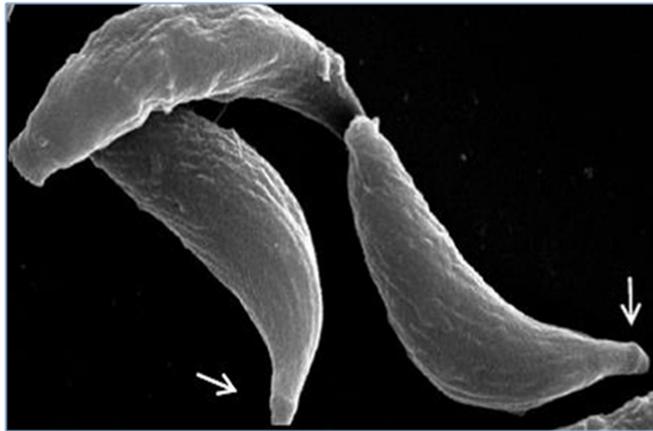
serológicos que emplean antígenos nativos, el uso de proteínas recombinantes purificadas obtenidas mediante biología molecular podrían ser una alternativa para la detección de anticuerpos en suero y facilitarían la estandarización de los inmunoensayos. Además, los antígenos recombinantes podrían ser usados en la creación de nuevas pruebas capaces de diferenciar infecciones adquiridas recientemente de aquellas pasadas. Esto es de suma importancia si se tiene en cuenta que la detección de infección por *T. gondii* con métodos más sensibles y específicos es un punto clave para la prevención y tratamiento de la enfermedad.

## **1.2. MARCO TEÓRICO**

La toxoplasmosis es una de las infecciones parasitarias más frecuentes que afectan a los seres humanos y otros animales de sangre caliente (Luder, Bohne, & Soldati, 2001) y es causada por el parásito *T. gondii* que se comporta como un parásito intracelular obligado. La infección por *T. gondii* se adquiere principalmente por la ingestión de alimentos o agua que estén contaminados con ooquistes o por el consumo de quistes tisulares en carne mal cocida o cruda (Elmore et al., 2010). La infección primaria es generalmente asintomática, pero en algunos pacientes la toxoplasmosis ganglionar o la enfermedad ocular pueden estar presentes. Entretanto, la infección adquirida durante el embarazo así como la reactivación de la enfermedad latente en pacientes inmunocomprometidos pueden causar daños graves e incluso la muerte (Montoya & Liesenfeld, 2004).

### **1.2.1. AGENTE ETIOLÓGICO**

*T. gondii* es un parásito protozooario intracelular obligado del phylum Apicomplexa, nombrado así por el complejo apical de su citoesqueleto (Díaz, Zambrano, Chacón, Rocha, & Díaz, 2010). Fue descubierto por Nicolle y Manceau en 1908 y fue nombrado por su morfología (toxón: arcos; plasma: forma) y el huésped en que fue hallado el *Ctenodactylus gundi* (Dubey, 2008).



**Figura 1. Agente etiológico de la toxoplasmosis. *T. gondii* (taquizoíto) visto al microscopio electrónico mostrando la extrusión del conoide.**

[http://www.microscopy.cz/html/images/5904\\_0\\_f475894d\\_conoidandsecretion.jpg](http://www.microscopy.cz/html/images/5904_0_f475894d_conoidandsecretion.jpg)

#### **1.2.1.1. Clasificación Taxonómica**

*T. gondii* es un protozoo del phylum apicomplexa y único miembro de su género. Este parásito pertenece a: reino: protista; subreino: protozoo; phylum: Apicomplexa; clase: Conoidasida; subclase: Coccidiasina; orden: Eucoccidiorida; suborden: Eimeriorina; familia: Sarcocystidae; subfamilia: Toxoplasmatinae, género: *Toxoplasma*; especie: *Toxoplasma gondii* (Ginorio, 2001; Gómez & Gracia, 2004; Shchwartzmam, 2001; Soulby, 1987).

#### **1.2.1.2. Morfología**

El parásito existe en tres formas infectantes: El ooquiste (que contiene los esporozoítos), el quiste tisular (que contiene los bradizoítos) y el taquizoíto.

#### **El Ooquiste**

Es la forma de resistencia del parásito y son expulsados al exterior con las heces de los gatos. Pueden ser no esporulados y esporulados (Dubey, Lindsay, & Speer, 1998). Los ooquistes no esporulados (no infectantes) son de forma semiesférica a esférica y miden entre 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro (Martín & García, 2003). Bajo condiciones de humedad y temperatura apropiadas, los ooquistes no esporulados pueden convertirse en infectantes entre 1 a 5 días después de su exposición al

medio ambiente (Saravia, 2004). Por otro lado, los ooquistes esporulados (infectantes) son semiesféricos a helicoidales y tienen un diámetro de 11 a 13  $\mu\text{m}$  (Dubey et al., 1998). Estos ooquistes son resistentes a varias condiciones ambientales principalmente suelo húmedo o arena; además también pueden permanecer viables en superficies acuáticas por periodos prolongados (Ramírez, 2005).

### **El Quiste**

Es otra forma de resistencia del parásito al medio exterior (Martín & García, 2003), varían en tamaño de 5-100  $\mu\text{m}$  de diámetro, el más pequeño puede contener dos bradizoítos mientras que los de mayor tamaño pueden contener cientos a miles de bradizoítos (Dubey et al., 1998). Los quistes tisulares en el cerebro son a menudo esferoidales, mientras que los quistes intramusculares son alargados. Aunque los quistes tisulares se pueden desarrollar en los órganos viscerales, como los pulmones, el hígado y los riñones, son más frecuentes en los ojos, tejidos neurales y musculares, incluyendo el cerebro y músculos esquelético y cardíaco (Dubey et al., 1998; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Los bradizoítos son morfológicamente idénticos a los taquizoítos pero se multiplican lentamente, expresan moléculas estado-específicas y son funcionalmente diferentes (Montoya & Liesenfeld, 2004).

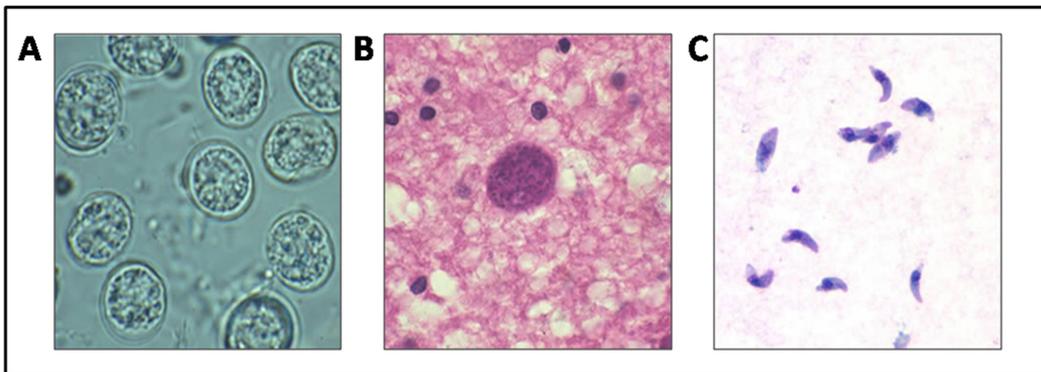
### **El Taquizoíto**

Es el estado de replicación rápida del parásito; es de forma semilunar u ovalada y mide de 2-4  $\mu\text{m}$  de ancho y 4-8  $\mu\text{m}$  de largo (Montoya & Liesenfeld, 2004). Consta de una punta anterior conoidal y un extremo posterior redondeado. Ultraestructuralmente consiste de una cubierta exterior, membrana plasmática, anillos apicales, anillos polares, un conoide, microporos, mitocondria, microtúbulos subpendiculares, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi, ribosomas, núcleo, apicoplasto y gránulos de amilopectina, además de organelos

secretores tales como las roptrias, micronemas y gránulos densos (Dubey et al., 1998).

Una de las principales características del estado taquizoíto es la presencia de una estructura del citoesqueleto altamente especializada llamada complejo apical; este complejo está formado por una serie de anillos polares y el conoide.

El conoide es una estructura altamente dinámica localizada en el polo anterior de los taquizoítos; tiene forma de cono truncado y consta de fibras en forma de espiral, con un diámetro de 400 nm de base y 250 nm de alto (Kim & Weiss, 2004). Esta estructura puede rotar, inclinarse, extenderse y retraerse para adherirse y penetrar a la célula huésped con la ayuda de algunos organelos secretores como las roptrias, micronemas y gránulos densos (Nishi, Hu, Murray, & Roos, 2008).

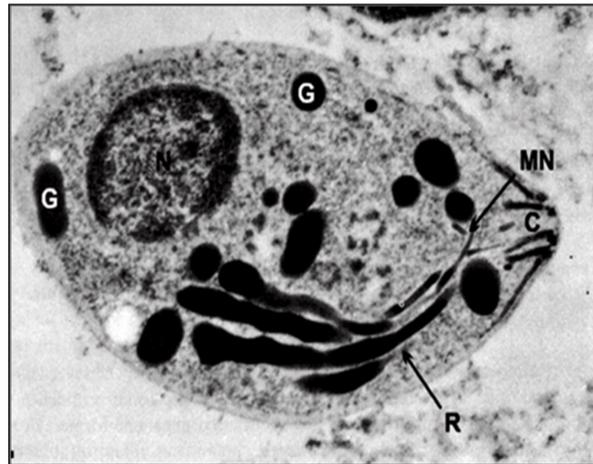


**Figura 2. Estadios de *T. gondii*.** A) Ooquiste de *T. gondii* en flotación fecal. B) Quiste de *T. gondii* en tejido cerebral teñido con hematoxilina y eosina. C) Taquizoítos de *T. gondii*, teñidas con Giemsa, a partir de frotis de líquido peritoneal obtenido de ratón de laboratorio inoculado. <http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/gallery.html>

Las roptrias son organelos en forma de pera, conectados por un cuello delgado al extremo apical o conoide, característico de los estados invasivos del parásito. Pueden variar en número y forma y contienen numerosas enzimas que se liberan durante el proceso de invasión a la célula (Dubremetz, 2007). Estos organelos intervienen específicamente en la formación de la vacuola parasitófora.

Los micronemas son pequeños orgánulos de forma cilíndrica que se encuentra en la periferia del extremo anterior del taquizoíto (Boothroyd & Dubremetz, 2008). Su número varía de acuerdo al estado de desarrollo del parásito; los taquizoítos tienen pocos micronemas, los esporozoítos presentan un número intermedio y los bradizoítos tienen muchos micronemas (Dubey et al., 1998). Este orgánulo está rodeado por una unidad de membrana típica y presenta una matriz densa debido a su gran contenido de proteínas que son segregadas en los procesos de reconocimiento, adhesión y unión a la célula huésped (Souza, 2006).

Los gránulos densos son orgánulos esféricos distribuidos por toda la célula, con un diámetro medio de 0.2  $\mu\text{m}$ . Su matriz es uniformemente densa de electrones debido a la alta concentración de proteínas (Souza, 2006). Estos cuerpos densos están presentes en mayor número en esporozoítos y taquizoítos que en bradizoítos (Dubey et al., 1998). En contraste con la secreción de micronemas y roptrias que tiene lugar en la región apical, la secreción de gránulos densos se produce en las regiones laterales del parásito. Las proteínas secretadas por estos organelos se asocian con la formación de la vacuola parasitófora y la red membranosa intravacuolar (Souza, 2006).



**Figura 3. Órganos secretores.** Microscopía electrónica de transmisión de un taquizoíto de *T. gondii* sometidos a la técnica de ácido fosfotúngstico etanólico, que tiñe estructuras que contienen proteínas básicas. El núcleo (N), tinción de los gránulos densos (G), Roptrias (R), Micronemas (M) y el conoide (C) son observados. Bar, 0.3  $\mu\text{m}$ .  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000137652006000200008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000137652006000200008)

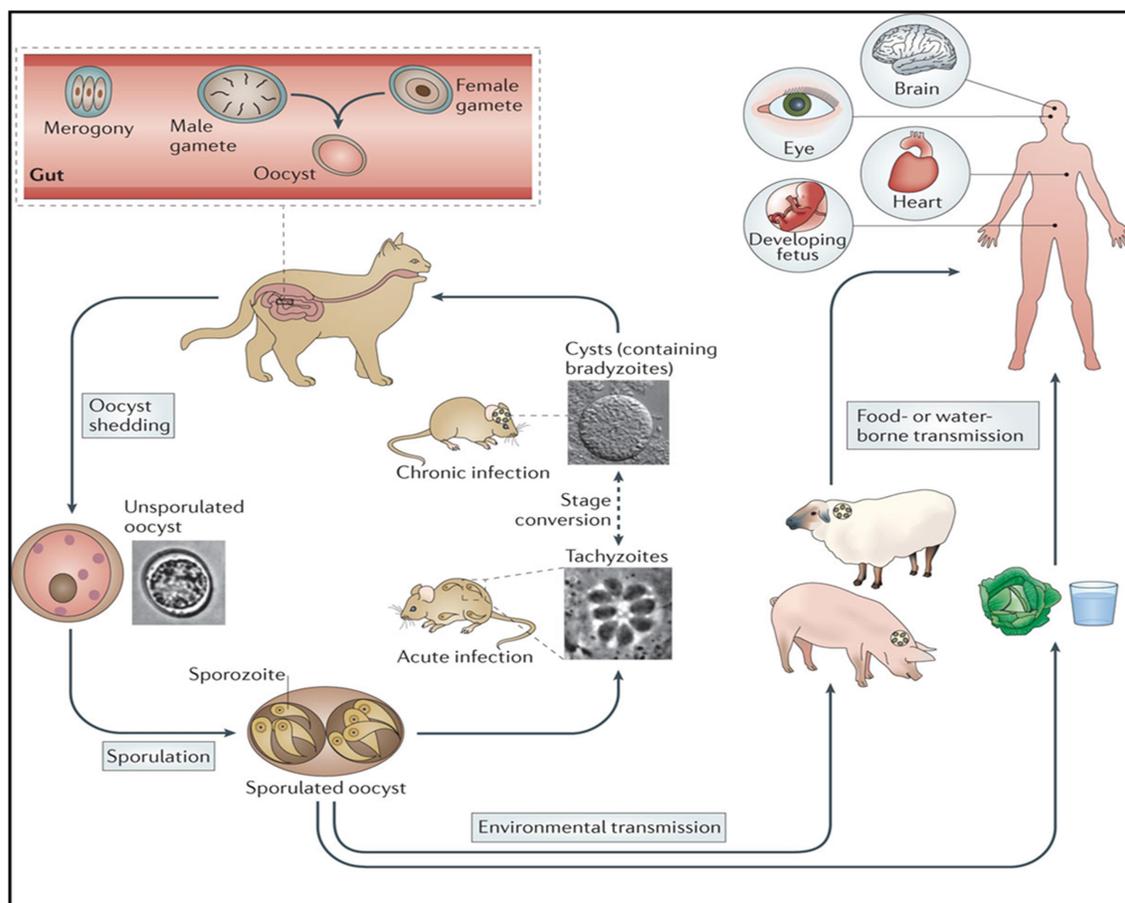
### 1.2.1.3. Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *T. gondii* incluye una fase sexual o esporogónica (también denominada entero-epitelial) en el huésped definitivo (felinos) y una fase asexual o esquizogónica (llamada también extra-intestinal) en el huésped intermediario (mamíferos y aves). Todos los huéspedes, incluyendo humanos, pueden ser infectados por tres estadios diferentes del ciclo de vida: los taquizoítos, procedentes de tejidos de animales con toxoplasmosis aguda; los bradizoítos contenido en quistes tisulares de tejidos de animales con toxoplasmosis crónica; y los esporozoítos, contenidos en los ooquistes esporulados que pueden encontrarse en agua o alimentos contaminados con heces de gato (EFSA, 2007).

La fase sexual se lleva a cabo en el intestino del huésped definitivo, luego que el gato doméstico o algún otro miembro de la familia felidae ingieren cualquiera de los estadios infectivos del parásito. De todos estos estadios, la ingestión de quistes tisulares (bradizoítos) es considerada la forma de infección más común en el huésped definitivo (Saravia, 2004). Una vez los quistes tisulares son ingeridos, sus paredes son disueltas por las enzimas proteolíticas del estómago e intestino delgado y los bradizoítos son liberados, luego estos penetran las células del epitelio intestinal e inician los cinco tipos de estadios multiplicativos (A,B,C,D,E) (Ortega, 2003). Después de un número indeterminado de generaciones (esquizogonias), los merozoítos liberados del tipo D o E penetran en nuevas células y forman microgamontes (masculinos) y macrogamontes (femeninos); luego estos se dividen y forman los micro y macrogametos. Los microgametos nadan hasta penetrar en un macrogameto maduro y fecundarlo. Después de la fecundación se forma el cigoto y una pared alrededor de este para constituir un ooquiste (Saravia, 2004). Cuando los ooquistes están maduros, se produce la ruptura de las células epiteliales que los contienen y son liberados a la luz del intestino. Posteriormente los ooquistes son eliminados con las heces al medio, donde esporulan bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas.

La fase asexual, puede desarrollarse en un amplio rango de animales de sangre caliente incluyendo a los felinos, y puede iniciarse por la forma de taquizoítos o

tras la ingestión de quistes tisulares y ooquistes, siendo esta última la forma más común de infección en los huéspedes intermediarios (Saravia, 2004). Después de la ingestión de ooquistes esporulados, éstos son digeridos, dejando libre los esporozoítos en el lumen del intestino delgado. Luego penetran en las células intestinales y se dividen en dos por un proceso asexual conocido como endodiogenia y se convierten en taquizoítos (Ramírez, 2005), la forma móvil e invasiva que atraviesa el epitelio intestinal, diseminándose a través de todo el organismo, lo que corresponde a la forma aguda de la infección (Muñiz & Mondragón, 2009). Posteriormente, se produce una segunda esquizogonia o reproducción lenta de bradizoítos dentro de quistes tisulares en células del sistema nervioso y muscular (mediante endodiogenia), que corresponde a la fase crónica de la infección (Ramírez, 2005).



**Figura 4. Ciclo de vida.** La replicación de merozoítos dentro de enterocitos ocurre en el intestino del gato (merogonia), los gametos macho y hembra de *T. gondii* son formados dentro de la célula huésped. La fusión de gametos lleva a la formación de ooquistes que son expulsados con las heces de los gatos y hacen meiosis en el ambiente para producir ocho esporozoítos haploides como progenie. La replicación asexual ocurre en el huésped intermediario (se muestra aquí como roedores). La infección aguda es caracterizada por taquizoítos (formas de replicación rápida) que se disemina por todo el cuerpo. La diferenciación a bradizoítos de crecimiento lento dentro de quistes tisulares lleva a largo plazo a infección crónica. La ingestión de quistes tisulares a través de la alimentación omnívora y carnívora puede llevar a la transmisión a cualquier otro huésped intermediario o gatos, reiniciando la fase sexual del ciclo de vida. Los ooquistes pueden contaminar alimentos y agua, proporcionando una ruta de infección para huésped intermediarios. Los humanos se infectan por comer carne poco cocida que contiene quistes tisulares o por ingestión de ooquistes esporulados en agua contaminada. La toxoplasmosis puede causar serios síntomas en el cerebro y otros órganos en pacientes inmunodeprimidos, así como en fetos en desarrollo siguiendo la infección congénita.

[http://www.nature.com/nrmicro/journal/v10/n11/fig\\_tab/nrmicro2858\\_F1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v10/n11/fig_tab/nrmicro2858_F1.html)

### 1.2.2. GENÉTICA

El genoma de *T. gondii* consiste de tres componentes de DNA, localizados en el núcleo, el apicoplasto y la mitocondria. El genoma nuclear es haploide en la mayoría del ciclo de vida del parásito, a excepción de una breve fase diploide en el intestino del gato antes de la meiosis. El genoma nuclear presenta un tamaño de aproximadamente 87 Mb mientras que el genoma mitocondrial tiene un tamaño de 6 Kb y el plastídico de 35 Kb. El genoma consiste de 11 cromosomas (Ib, Ia, II - X), y el rango en tamaño es de aproximadamente 1.8 Mb a >10 Mb (Ajioka, Fitzpatrick, & Reitter, 2001; Kissinger, Gajria, Li, Paulsen, & Roos, 2003).

*T. gondii* tiene tres principales linajes clonales altamente prevalentes en Europa, África y Norte América y se denominan como tipos I, II, y III basados en análisis de Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). El tipo I es altamente virulento en ratones, mientras que el tipo II y III son menos virulentos (Sun et al., 2013). La mayoría de las infecciones humanas que han sido estudiadas en Norte América y Europa son causadas por cepas de tipo II, las cuales se han encontrado principalmente en aislados de pacientes con Sida y en mujeres embarazadas junto con la cepa tipo I. Entretanto, las cepas aisladas de animales son principalmente tipo III, aunque también son comunes las cepas tipo II

en animales agrícolas de estas regiones (Montoya & Liesenfeld, 2004; Sibley, Khan, Ajioka, & Rosenthal, 2009).

Estudios recientes han revelado que las cepas de Suramérica son más diversas genéticamente y comprenden distintos genotipos. Un pequeño número (<5 %) de los aislados contienen diferentes combinaciones de los mismos alelos observados en los tipos clonales, lo cual indica que la recombinación ocurre con poca frecuencia en estado silvestre (Khan et al., 2006). Estas diferencias han sido dadas por la recombinación sexual poco frecuente, los barridos de población y la biogeografía (Sibley et al., 2009). Estos "nuevos" genotipos, o genotipos recién descubiertos, fueron designados como atípicos, exóticos, recombinantes, o genotipos no arquetípicos. La descripción de estos genotipos atípicos ofrece nuevas perspectivas en el análisis de los determinantes de virulencia (Darde, 2008).

### **1.2.3. PRINCIPALES PROTEÍNAS DE *T. gondii***

Las organelas secretoras micronemas, roptrias y gránulos densos de *T. gondii* secretan proteínas características tales como proteínas de los micronemas (MICs), proteínas de las roptrias (ROPs) y proteínas de los gránulos densos (GRAs). Además, *T. gondii* también presenta proteínas de superficie (SAG) y proteínas de la matriz (MAG), que junto con las demás proteínas intervienen en procesos vitales para la supervivencia del parásito.

#### **1.2.3.1. Proteínas de los Micronemas**

Las proteínas de los micronemas están involucradas en el reconocimiento y adhesión a la célula huésped a través de la unión a receptores específicos y posiblemente también están relacionadas con la movilidad del parásito, estas proteínas incluyen MIC1, MIC2, MIC3, MIC4, MIC5, MIC6 (Holec, Gasior, Brillowska-Dabrowska, & Kur, 2008). Algunas de ellas pueden actuar como adhesinas y otras como proteínas chaperonas (Meissner et al., 2002). Contienen dominios estructurales que están morfológicamente y funcionalmente conservadas

a nivel molecular (Soldati, Dubremetz, & Lebrun, 2001). Estos dominios se pueden unir a trombospodina, lo cual está probablemente relacionado con la unión a glicoconjugados sulfatados que se encuentran en las superficies celulares, y son altamente variables, confiriendo especificidad de unión a las células hospederas (Dubremetz, Garcia-Reguet, Conseil, & Fourmaux, 1998). Las proteínas de los micronemas también presentan dominios de unión a integrinas para unirse a proteínas de la matriz extracelular como laminina y colágeno; además poseen dominios de unión a lectina (Carruthers & Tomley, 2008).

### **1.2.3.2. Proteínas de las Roptrias**

Las proteínas de las roptrias son consideradas los principales factores de virulencia de *T. gondii*. Se localizan en diferentes partes de la célula y pueden afectar la membrana, estructura del citoesqueleto y factores activos de la célula huésped con el fin de bloquear los mecanismos celulares de defensa, permitiendo que *T. gondii* invada, parasite y prolifere con éxito en la célula (Zhao, Yin, & K, 2014). Las proteínas de las roptrias comprenden dos diferentes subestructuras. De 29 de estas proteínas que han sido bien estudiadas, 24 están presentes en el bulbo de las roptrias y son denominadas proteínas ROP, mientras que 5 están presentes en el cuello de las roptrias y son llamadas proteínas RON (Boothroyd & Dubremetz, 2008). Las proteínas RON junto con las proteínas MICs se ensamblan sobre la superficie del parásito para formar los movimientos de unión, los cuales intervienen en la formación de la vacuola parasitófora y su membrana (Alexander, Mital, Ward, Bradley, & Boothroyd, 2005), mientras que las proteínas ROP son inyectadas dentro de la célula huésped (Carey, Jongco, Kim, & Ward, 2004).

Una de las proteínas característica de las roptrias es la proteína ROP1, de 66 kDa. La secuencia aminoacídica de esta proteína presenta una inusual carga asimétrica con un dominio amino-terminal altamente ácido, rico en prolina y un dominio carboxi-terminal básico (Joiner & Dubremetz, 1993). ROP1 ha sido asociada molecularmente con una actividad que potencia la invasión in vitro a la célula. Esta proteína es expresada en taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos (Eslamirad, Dalimi, Ghaffarifar, & Sharifi, 2008). Estudios en la ultraestructura de ROP1 han

demostrado que la proteína madura es liberada en la vacuola parasitófora naciente durante las primeras etapas de invasión a la célula huésped, luego se localiza en el perímetro de la vacuola, para más tarde desaparecer dentro de las primeras horas después de la invasión (Soldati, Lassen, Dubremetz, & Boothroyd, 1998).

### **1.2.3.3. Proteínas de los Gránulos Densos**

Las proteínas de los gránulos densos (GRA) son liberadas durante y después de la invasión dentro de la vacuola parasitófora; además intervienen en la modificación del medio de la vacuola para la supervivencia y replicación del parásito (Nam, 2009). Estas proteínas interactúan con una variedad de proteínas de la célula huésped tales como enzimas, proteínas funcionales y estructurales. Hasta ahora han sido descubiertas 14 proteínas de los gránulos densos (GRA1- GRA14) que previamente han sido identificadas en taquizoítos de *T. gondii* y no presentan homología de secuencias entre sí. De estas, 12 proteínas han sido bien estudiadas (GRA1- GRA10, GRA12 y GRA14), mientras que las proteínas GRA11 y GRA13 hasta ahora se desconoce su función. Además, también hacen parte de este grupo de proteínas dos isoformas de nucleotidotriposfato (NTPasa I y II) y dos inhibidores de proteasa (TgPI1 y 2) (Ahn, Kim, Kim, & Nam, 2006; Nam, 2009).

La mayoría de las proteínas GRA han sido detectadas en una estrecha asociación con el sistema de membrana. Por ejemplo las proteínas GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7, GRA8, GRA9 y el grupo de NTPasas han sido asociadas específicamente con las membranas de la red vacuolar. En estas membranas las proteínas como GRA2, GRA4 y GRA6 intervienen en la formación de un complejo multimérico de proteínas; mientras que GRA3, GRA5 y GRA10 han sido detectadas como proteínas asociadas a la membrana de la vacuola parasitófora (Ahn et al., 2006).

La proteína GRA7, con un peso molecular de 29 kDa, contiene una secuencia señal y dos dominios hidrofóbicos de 15 aminoácidos y 29 aminoácidos en el extremo C-terminal. El dominio hidrofóbico más grande tiene un alto grado de

carácter helicoidal que le permite a la proteína anclarse a la membrana de la vacuola parasitófora (Bonhomme et al., 1998), por lo que se considera a GRA7 como una proteína asociada exclusivamente a membrana tanto en el parásito como en las células del huésped (Neudeck et al., 2002).

Después de la invasión a la célula huésped, GRA7 es secretada dentro de la red vacuolar, la membrana de la vacuola parasitófora y dentro de extensiones sobresalientes en el citoplasma (Nam, 2009).

Esta proteína, a diferencia de otras proteínas GRA, se expresa en todos los estadios infecciosos de *T. gondii* (Dunn, Ravindran, Kim, & Boothroyd, 2008), se acumula dentro de la vacuola parasitófora y se localiza en su membrana en células infectadas con taquizoítos, mientras que en células infectadas con bradizoítos está presente dentro del citoplasma de la célula huésped (Nam, 2009).

#### **1.2.3.4. Proteínas de Superficie**

Otras de las proteínas que intervienen en procesos vitales de *T. gondii* son las proteínas de superficie, las cuales son miembros de una familia de genes con estructura similar a SAG1. Este grupo es conocido como la superfamilia de genes SRS (Secuencias Relacionadas con SAG1), que codifican proteínas de superficie ancladas a GPI (glycosifosfatidilinositol); intervienen en la adhesión a la célula y activan la inmunidad del huésped para regular la virulencia del parásito (Jung, Lee, & Grigg, 2004; Weiss & Kim, 2007). Actualmente el tamaño exacto del grupo de genes SRS y su diversidad genética no se conoce y solo se han sido identificados 21 genes SRS (Jung et al., 2004).

La mayoría de las proteínas SRS se expresan de una manera etapa específica, entre las que se encuentran SAG1, SAG2A, SAG2B, SAG3, SRS1, SRS2 y SRS3, las cuales son expresadas principalmente sobre la superficie de taquizoítos (Cong et al., 2013). Un ejemplo de esta familia de proteínas es el antígeno de superficie 1 (SAG1), que tiene un peso molecular de 30 kDa, es la más abundante y se expresa principalmente sobre la superficie intra y extracelular del estado taquizoito

(Selseleh, Keshavarz, Mohebal, Shojaee, Modarressi, et al., 2012). La proteína SAG1 es altamente conservada en la mayoría de cepas aisladas de *T. gondii* y es uno de los antígenos más inmunogénicos (Kim & Boothroyd, 2005; Kotresha & Noordin, 2010).

La estructura de la proteína SAG1 muestra una configuración homodimérica paralela de dos monómeros en forma de pesa. Los dos dominios de cada monómero tiene un tamaño similar, el dominio N-terminal consiste de 130 aminoácidos y el dominio C-terminal comprende 120 aminoácidos. Los pliegues de los monómeros están compuestos en su totalidad por sándwiches de hojas-  $\beta$  y bucles reticulados por tres enlaces disulfuro (He, Grigg, Boothroyd, & Garcia, 2002). SAG1 ha sido una proteína muy estudiada debido a que se encuentra entre las primeras que interactúan con la célula huésped y está primeramente implicada en la adhesión, la transducción de señales, la invasión, el transporte de material y respuestas inmunes del huésped (Wang & Yin, 2014).

#### **1.2.4. EPIDEMIOLOGÍA**

La toxoplasmosis es una zoonosis mundialmente distribuida (Rosso et al., 2007). Afecta humanos y más de 300 especies de mamíferos domésticos y salvajes, además de 30 especies de aves de corral y silvestres (Jacome, 2007). Se estima que entre el 30% a 40% de la población humana mundial se encuentra infectada por *T. gondii* (Muñiz & Mondragón, 2009), en donde los principalmente afectados son mujeres embarazadas, personas infectadas y portadoras del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Jacome, 2007; Muñiz & Mondragón, 2009). Sin embargo, estudios a nivel mundial han mostrado una variación en cuanto a la prevalencia e incidencia de la enfermedad, lo cual se ha relacionado con las diferentes condiciones geográficas, hábitos alimenticios y condiciones higiénico sanitarias (Rosso et al., 2007). Las prevalencias encontradas en la población en general son: en África entre 22.9%-75.2%, en Europa 38%-71%, Asia 0.8%-55.4% y América 22.5%-75% (Díaz et al., 2010). En los países desarrollados se estima que la seroprevalencia de la toxoplasmosis en mujeres embarazadas y en edad

fértil está entre 4-100% y la incidencia varía desde 1 hasta 310 por cada 10000 embarazadas en Europa, Asia y América (Njunda et al., 2011).

Las diferentes tasas de prevalencia de toxoplasmosis reportadas entre regiones geográficas parecen relacionarse con diversos factores. El tipo de alimento, bajos niveles educativos y la calidad del agua de consumo han sido fuertemente correlacionadas con la alta prevalencia de toxoplasmosis en India (Singh, Munawwar, Rao, Mehta, & Hazarika, 2014). En el Reino Unido, la presencia de gatos y el consumo de carne cruda o poco cocida se relacionaron significativamente con la alta seroprevalencia de *T. gondii* en mujeres embarazadas (Nash, Chissel, Jones, Warburton, & Verlander, 2005). Mientras tanto, en los Países Bajos se determinaron como los principales factores de riesgo para la ocurrencia de toxoplasmosis el consumo de vegetales crudos sin lavar y la cría y mantenimiento de ganado vacuno por periodos de 5 años (Hofhuis et al., 2011). En Sudán (África) y en Taiwán (Asia), la asistencia durante partos de animales, la presencia de gatos domésticos, el consumo de carne y almejas crudas, y el consumo de alimentos preparados en restaurantes constituyen los factores de riesgo más importantes para la infección con *T. gondii* (Chiang et al., 2014; Mohamed, Kodym, Maly, & Rayah, 2014). En Estados Unidos, los principales factores condicionantes de la ocurrencia de toxoplasmosis son, al igual que en otros países, el consumo de alimentos crudos o poco cocidos y la presencia de gatos en los domicilios (Jones et al., 2009). En contraste, en Brasil la variable correlacionada con la ocurrencia de toxoplasmosis fue bajas condiciones socioeconómicas. En este sentido, la ruta oral constituye el mecanismo más importante de transmisión. Además, los hábitos higiénicos de las personas y el contacto constante con animales juegan un papel fundamental en la transmisión de las infecciones por *T. gondii* en cada zona geográfica (Carellos et al., 2014).

En Colombia, de acuerdo con el Estudio Nacional de Salud realizado entre 1977 y 1980, la tasa de seroprevalencia observada en mujeres en edad fértil varió entre 42.5% y 54.4% (Rosso et al., 2007). Esta seroprevalencia tuvo una distribución desigual en las diferentes regiones del país. En la regiones Atlántica y Oriental se

reportó un rango de prevalencia de 56.8%-73% y 57.7%-66.2%, respectivamente. En contraste, en la región Pacífica la prevalencia estuvo entre 33%-37.6% y en el interior del país estuvo entre 31.6%-41.7% (Rosso et al., 2007).

En otros estudios se han reportado diferentes tasas de seroprevalencia en embarazadas en el país: en Quindío 60% (Gómez, Montoya, & Castaño, 1997), Valledupar 58% (Jacome, 2007), Yopal 77% (Eslava, Houghton, Serrano, & Riaño, 2011), Bogotá 47% (Eslava et al., 2011), Villavicencio 52.5% (Castro et al., 2008), Calarcá 63%, Cali 45.8% (Eslava et al., 2011) y Sincelejo 56% (Machado et al., 2004). Estos hallazgos constituyen evidencia de una constante transmisión del parásito en el país que ha sido invariable durante los años y que a diferencia de otros países, no hay pruebas de descenso en la prevalencia. Además, investigaciones previas sugieren que las variables consumo de carne mal cocida, exposición a animales, manipulación de tierra, consumo de bebidas hechas con agua sin hervir y el contacto con gatos menores de 6 meses son los factores de riesgos más fuertemente relacionados a la infección por *T. gondii* en el país (Lopez-Castillo, Diaz-Ramirez, & Gomez-Marin, 2005; Montealegre, Valbuena, Cortes, & Flórez, 2008).

#### **1.2.4.1. Vías de Transmisión de *T. gondii***

La entrada del parásito *T. gondii* al organismo se da principalmente por dos vías de transmisión: la vía congénita o transplacentaria, y la vía oral (carnivorismo, transmisión acuática de ooquistes). No obstante, existen formas alternativas de transmisión del parásito, como son: la transmisión transfusional y por trasplantes, transmisión por las vías respiratorias, transmisión mucosa y transmisión cutánea que son menos comunes (Sobral, Amendoeira, Teva, Patel, & Klein, 2005).

#### **Transmisión Congénita o Transplacentaria**

La infección congénita por *T. gondii* en niños fue descrita inicialmente por Wolf et al. (Wolf, Cowen, & Paige, 1939; Wolf, Cowen, & Paige, 1939) y más tarde se encontró que también se producen en muchas especies de animales,

especialmente ovejas, cabras y roedores (Weiss & Kim, 2007). Este mecanismo de transmisión, consiste en la invasión de taquizoítos al embrión o feto a través de la barrera transplacentaria durante la fase de parasitemia materna. Está aceptado que esta transmisión sólo tiene lugar durante la primo infección en las gestantes no inmunocompetentes (Salvia, Álvarez, Bosch, & Goncé, 2008) y por consiguiente, no ocurre en mujeres con toxoplasmosis crónica (Thiermann, Mufioz, Lorca, & Atias, 1985). Además, en la medida en que la infección ocurra al principio de la gestación, menor será el riesgo de transmisión fetal (10%-20% en el primer trimestre, 25%-30% en el segundo y 60%-80% en el tercero). Sin embargo, las consecuencias para el feto serán más graves si la infección sucede al comienzo del embarazo que si se trasmite en fases tardías (Salvia et al., 2008).

### **Transmisión Oral**

Existe evidencia de infección generalizada por *T. gondii* en vegetarianos y herbívoros que no puede ser explicada por transmisión congénita, lo que sugiere la vía oral como vía de transmisión (Weiss & Kim, 2007). Estos casos han sido explicados a través de la ingestión de ooquistes esporulados durante el consumo de vegetales crudos sin lavar que han estado en contacto con heces de gatos infectados (Jeffrey, Kravetz, Daniel, & Federman, 2005; Sonar & Brahmhatt, 2010). Estos hallazgos han sido apoyados por un estudio en India en el que se encontró mayor seroprevalencia para *T. gondii* en vegetarianos estrictos con respecto a consumidores de carne, debido a la poca higiene en la manipulación de alimentos (Hutchison, 1965; Rawal, 1959).

Al igual que la transmisión congénita, el carnivorismo o consumo de carne, constituye un importante mecanismo de infección con *T. gondii* en humanos y otras especies animales (Ortega, 2003). En humanos, el consumo de carne poco cocida e incluso el consumo de carne cruda en algunos grupos poblacionales, ha sido correlacionado con la infección por *T. gondii* en diferentes zonas geográficas del planeta (Chiang et al., 2014; Mohamed et al., 2014; Ortega, 2003; Weinman & Chandler, 1954). Esto es debido a que en la carne pueden encontrarse quistes tisulares cuyas paredes son fácilmente degradadas por las enzimas proteolíticas

del huésped, liberando bradizoítos que se muestran resistentes a la acción proteolítica, y en consecuencia pueden infectar al huésped (Dubey et al., 2005; Jacobs, Remington, & Melton, 1960; Sullivan & Jeffers, 2012; Weiss & Kim, 2007).

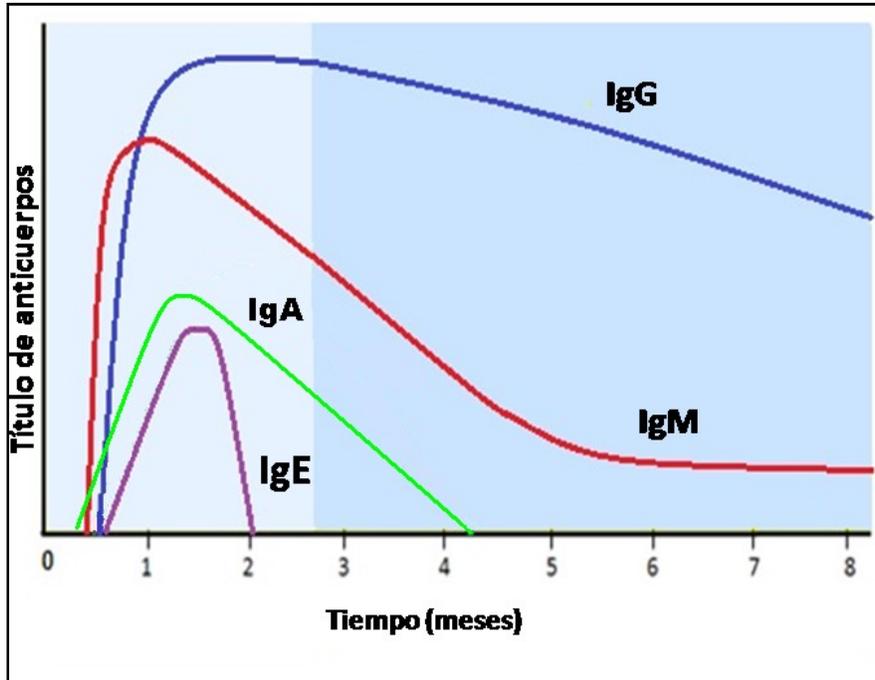
Por otro lado, el contagio por *T. gondii* mediante el consumo de agua fue durante muchos años considerada poco frecuente. Sin embargo, recientemente ha explicado adecuadamente muchos casos de toxoplasmosis (De Moura et al., 2006; Dubey, 2004). Se ha planteado la existencia de un ciclo de *T. gondii* entre felinos y otros animales y la excreción de ooquistes en cuerpos de agua que constituyen fuentes principales de abastecimiento en diversas poblaciones, convirtiéndose éstos en una importante fuente de infección (Aramini et al., 1999; Sroka, Wojcik-Fatla, & Dutkiewicz, 2006). Adicionalmente, varios estudios han demostrado la viabilidad de los ooquistes de *T. gondii* en agua luego de tratamientos físicos y químico como el hipoclorito de sodio y el ozono (Shapiro et al., 2010; Wainwright et al., 2007). Por lo tanto es posible que inclusive el agua de consumo en las ciudades sea un medio eficaz para la transmisión de la enfermedad.

### **Vías Alternas de Transmisión**

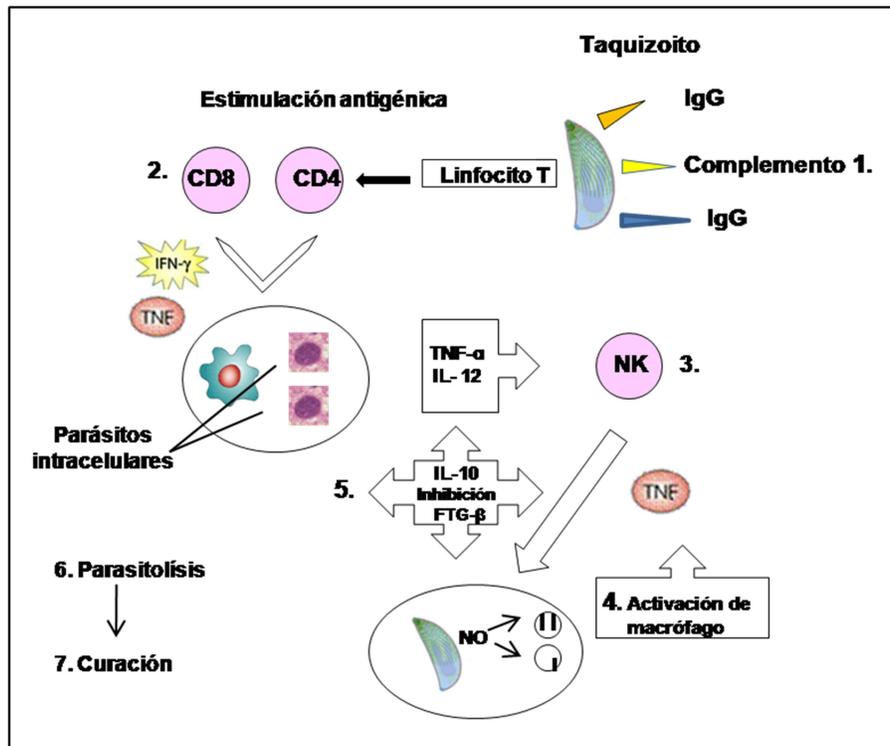
Dentro de estas vías, la transmisión transfusional y por trasplantes son las más comunes. En pacientes trasplantados, el estado de inmunosupresión característico favorece la enfermedad crónica por *T. gondii* (Elhence, Agarwal, Prasad, & Chaudhary, 2010; Wreghitt et al., 1989). Desde hace algunos años, las transfusiones y trasplante de órganos como el corazón y riñones han explicado la toxoplasmosis en algunos grupos poblacionales (Moreno, Pérez-Oliva, Mármol, & Gámez, 1999; Payá, Noemí, Tassara, Catalán, & Aviles, 2012; Siegel et al., 1971). La reactivación de bradizoítos presentes en los órganos donados explica la ocurrencia de la parasitosis cuando el receptor no ha tenido contacto previo con el parásito (García de la Fuente et al., 2010; Osthoff et al., 2013). De igual forma, en receptores seropositivos previo al trasplante, la reactivación de la toxoplasmosis se relaciona con las dosis de inmunosupresores post-trasplante (Wreghitt et al., 1989).

### 1.2.5. RESPUESTA INMUNE

En pacientes inmunocompetentes, la infección aguda con *Toxoplasma* activa una cascada de respuestas inmunes protectoras. El parásito entra al hospedero a nivel de la mucosa intestinal y evoca la producción de anticuerpos de tipo IgA, que constituye más del 80% del total de anticuerpos en mucosa y ha mostrado ser un importante modulador de la protección e indicador de la infección (Chardes & Bout, 1993; Dunay & Sibley, 2010). Si el parásito evade la respuesta inmune en la mucosa, se activan la inmunidad humoral y celular. Durante la respuesta humoral en la infección por *Toxoplasma*, el parásito induce rápidamente niveles detectables de anticuerpos tipo IgM e IgG en suero. La evolución más frecuente ocurre con niveles elevados de IgM que se positivizan a partir de la primera semana, alcanzando la máxima concentración al mes para luego desaparecer después de varios meses. Los anticuerpos tipo IgG se elevan a partir de los 12 a 14 días, alcanzando el pico máximo alrededor de 2 a 3 meses y pueden ser persistentes durante 6 a 12 meses para después disminuir lentamente. En respuestas prolongadas se presentan títulos muy elevados de IgG durante años, acompañados o no de IgM (Jenum & Stray-Pedersen, 1998; Pizzi, 1997). De otro lado, en el desarrollo de la respuesta inmune celular, la subpoblación celular Th1 es primordial para controlar la infección por *T. gondii* debido a la producción de citocinas proinflamatorias que incluyen IL-12, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Durante la fase inicial de la infección, los neutrófilos, macrófagos y linfocitos NK constituyen la principal respuesta del hospedero, mediante la fagocitosis, toxicidad celular y la producción de IFN $\gamma$  por las NK. Entretanto, la patogenia de la enfermedad se asocia a una replicación no limitada y a una continua destrucción de células parasitadas (LaRosa et al., 2008).



**Figura 5. Respuesta inmune humoral.** Los anticuerpos IgA aparecen alrededor de las dos semanas, su vida media está entre los cinco días y una semana. Los niveles de IgM se positivizan a partir de la primera semana, su vida media es parecida a la de la IgA y luego los títulos desaparecen después de varios meses. Por otra parte los anticuerpos IgG aparecen una o dos semanas (primoinfección), su máximo nivel ocurre dentro del segundo o tercer mes. Martín I, et al. Toxoplasmosis en el hombre. Bioquímica. 2003.



**Figura 6. Respuesta inmune celular.** La principal respuesta del hospedero durante la fase inicial de la infección constituye los neutrófilos, macrófagos y NK, mediante la fagocitosis, toxicidad celular y la producción de IFN-g por las NK. Los macrófago y células dendríticas presentan los antígenos a las células CD4+ y CD8+, provocando una respuesta de tipo Th1 mediante la secreción de IL-12. El TNF-  $\alpha$  y el óxido nítrico producidos por los macrófagos incrementa la destrucción del parásito. David F, et al. T Cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma*. PNAS, 2008.

## 1.2.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las principales categorías de la infección por *T. gondii* son: toxoplasmosis adquirida en individuos inmunocompetentes, toxoplasmosis congénita, toxoplasmosis ocular y toxoplasmosis cerebral (Halonen & Weiss, 2013).

### 1.2.6.1. Toxoplasmosis Adquirida en Inmunocompetentes

La mayoría de las infecciones por *T. gondii* en personas inmunocompetentes cursan de forma asintomática (Flegr, Prandota, Sovickova, & Israili, 2014) y solo alrededor del 20% manifiestan alguna sintomatología que incluye fiebre o adenopatías cervicales, mesentéricas, axilares, inguinales, y retroperitoneales, en ocasiones asociadas con mialgia, astenia u otros signos clínicos no específicos

(Halonen & Weiss, 2013; Robert-Gangneux & Darde, 2012). La linfadenopatía y astenia pueden manifestarse durante varias semanas, desarrollándose de forma similar a la mononucleosis infecciosa (Robert-Gangneux & Darde, 2012). Aunque se ha demostrado que en inmunocompetentes la infección es benigna y autolimitada, en la actualidad se reconoce que la gravedad de ésta puede depender del genotipo de la cepa (Robert-Gangneux & Darde, 2012) e involucrar infecciones graves o letales que pueden adoptar la forma de neumonitis, miocarditis, meningoencefalitis o polimiositis en sujetos inmunocompetentes (Canon-Franco, Lopez-Orozco, Gomez-Marin, & Dubey, 2014; Pino, Salinas, & López, 2009; Weiss & Dubey, 2009). En soporte de lo anterior, se ha reportado que la gravedad de las infecciones por *T. gondii* es baja en Europa Occidental y Norte América, donde predominan las cepas tipo II (Howe & Sibley, 1995), y es mucho mayor en regiones donde circulan otros genotipos, como América del Sur y África (Carme et al., 2002; Demar et al., 2007; Mercier et al., 2010).

#### **1.2.6.2. Toxoplasmosis Congénita**

La toxoplasmosis congénita es el resultado de una infección primaria por *T. gondii* durante el embarazo, en la que los taquizoítos atraviesan la placenta (transmisión vertical) e infectan el feto ( Montoya & Remington, 2008). En casos poco frecuentes, la transmisión congénita se produce en mujeres con infección crónica que se ha reactivado como consecuencia de un estado inmunodeprimido causado por VIH o por tratamiento con corticoides (Montoya & Remington, 2008).

La gravedad de la enfermedad depende principalmente de la edad gestacional en el momento de la transmisión (Sarkari & Abdolahi Khabisi, 2015). La infección temprana se ha asociado con la muerte del feto, el aborto espontáneo, y la prematuridad (Wellness, 2011). En el feto, la multiplicación del parásito durante el primer trimestre favorece la aparición de focos de necrosis y fuerte inflamación, lo que lleva a las principales anomalías en el tejido cerebral y ojos. Las principales secuelas incluyen retraso mental, convulsiones, microcefalia, hidrocefalia, sordera y deficiencia psicomotora (Jones, Alexander, & Roberts, 2006; Oz, 2014; Sarkari & Abdolahi Khabisi, 2015; Wellness, 2011). No obstante, las lesiones oculares

también son graves en el embarazo temprano, donde se pueden desarrollar microftalmia, cataratas, aumento de la presión intraocular, estrabismo, neuritis óptica, coriorretinitis y necrosis de la retina (Halonen & Weiss, 2013; Oz, 2014; Sarkari & Abdolahi Khabisi, 2015; Wellness, 2011).

Durante el segundo trimestre la infección fetal puede ser de gravedad variable y causar hepatoesplenomegalia y calcificaciones cerebrales. Las manifestaciones clínicas al nacer pueden incluir epilepsia, anemia, petequias, trombocitopenia, erupción cutánea, trastornos hepáticos, neumonitis o retinocoroiditis (Oz, 2014). En contraste con lo que ocurre en los dos primeros trimestres, en el tercero la infección cursa generalmente de forma asintomática, el individuo nace anatómica y fisiológicamente normal; sin embargo, puede desarrollarse retinocoroiditis y otras afecciones más tarde en la vida (Halonen & Weiss, 2013; Oz, 2014; Robert-Gangneux & Darde, 2012).

### **1.2.6.3. Toxoplasmosis Ocular**

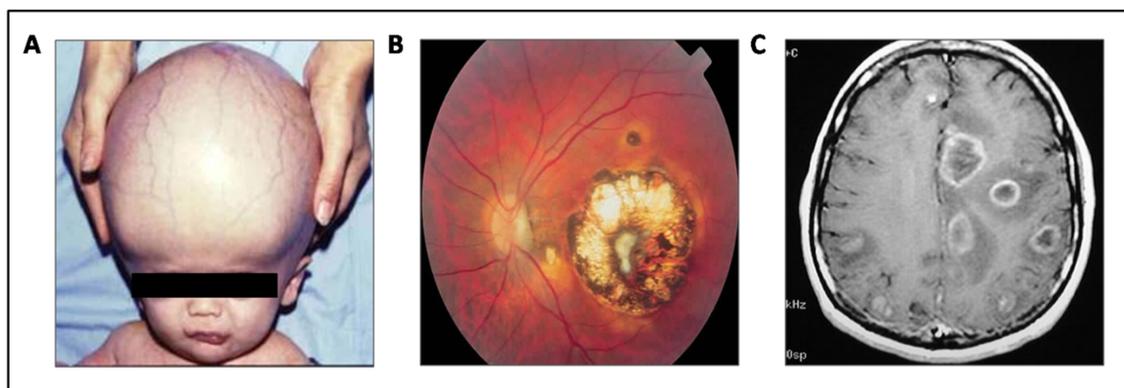
La toxoplasmosis ocular puede ser adquirida congénitamente, puede ser una infección adquirida después del nacimiento, o puede ser el resultado de la reactivación de la enfermedad en gestantes e individuos inmunocomprometidos (Jones et al., 2006).

En niños pequeños, la enfermedad suele ser asintomática aunque en algunos casos pueden haber manifestaciones de disminución de la visión o dolor ocular, e identificarse leucocoria o estrabismo (Butler, Furtado, Winthrop, & Smith, 2013). En adultos, la enfermedad se manifiesta comúnmente en la segunda, tercera y cuarta décadas de vida. Se caracteriza por coriorretinitis con episodios recurrentes de inflamación y cicatrización posterior que se producen durante años después de la infección aguda. Ocurre típicamente en el polo posterior del ojo, lo que resulta en una visión borrosa, fotofobia, pérdida de la visión central y ceguera (Butler et al., 2013; Delair et al., 2011; Halonen & Weiss, 2013).

Existe evidencia de que las cámaras de coroides, vítrea y anterior del ojo también son afectadas como consecuencia de la infección (Commodaro et al., 2009), manifestándose necrosis retiniana con coroiditis adyacente, vasculitis, hemorragia, vitrítis con formación de cicatrices coriorretinianas y retinopatía necrotizante provocada por la activación de quistes inactivos situados dentro de la retina y el nervio óptico. En niños, las alteraciones oculares incluyen neovascularización coroidea, catarata, glaucoma, atrofia del nervio óptico y desprendimiento de retina (Bosch-Driessen, Karimi, Stilma, & Rothova, 2000; Eckert, Melamed, & Menegaz, 2007).

#### 1.2.6.4. Toxoplasmosis Cerebral

La toxoplasmosis cerebral es la infección oportunista relacionada con SIDA más común del sistema nervioso central (Pereira-Chioccola, Vidal, & Su, 2009; Skiest, 2002). Las manifestaciones clínicas dependen de la localización y número de lesiones. Los principales síntomas clínicos asociados son dolor de cabeza, fiebre, déficit focales, convulsiones, confusión mental, ataxia, letargo y alteraciones visuales (Skiest, 2002; Vidal et al., 2005). No obstante, pueden presentarse disfunciones cognitivas, pérdida de coordinación motora e incremento de presión intracraneal (Pereira-Chioccola et al., 2009).



**Figura 7. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis.** A) Hidrocefalia neonatal asociada a toxoplasmosis congénita. B) Coriorretinitis toxoplásmica. C) Toxoplasmosis cerebral: lesiones en hemisferios cerebrales asociado a edema.

[http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s0365-66912003001000004&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s0365-66912003001000004&script=sci_arttext)

### **1.2.7. DIAGNÓSTICO**

Existen diferentes estrategias de diagnóstico para la detección de una infección por *Toxoplasma* aguda o crónica, ya sea en pacientes inmunocompetentes, inmunocomprometidos, embarazadas o en el recién nacido. Esto puede lograrse por métodos serológicos o por detección directa del parásito, sus proteínas o su ácido nucleico (EFSA, 2007).

#### **1.2.7.1. Métodos Directos**

Estas técnicas proporcionan un diagnóstico de infección aguda con gran seguridad. Sin embargo, sólo es posible hacerlo en un reducido número de pacientes que presenten inmadurez o alteración del sistema inmunitario con baja producción de anticuerpos (Martín & García, 2003). Aunque en determinados laboratorios algunas de estas técnicas pueden ser reemplazadas por inoculación in vitro o tecnologías de ácidos nucleicos, aun se siguen empleando no solo por su alta sensibilidad sino también para el aislamiento de cepas de *T. gondii* para su tipificación molecular (EFSA, 2007). Dentro de estas técnicas encontramos el aislamiento del parásito, cultivo celular y visualización de los taquizoítos.

#### **Aislamiento del Parásito**

Consiste en determinar la presencia del parásito mediante el aislamiento en ratones infectados intraperitonealmente; luego de tres semanas puede demostrarse la seropositividad por la infección a través de pruebas serológicas, observación de taquizoítos en líquido intraperitoneal o en diferentes órganos como cerebro y pulmón entre otros (Perez-Rendon Gonzalez, Moreno Montanez, Becerra, & Martinez Cruz, 1992).

#### **Aislamiento en Cultivo Celular**

Materiales como tejidos y secreciones o fluidos corporales como sangre o líquido cefalorraquídeo son sembrados en líneas celulares, principalmente fibroblastos de origen humano. Los cultivos son monitoreados los días 2, 4, 8 y 10 y el desarrollo

del parásito en la célula se evidencia por inmunofluorescencia indirecta (Beaman, McCabe, & Remington, 1995).

### **Visualización del Parásito o Histopatología**

Mediante citología puede detectarse taquizoítos en diferentes muestras durante el estado agudo, además de quistes de *T. gondii* en la etapa crónica de la infección. Muestras de líquidos orgánicos, frotis y muestras de tejido son obtenidas de biopsias o necropsias y son visualizadas al microscopio mediante tinción o al fresco (Dubey & Lappin, 2000; Montoya & Liesenfeld, 2004).

#### **1.2.7.2. Métodos Indirectos**

Dentro de estos métodos encontramos las técnicas serológicas, que consisten en la detección de anticuerpos tipo IgG, IgM, IgA e IgE mediante el uso de diferentes antígenos. Estos incluyen la prueba DyeTest de inmunoaglutinación, IFI y la aglutinación directa, que emplean como antígeno al parásito intacto. Mientras que las técnicas de hemaglutinación indirecta, reacción de fijación del complemento, ELISA y western blot utilizan extractos antigénicos solubles (Remington, Thulliez, & Montoya, 2004). Con el auge del ADN recombinante también se pueden emplear proteínas recombinantes de *T. gondii* como antígenos para el diagnóstico mediante ELISA y western blot.

#### **Prueba DyeTest**

Esta prueba detecta principalmente anticuerpos tipo IgG que aparecen en la fase de parasitemia y se orientan hacia los antígenos de membrana. Se basa en la lisis del parásito en presencia de anticuerpos y de un factor sérico accesorio (elemento del complemento) (Botero & Restrepo, 1998). Por su alta sensibilidad y especificidad se constituye como una prueba de referencia para evaluar otros métodos serológicos y su uso se limita a laboratorios especializados debido a que es una técnica compleja, costosa y requiere utilizar como antígeno taquizoítos vivos e intactos, lo que representa un riesgo para el manipulador (Lorca & Contreras, 1997).

## **Pruebas Inmunofluorescencia Indirecta y Aglutinación Directa**

Estas pruebas emplean como antígenos taquizoítos enteros y formolados. Los anticuerpos detectados son tanto IgG como IgM, formados en relación con los antígenos de membrana y también con los antígenos citoplasmáticos (Botero & Restrepo, 1998). La prueba de IFI presenta una alta sensibilidad y especificidad, similar a la prueba DyeTest y se prefiere en la práctica debido a que no requiere trabajar con parásitos vivos ni con un factor accesorio. Una limitante para esta prueba es el uso de un microscopio de fluorescencia que no está disponible en algunos laboratorios (Llop, Valdez-Dapena, & Zuazo, 2001). Por otro lado, la prueba de aglutinación directa es más sensible para la detección de anticuerpos tipo IgM; sin embargo, la presencia de IgM naturales puede dificultar el diagnóstico y arrojar falsos positivos. Para evitar los falsos positivos por IgM naturales, las muestras son tratadas con 2-mercaptoetanol, detectando solo las IgG específicas dirigidas contra los antígenos de membrana (Martín & García, 2003).

## **Hemaglutinación Indirecta**

La hemaglutinación indirecta se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-*Toxoplasma* de producir aglutinación en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito (Wiener, 2000). Esta prueba detecta anticuerpos IgG y no es adecuada para el diagnóstico de infección aguda debido a que los anticuerpos tipo IgG reaccionan principalmente con antígenos citoplasmáticos y de aparición lenta. La hemaglutinación Indirecta es una prueba poco específica y se utiliza para estudios poblacionales (Acha & Szyfres, 2003).

## **Western Blot**

Es una técnica inmunoenzimática que se basa en utilizar antígenos específicos de *T. gondii* marcados para detectar anticuerpos que son separados mediante electroforesis y luego transferidos a una membrana, sobre la cual se lleva a cabo la reacción enzimática. En el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita se emplea

para comparar anticuerpos de recién nacidos frente a los maternos, debido a que esta prueba potencialmente podría separar dichos anticuerpos. Esta prueba no es muy utilizada debido a su complejidad y elevado costo (Rorman, Zamir, Rilakis, & Ben-David, 2006).

### **Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)**

Esta técnica inmunoenzimática permite la detección de antígenos circulantes y anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma* en un medio complejo. Normalmente se utilizan tres principios técnicos para la detección de estos anticuerpos: la inmunocompetencia, el método indirecto y la inmunocaptura. La prueba ELISA presenta ventajas como lo es la ausencia de riesgo durante la manipulación, automatización y la estabilidad de los reactivos que se emplean, lo que unido a una elevada sensibilidad y especificidad lo han hecho valioso en el diagnóstico de enfermedades parasitarias (Martín & García, 2003).

Otros métodos indirectos usados en el diagnóstico de la toxoplasmosis son las técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional y sus variantes (PCR anidada y PCR en tiempo real). Estas consisten en la detección del ADN del parásito en diferentes muestras biológicas como sangre, humor vítreo, líquido amniótico, orina y líquido cefalorraquídeo, permitiendo el diagnóstico temprano de toxoplasmosis congénita en gestantes con pruebas de inmunoglobulinas negativa. A pesar de la alta sensibilidad y especificidad, estas técnicas son solo usadas en un reducido número de pacientes y para fines investigativos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de los antígenos recombinantes rSAG1, rROP1 y rGRA7 en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita en mujeres gestantes del departamento de Sucre.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar anticuerpos tipo IgG e IgM anti-*T. gondii* en gestantes del departamento de Sucre.

Comparar la sensibilidad y especificidad de los antígenos recombinantes frente a los antígenos nativos en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita.

Validar el uso de los antígenos recombinantes rSAG1, rROP1 y rGRA7 de *T. gondii* por la técnica ELISA en muestras de sangre de gestantes del departamento de Sucre.

Determinar la seroprevalencia de la toxoplasmosis congénita en el departamento de Sucre y los posibles factores asociados a la infección por *T. gondii*.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. TIPO DE ESTUDIO**

El presente estudio es de tipo descriptivo transversal, a través del cual se evaluaron tres antígenos recombinantes rSAG1, rROP1 y rGRA7 en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita en el departamento de Sucre.

#### **3.2. ÁREA DE ESTUDIO**

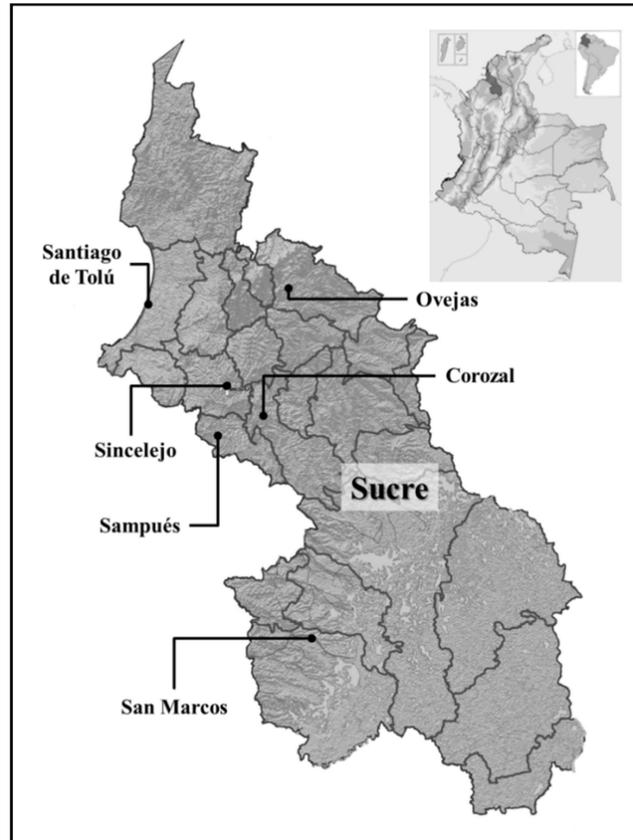
Esta investigación se llevó a cabo en el departamento de Sucre, en el que se registra una seroprevalencia de infección por *T. gondii* del 56% en gestantes, con una incidencia del 2% (Machado et al., 2004). Se incluyeron gestantes de los municipios de Sincelejo, Corozal, Santiago de Tolú, San Marcos, Sampués y Ovejas. Para el área de estudio se escogió los municipios con mayor número de embarazadas y donde las condiciones geográficas, climáticas e higiénicas sanitarias son propicias para que se presente la infección.

Geográficamente, el departamento de Sucre se encuentra ubicado en el norte del país. Se localiza entre los 10°08'03" y 08°16'46" de latitud norte y los 74°32'35" y 75°42'24" de longitud oeste. Presenta un clima cálido, con temperaturas medias entre 27°C y 30°C; la humedad relativa es del orden del 85% y las lluvias están distribuidas durante el año en dos períodos, alternados con épocas secas (Figura 8).

#### **3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Mediante un muestreo estratificado con afijación proporcional se determinó conformar la población de estudio por 371 mujeres embarazadas, entre el segundo y octavo mes de gestación, que asistieron a control prenatal en los centros de salud de Sincelejo, Corozal, Sampués, Ovejas y hospitales de primer y segundo nivel de los municipios de Santiago de Tolú y San Marcos. Previa a la recolección de muestras, fue ofrecida una charla informativa a las gestantes referente a la toxoplasmosis, su agente etiológico, vías de transmisión,

manifestaciones clínicas, prevención y diagnóstico (Anexo 1). A todas las participantes se les informó sobre el estudio, se les realizó una encuesta para conocer sus datos (Anexo 2), y se les solicitó firmar un consentimiento informado (Anexo 3).



**Figura 8. Área de estudio.** Los municipios donde se llevó a cabo el estudio fueron Santiago de Tolú, Ovejas, Sincelejo, Corozal, Sampués y San marcos.

### 3.4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se calculó con el software Raosoft con el fin de obtener estimaciones de prevalencia con un nivel de confianza del 95%. El universo del estudio fue 15414 individuos, que corresponde a la población de gestantes en el departamento de Sucre que para el año 2012 registró el Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE) (DANE, 2012). Para el cálculo de la muestra, se tuvo en cuenta la seroprevalencia de la toxoplasmosis en gestantes del departamento de Sucre (56%) reportada en el año 2004 (Machado et al.,

2004), con un porcentaje de error esperado del 5%. Con base en estos datos, se estimó un tamaño de 371 muestras procedentes de embarazadas que asistieron a los programas de control prenatal en los distintos centros de salud y hospitales de I y II nivel del departamento.

### **3.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Las gestantes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: residencia permanente en los municipios donde se llevó a cabo el estudio, asistencia a control prenatal y realización de las pruebas ELISA IgG e IgM anti-*Toxoplasma*, no estar bajo ningún tratamiento que incluyera drogas inmunosupresoras y estar en etapa gestacional entre 2–8 meses.

### **3.6. PROCEDIMIENTOS EN EL LABORATORIO**

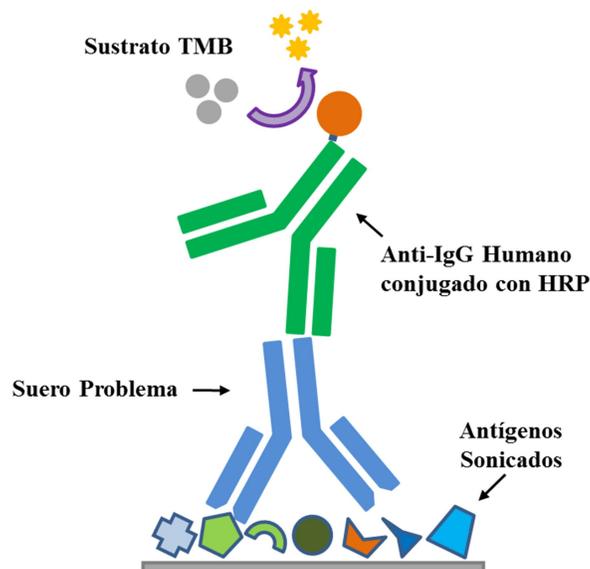
#### **3.6.1. Obtención de Muestras**

Se tomó por venopunción aproximadamente 6 mL de sangre periférica a las gestantes participantes mediante el sistema Vacutainer® al vacío. Para la obtención de suero, las muestras de sangre fueron centrifugadas 5000 rpm durante 5 minutos y luego almacenadas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

#### **3.6.2. Detección de Anticuerpos IgG Anti-*T. gondii* por la Prueba ELISA Empleando Antígenos Nativos (an-ELISA IgG)**

La detección de anticuerpos IgG específicos para *T. gondii* se realizó mediante la prueba an-ELISA, al emplear el estuche comercial cuantitativo Toxo IgG (Human Diagnostics Worldwide) y se llevó a cabo en un equipo automatizado Elisys Uno (Human Diagnostics Worldwide). Inicialmente, un volumen de 100 µL de las muestras diluidas 1:100 en buffer de dilución IgG (buffer fosfato 10 mM, NaCl 8 g/L y albúmina 10 g/L; pH 6.5) fueron adicionadas en los pozos de la placa cubiertos con los antígenos sonicados de *T. gondii* (taquizoítos). Seguidamente, la placa se incubó por 30 minutos a 17-25°C; luego los pozos fueron lavados 4 veces con buffer Tris (Tris 10 mM, NaCl 8 g/mL, pH 7.2) para remover cualquier exceso de

muestra. Un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-IgG humano marcado con peroxidasa (de conejo) fue adicionado a cada pozo durante un tiempo de incubación de 30 minutos a 17-25°C y fueron lavados 4 veces con buffer de lavado. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de sustrato TMB (3,3', 5,5'tetrametilbencidina 1.2 mM) y peróxido de hidrógeno (3mM) a pH 3.7, se incubó a 17-25°C por 15 minutos y finalmente la reacción se detuvo con la adición de 100  $\mu\text{L}$  de solución de parada (ácido sulfúrico 0.5M) (Figura 9). La lectura de la placa se realizó a una longitud de onda de 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm en el lector del equipo Elisys Uno. Los sueros fueron analizados por duplicado.



**Figura 9. Prueba ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgG anti-*T. gondii* empleando antígenos nativos.**

Los controles utilizados incluyeron: control negativo, control de punto de corte, control positivo bajo, control positivo medio y control positivo alto (Tabla 1). Los resultados fueron expresados en UI/mL de acuerdo con los valores de referencia de los controles (Tabla 2).

Controles	Concentración (UI/mL)
Control negativo	0
Control de punto de corte (Cut-off)	5
Control positivo bajo	30
Control positivo medio	100
Control positivo alto	200

**Tabla 1. Controles usados en la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.**

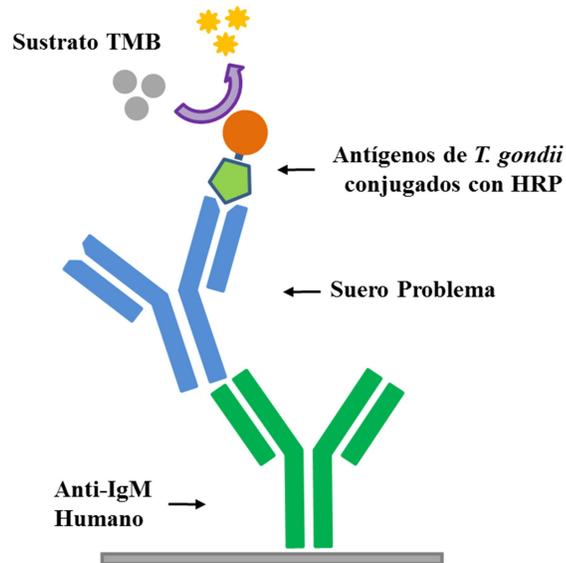
Resultados (UI/mL)	Interpretación
$\geq 200$ UI/mL	Positivo alto
$> 5.7 - < 200$ UI/mL	Positivo
$< 4.2$ UI/mL)	Negativo
0,0 UI/mL	Seronegativo
Entre 4.2 - 5.7 UI/mL	Dudoso

**Tabla 2. Interpretación de resultados prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.**

### 3.6.3. Detección de Anticuerpos IgM Anti-*Toxoplasma* por la Prueba ELISA de Captura (cap-ELISA)

La detección de anticuerpos IgM específicos para *T. gondii* se realizó por la prueba cap-ELISA en el equipo Elisys uno (Human Diagnostics Worldwide) y se utilizó un estuche comercial Toxo IgM  $\mu$ -captura (Human Diagnostics Worldwide). Brevemente, un volumen de 100  $\mu$ L de las muestras diluidas 1:100 con buffer fosfato (pH 7.2) se adicionaron a los pozos de la placa cubiertos con anticuerpos específicos de ratón anti-IgM humana, la placa se incubó por 60 minutos a 37°C y posteriormente los pozos fueron lavados 4 veces con buffer fosfato (pH 7.1) para eliminar el exceso de muestra. Un volumen de 100  $\mu$ L de antígeno sonificado de *Toxoplasma* conjugado con peroxidasa fue adicionado a cada pozo y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Luego de lavar los pozos 4 veces con buffer fosfato, se les adicionó 100  $\mu$ L de la solución de sustrato TMB (3,3',5,5' tetrametilbencidina, peróxido de hidrógeno); la placa fue incubada a 17-25°C por 30 minutos y finalmente la reacción se detuvo con 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico (0.5M)

(Figura 3). La lectura de la placa se efectuó a 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm. Los sueros fueron analizados por duplicado.



**Figura 10. Prueba cap-ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgM anti-*T. gondii*.**

Se utilizó un control positivo, un control de punto de corte y un control negativo contenido en el estuche (Tabla 3); los resultados fueron expresados en UI/mL teniendo en cuenta los valores de referencia de los controles (Tabla 4). Las muestras positivas fueron confirmadas mediante el estuche *Toxoplasma* ELISA IgM captura (Vircell).

Controles	Concentración (UI/mL)
Control negativo	0.0 - 0.150
Control de punto de corte (Cut-off)	> 0.200
Control positivo	≥ 2.0

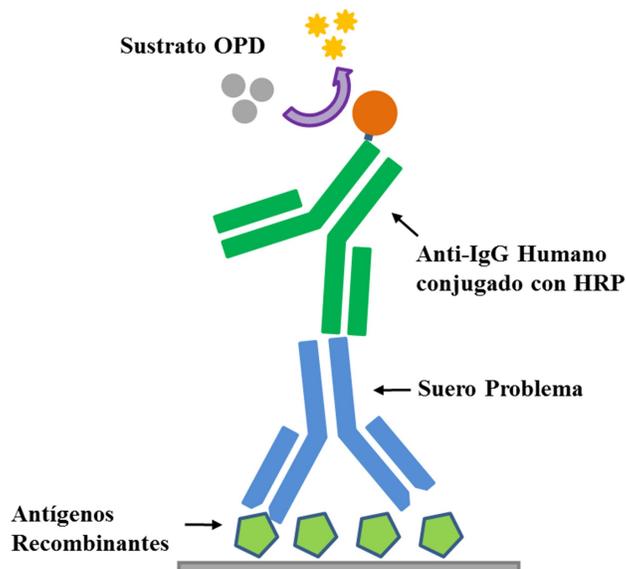
**Tabla 3. Controles usados en la prueba cap-ELISA IgM.**

Resultados (UI/mL)	Interpretación
> 0.5676	Positivo
0.464 - 0.5676	Dudoso
< 0.464	Negativo

**Tabla 4. Interpretación de resultados cap-ELISA IgM.**

#### **3.6.4. Detección de Anticuerpos IgG Anti-*T. gondii* por la Prueba ELISA con Antígenos Recombinantes (rec-ELISA IgG)**

Luego de analizar las 371 muestras por la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*, 200 muestras seleccionadas al azar fueron clasificadas en dos grupos, un grupo de 135 muestras positivas y otro grupo de 65 muestras negativas, que luego fueron analizadas por la prueba rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*. Las placas de ELISA fueron incubadas por una hora a 37°C y luego a 4°C toda la noche con 100 µL de las proteínas recombinantes de *T. gondii* rSAG1y rGRA7 a una concentración de 5 µg/mL (Meridian), y rROP1a una concentración de 3 µg/mL (US Biological) (tabla 5). Después de remover la solución antigénica, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween (0.25%) y agua destilada, y bloqueadas por dos horas a 37°C con leche descremada (5% en PBS-Tween 0.05%); luego los pozos fueron lavados tres veces con agua destilada. Posteriormente, un volumen de 100 µL de las muestras (blanco reactivo, control positivo, control negativo y muestra problema) diluidas 1:100 en buffer de bloqueo fueron adicionadas e incubadas por 1 hora y 30 minutos a 37°C. Las placas fueron lavadas y se adicionaron a cada pozo 100 µL de una dilución 1:4000 en buffer de bloqueo del anticuerpo de cabra anti-IgG humano marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) y luego fueron incubadas a 37°C por 60 minutos. Después de adicionar 100 µL del sustrato O-fenilenediamina dihidroclorado SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich), la placa se incubó a 37°C por 3 minutos y la reacción se detuvo con 100 µL de ácido clorhídrico 1N. Cada suero fue analizado por duplicado. La lectura de la placa se realizó a 490 nm usando el lector de ELISA automatizado Elisys Uno (Aubert et al., 2000).



**Figura 11. Prueba rec-ELISA para la Detección de Anticuerpos Tipo IgG Anti-*T. gondii*.**

Como controles positivos y negativos se utilizó una muestra de suero de una paciente seropositiva y una muestra de suero de una paciente seronegativa confirmada para IgG anti-*Toxoplasma* respectivamente; además se utilizó buffer de bloqueo como blanco reactivo. La densidad óptica de cada muestra fue obtenida restando la densidad óptica de las muestras menos el blanco reactivo. Se asumió como punto de corte la densidad óptica de 0.504 para el antígeno rSAG1, 1.11 para rGRA7 y 0.499 para rROP1. El valor del punto de corte de las proteínas recombinantes fue determinado como la media más dos veces la desviación estándar de las absorbancias obtenidas con 15 sueros de pacientes sanos para toxoplasmosis. Se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron valores de densidad óptica por encima del punto de corte.

Antígeno	Características Antígeno	Concentración Antígeno usado (µg/mL)
rSAG1(P30)	Región inmunodominante proteína SAG1 (P30). Producido en <i>E. coli</i> ; % purificación >95%	5
rGRA7(P29)	Región inmunodominante de la proteína GRA7 (P29). Producido en <i>E. coli</i> ; % purificación >95%	5
rROP1(P66)	Recombinante de <i>T. gondii</i> ROP1 (P66). (Aminoácidos 24-428). Producido en <i>E. coli</i> . % purificación >95%	3

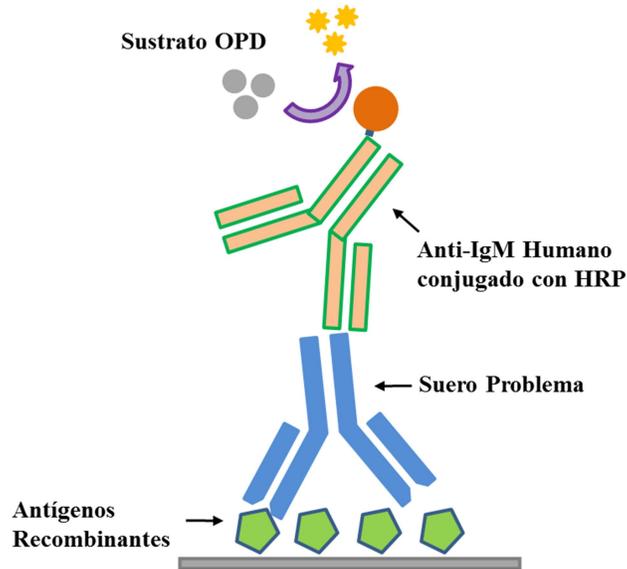
**Tabla 5. Características antígenos recombinantes de *T. gondii*.**

### **3.6.5. Detección de Anticuerpos IgM Anti-*T. gondii* por ELISA con Antígenos Recombinantes (rec-ELISA IgM)**

Luego de analizar las 371 muestras por la prueba an-ELISA IgM anti-*Toxoplasma*, 200 de las muestras fueron clasificadas en dos grupos: un grupo que incluía las 14 muestras positivas por IgM de captura y otro grupo con 186 muestras negativas previamente analizadas para anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma*. Estas muestras fueron analizadas por la prueba rec-ELISA IgM anti-*Toxoplasma*.

Las placas de ELISA fueron incubadas por 1 hora a 37°C y luego a 4°C toda la noche con 100 µL de las proteínas recombinantes de *T. gondii* rSAG1 (7 µg/mL), rROP1 (5 µg/mL) y rGRA7 (7 µg/mL). Después de remover la solución antigénica, las placas fueron lavadas con PBS 1X-Tween (0.25%) y agua destilada, se bloquearon por dos horas a 37°C con leche descremada (5% en PBS 1X-Tween 0.05%) y luego fueron lavadas tres veces. Posteriormente, un volumen de 100 µL de las muestras y de los controles (blanco reactivo, control positivo, control negativo) diluidas 1:50 para el antígeno rSAG1, 1:10 para rGRA7 y 1:100 para rROP1 en buffer de bloqueo fueron adicionadas e incubadas por 1 hora a 37°C. Luego de lavar las placas, 100 µL de anticuerpo de cabra anti-IgM humana marcada con peroxidasa de rábano a una concentración de 1:2000 en buffer de bloqueo, fueron adicionados a cada pozo e incubados a 37°C por 60 minutos (Tabla 6). Después de adicionar 100 µL de sustrato O-fenilenediamina dihidroclorado (Sigma-Aldrich) la placa fue incubada a 37°C por 3 minutos y

finalmente la reacción se detuvo con 100  $\mu$ L ácido clorhídrico 1N. Cada suero fue analizado por duplicado. La lectura de la placa se realizó a 490 nm usando el lector de ELISA automatizado Elisis Uno (Aubert et al., 2000).



**Figura 12. Prueba rec-ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgM anti-*T. gondii*.**

Como controles (positivo y negativo) se empleó una muestra de suero de una paciente positiva y una muestra de suero de una paciente negativa, confirmadas para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma*; además se utilizó buffer de bloqueo como blanco reactivo. La densidad óptica de cada muestra fue obtenida restando la densidad óptica de las muestras menos el blanco reactivo. Se asumió como punto de corte la densidad óptica de 0.249 para el antígeno rSAG1, 0.335 para rGRA7 y 0.269 para rROP1. El valor del punto de corte de las proteínas recombinantes fue determinado como la media más tres veces la desviación estándar de las absorbancia obtenidas con 15 sueros de pacientes sanos para toxoplasmosis. Se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron valores de densidad óptica por encima del punto de corte.

Antígeno	Concentración antígeno (µg/mL)	Concentración suero muestra	Concentración conjugado
rSAG1	7	1:50	1:2000
rGRA7	7	1:10	1:2000
rROP1	5	1:100	1.2000

**Tabla 6. Concentración reactivos usados en la prueba rec-ELISA IgM anti-*Toxoplasma*.**

### 3.7. ANÁLISIS DE DATOS

Para comparar las pruebas rec-ELISA IgG e IgM y la prueba an-ELISA IgG e IgM, se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (Gómez, 1998), con el fin de establecer cuál de los ensayos ofrecía mejores resultados. Para ello, los resultados de ambas pruebas ELISA IgG (empleando antígenos sonicados y recombinantes) se compararon frente a los resultados de un panel de sueros evaluados con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual es empleada como prueba de referencia para la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma*; esta prueba fue realizada en el Instituto Nacional de Salud (Anexo 4). De otro lado, la prueba rec-ELISA IgM fue comparada con la prueba cap-ELISA IgM. Además, para determinar el grado de concordancia entre las pruebas analizadas y las pruebas de referencia se realizó un análisis Kappa de Cohen, la cual es una medida estadística que refleja el grado de acuerdo entre dos pruebas o técnicas. Este análisis puede tomar valores entre -1 y +1; mientras más cerca de +1 mayor es el grado de concordancia entre las pruebas analizadas (Campo-Arias, 2010). Los parámetros diagnósticos incluidos y la prueba de concordancia fueron calculados con las fórmulas indicadas en el Anexo 5 y corroborados en el software estadístico IBM SPSS (IBM, 2013).

Para determinar posibles factores de riesgo asociados con la toxoplasmosis en gestantes del departamento de Sucre, las variables incluidas en la encuesta fueron correlacionadas con los resultados obtenidos por la prueba ELISA IgG e

IgM anti-*Toxoplasma* con antígenos nativos. Para esto, se obtuvieron proporciones sobre la prevalencia de anticuerpos tipo IgG e IgM con sus intervalos de confianza de 95%, estratificadas por variable (localidad, tipo de vivienda, material del piso de la vivienda, presencia de animales domésticos, consumo de agua, presencia de gatos, etc.). La comparación de proporciones para cada una de las variables se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) (proporciones, diferencia de proporciones y homogeneidad de proporciones) con los softwares estadísticos INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2013) y R (R Development Core) (Team, 2008).

### **3.8. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS**

#### **3.8.1. Manejo de Pacientes**

En los casos en el que no se conocía el estatus inmunológico contra *Toxoplasma gondii*, se recomendó realizar pruebas de ELISA IgG e IgM a las gestantes en su primer control prenatal para determinar la presencia de anticuerpos. Si la prueba ELISA IgG y la IgM fue negativa, indicó que no ha habido contacto con el parásito y se instruyó a la paciente sobre medidas preventivas respecto a consumo de carnes bien cocidas, consumo de agua hervida, manejo higiénico de los alimentos, lavado de manos posterior a actividades de jardinería, manipulación de animales (gatos) y además se recomendó la realización de un control mensual de IgG.

Se recomendó que las mujeres con prueba ELISA IgG negativo e IgM positivo se realizaran la repetición de la prueba ELISA IgG en dos semanas para documentar seroconversión aguda o presencia de IgM natural (Ministerio de Salud y Protección Social - Colciencias, 2013). Todas las gestantes consideradas positivas para la infección por *Toxoplasma* fueron informadas sobre los resultados obtenidos en este estudio y se remitieron a manejo especializado en la entidad encargada de su control prenatal para confirmar la antigüedad de la infección e instaurar el tratamiento respectivo.

### **3.9. ASPECTOS ÉTICOS**

Esta investigación contó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Sucre y se planteó de acuerdo con los parámetros establecidos en la resolución N° 008430 del 4 de octubre 1993, por la cual se establecieron las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. A todas las personas que donaron muestras de sangre se les informó sobre el estudio, sus objetivos, beneficios, resultados esperados y la forma de participación en este, además se les solicitó firmar un consentimiento informado (Anexo 3). Adicionalmente, se protegió la dignidad, los derechos y bienestar de los participantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

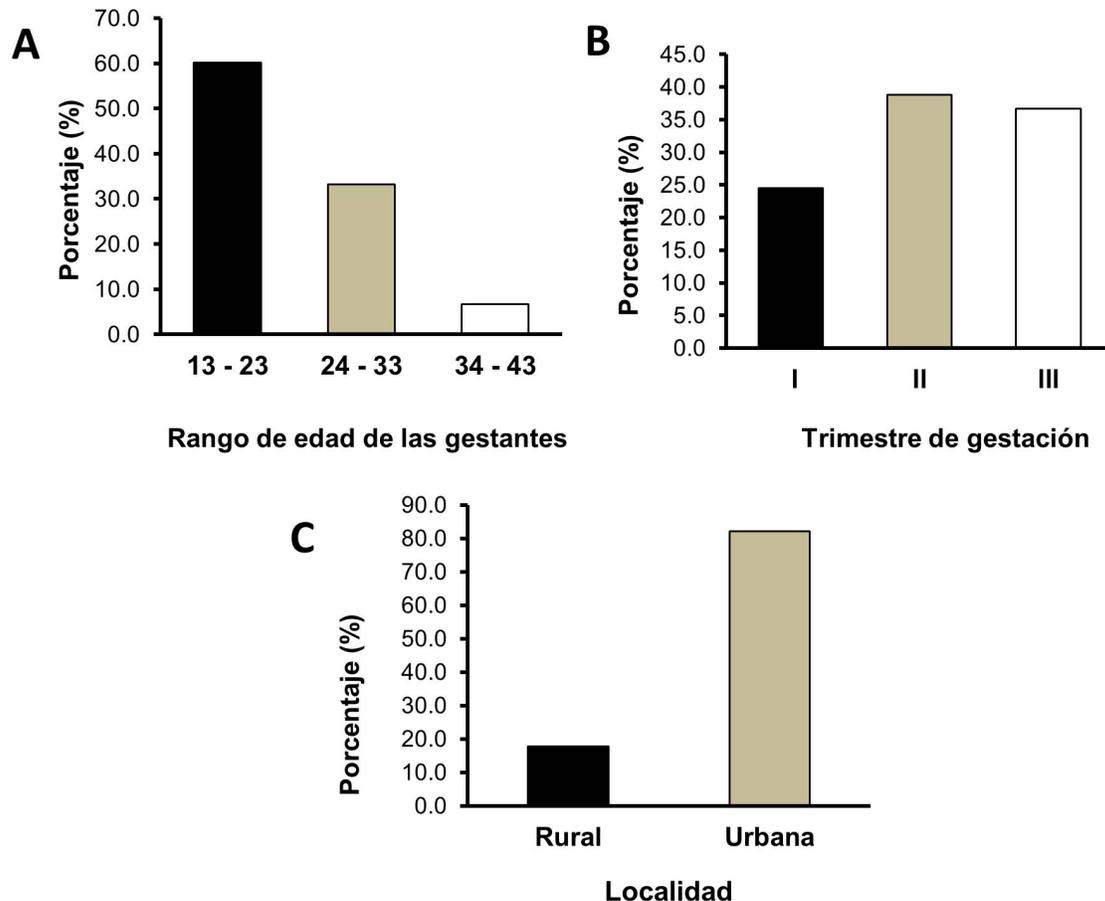
La población de estudio estuvo conformada por 371 embarazadas que asistieron a control prenatal en las IPS de Sampués, Sincelejo, Corozal, Ovejas y hospitales de primer y segundo nivel de los municipios Santiago de Tolú y San Marcos, durante el mes de febrero de 2012 a febrero 2013. Para el estudio fueron captadas 208 gestantes en el municipio de Sincelejo, 48 en el municipio de Corozal, 47 en el municipio de San Marcos, 34 gestantes en el municipio de Sampués, 19 gestantes en el municipio de Tolú y 15 gestantes en el municipio de Ovejas. (Tabla 7). La población de gestantes para cada municipio fue calculada de acuerdo al total de embarazadas para el año 2012 (DANE, 2012).

Municipios	Número de muestras
Sincelejo	208
Corozal	48
San marcos	47
Sampués	34
Santiago de Tolú	19
Ovejas	15
Total	371

Tabla 7. Número de gestantes por municipio.

### 4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de embarazadas presentaba un rango de edad entre los 13 y los 43 años. La mayor parte de las gestantes presentaban una edad entre los 13 y los 23 años (60.1%), seguido por el grupo de gestantes con edades entre 24 y 33 años (33.2%) (Gráfica 1A). El mayor número de embarazadas se encontraba en el segundo trimestre de gestación (38.8%), mientras que un 36.7% de gestantes se encontraban en el tercer trimestre de embarazo (Gráfica 1B). La mayor parte de la población de gestantes vivía en zona urbana (82.2%), mientras que 17.8% vivía en zona rural (Gráfica 1C).

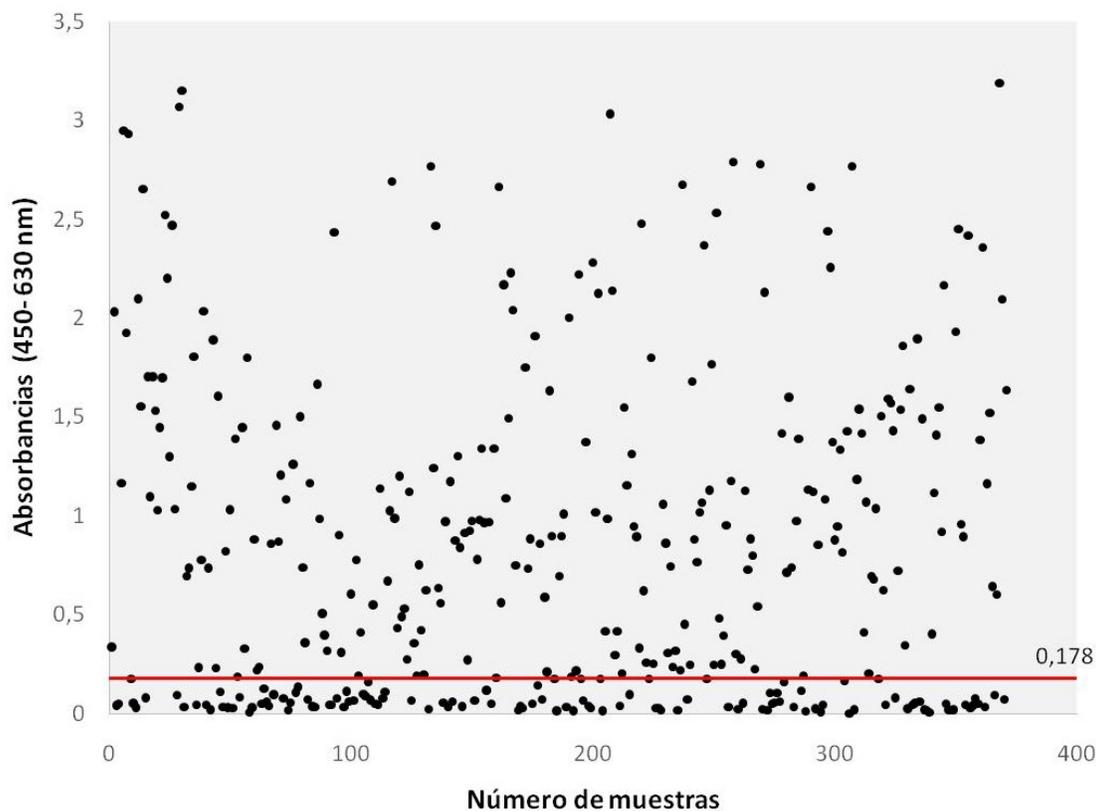


**Gráfica 1. Características de la población de estudio.** A) Frecuencia de edad de las gestantes; las 371 gestantes del estudio fueron agrupadas en tres rangos de edad: de 13 a 23 años, 24 a 33 años y 34 a 43 años. La barra de color negro muestra el rango de edad en donde se ubicaron la mayoría de las gestantes del estudio. B) Frecuencia de edad gestacional; el eje X muestra el trimestre de gestación en el que se encontraban las gestantes participantes del estudio y el eje Y el porcentaje encontrado. La mayoría de las gestantes estaban en el segundo trimestre de embarazo (barra gris). C) Localidad de las gestantes. Las participantes del estudio fueron agrupadas según su lugar de residencia; la mayoría de las gestantes del estudio vivían en zona urbana (barra gris).

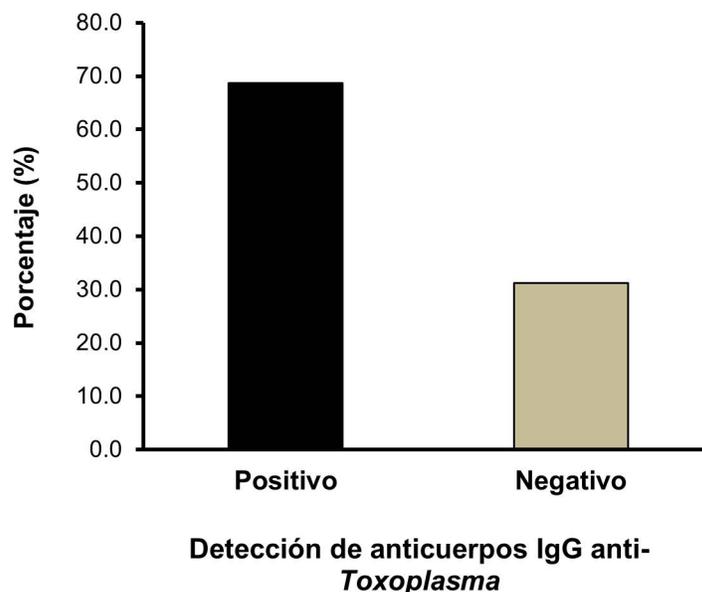
#### 4.3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI-TOXOPLASMA POR LA PRUEBA an-ELISA

Con base en el punto de corte para la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*, (Gráfica 2), de las 371 embarazadas captadas en los diferentes municipios donde se realizó el estudio, fue posible detectar títulos de anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* en 255 gestantes, lo que indica una seroprevalencia del 68.7%;

mientras tanto, 116 gestantes fueron negativas, lo que corresponde al 31.3% de la población de estudio (Gráfica 3).

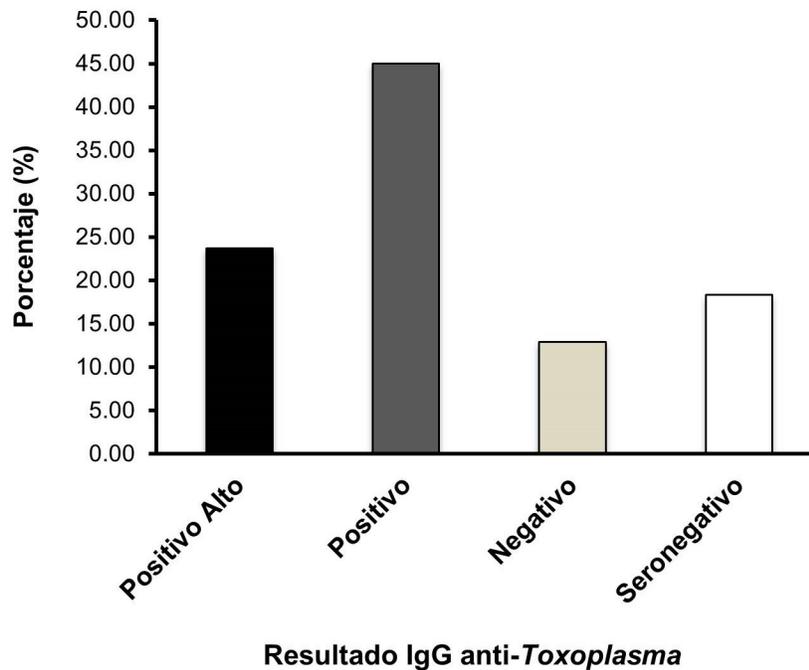


**Gráfica 2. Punto de corte de la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.** El eje X representa las muestras analizadas por la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* y el eje Y representa las absorbancias de cada muestra. La línea roja muestra el punto de corte (0.178) obtenido después de calibrar el equipo automatizado Elisys Uno.



**Gráfica 3. Frecuencia de detección de anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma*.** Se visualizan el porcentaje de muestras positivas (barra negra) y de muestras negativas (barra gris) para anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* determinadas por la prueba an-ELISA.

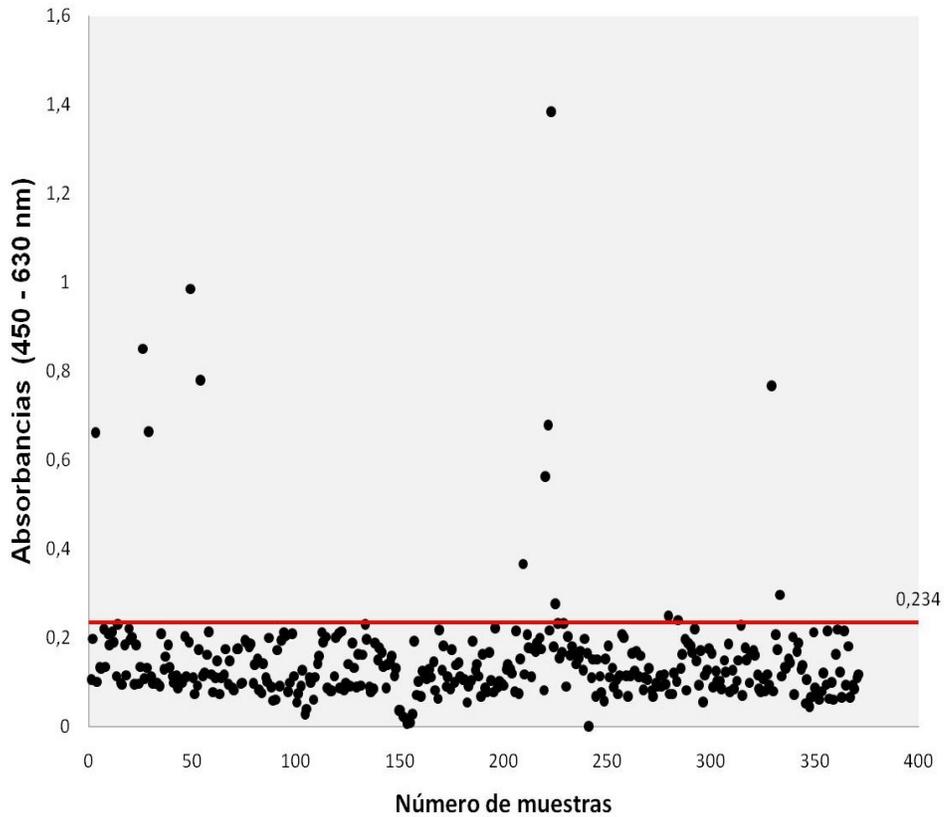
Del total de gestantes captadas en los diferentes municipios, 88 (24%) presentaron títulos altos de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* ( $\geq 200$  UI/mL), 167 (45%) fueron positivas ( $> 5.7 - < 200$  UI/mL), 48 (13%) fueron negativas ( $< 4.2$  UI/mL), y en 68 gestantes (18%) no se detectó producción de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* (0.0 UI/mL) (Gráfico 4).



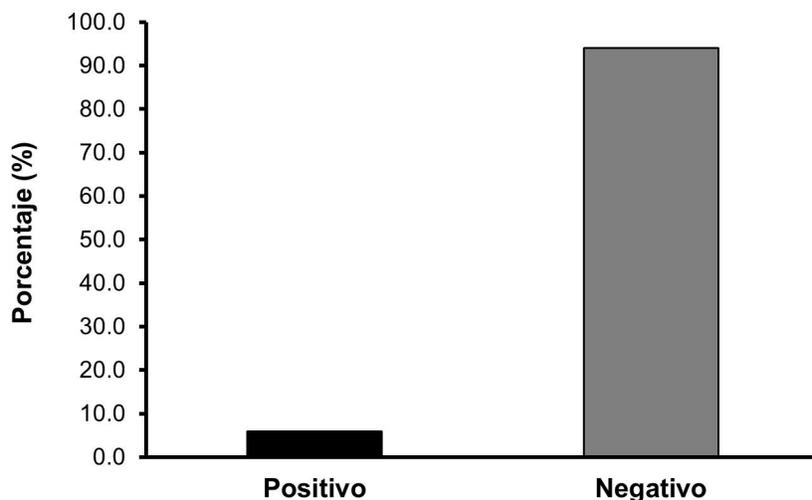
**Gráfica 4. Resultados de la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* en gestantes del departamento de Sucre.** Las 371 muestras fueron clasificadas teniendo en cuenta los calibradores empleados en la prueba an-ELISA en: positivo alto (barra negra), positivo (barra gris oscuro), negativo (barra gris claro) y seronegativo (barra blanca).

#### **4.4. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* POR LA PRUEBA cap-ELISA**

Con base en el punto de corte (Gráfico 5), de las 371 gestantes incluidas en el estudio, 14 mostraron títulos de anticuerpos tipo IgM anti-*Toxoplasma* (3.8%) y 357 fueron negativas (96.2%) (Gráfico 6). De acuerdo con esto, la frecuencia de detección de anticuerpos tipo IgM fue de 3.8%. A las muestras de gestantes con resultados positivos por IgM se le realizó un PCR en tiempo real y luego fueron remitidas a manejo especializado para confirmación, con el fin de instaurar el tratamiento.



**Gráfica 5. Punto de corte de cap-ELISA IgM anti-*Toxoplasma*.** Las muestras analizadas por la prueba an-ELISA IgM anti-*Toxoplasma* se representan en el eje X, con sus respectivas absorbancias en el eje Y. La línea roja muestra el punto de corte (0.234) obtenido en la calibración por el equipo automatizado Elisis Uno.



**Detección de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma***

**Gráfica 6. Frecuencia de detección de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma*.** Se representan los porcentajes de muestras negativas (barra negra) y de muestras positivas (barra gris) para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma*.

#### **4.5. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (IFI)**

Un panel de 25 sueros fue analizado por la prueba de IFI, que fue realizada en el Instituto Nacional de Salud (Anexo 4). De las muestras de suero analizadas, 60% correspondió a muestras positivas y 40% a muestras negativas (Tabla 8).

Muestras analizadas por IFI	Títulos de anticuerpos obtenidos	Resultado	Porcentaje
1	1:2048	Positivo	60%
1	1:1024	Positivo	
2	1:512	Positivo	
5	1:256	Positivo	
6	1:128	Positivo	
10	> 1:16	Negativo	40%

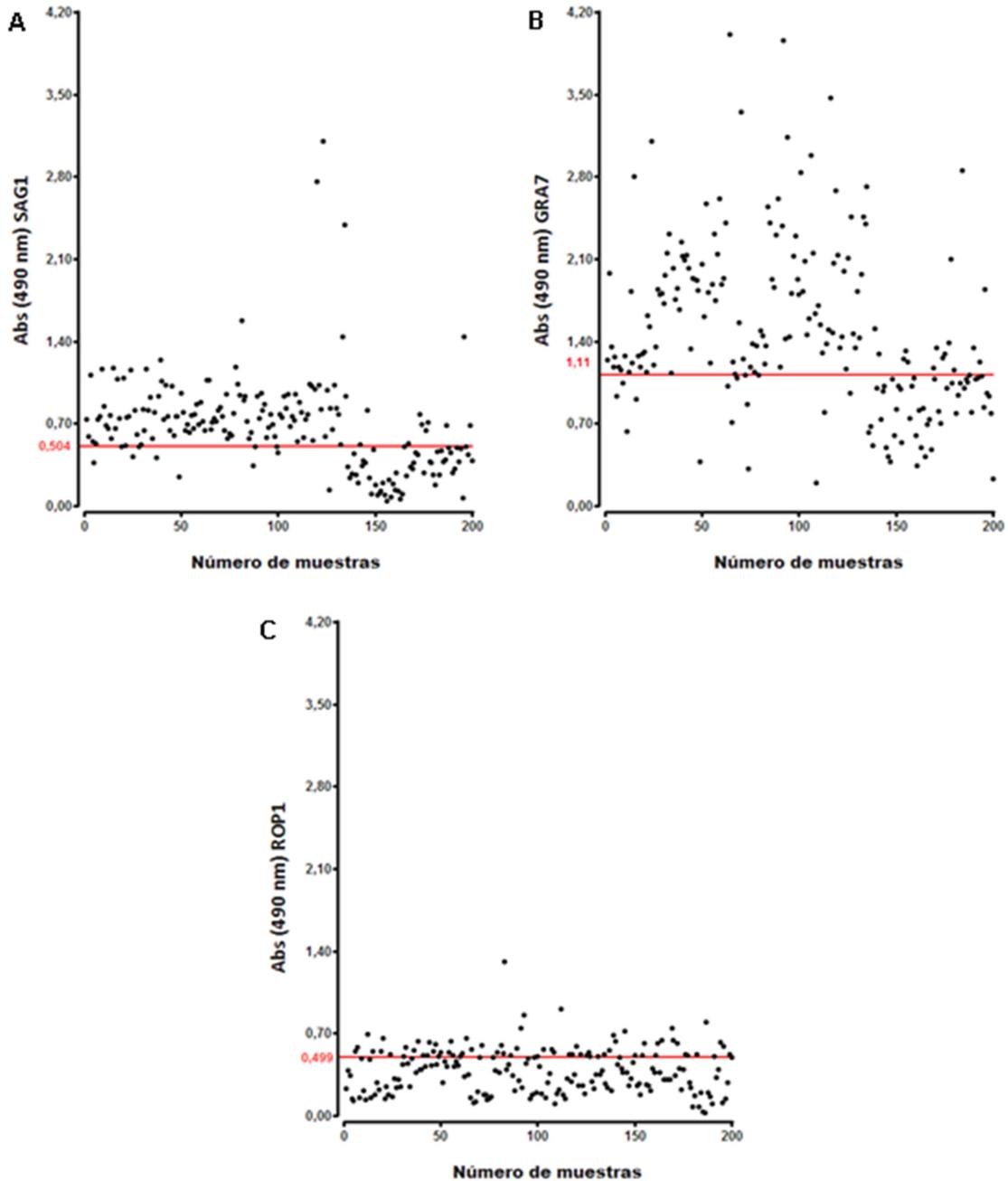
**Tabla 8. Resultados de IFI IgG anti-*Toxoplasma*.** Del total de muestras del estudio, 25 fueron seleccionadas y analizadas por la prueba de IFI, de las cuales 15 (60%) resultaron positivas para anticuerpos anti-*Toxoplasma* con títulos de 1:128 hasta 1:2048, y 10 fueron negativas con títulos menores a 1:16.

#### 4.6. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* POR rec-ELISA

200 de las 371 muestras procesadas por la prueba an-ELISA fueron divididas en dos grupos: el grupo 1 (n= 135) de muestras positivas y el grupo 2 (n= 65) de muestras negativas. Ambos grupos fueron evaluados por la prueba rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* con los antígenos rSAG1, rGRA7 y rROP1 de *T. gondii*. Con base en los puntos de corte mostrados en la Gráfica 7, de las 135 muestras del grupo 1 solo 128 (94.8%) fueron reactivas para el antígeno rSAG1 y 54 (83%) de las 65 muestras del grupo 2 fueron también negativas para este antígeno (Tabla 9). Al evaluar el grupo 1 con el antígeno rGRA7 se detectó anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* en 121 muestras (89.6%), mientras que en el grupo 2 solo 47 (72.3%) de las 65 muestras fueron negativas (Tabla 9). Por otro lado, al examinar el antígeno rROP1, solo 50 (37%) de las muestras del grupo 1 fueron positivas y 43 (66.1%) del grupo 2 fueron negativas (Tabla 9).

IgG rec-ELISA	N° sueros positivos	N° sueros negativos
	Grupo 1 (n= 135)	Grupo 2 (n=65)
rSAG1	128 (94.8%)	54 (83%)
rGRA7	121 (89.6)	47 (72.3)
rROP1	50 (37%)	43 (66.1%)

Tabla 9. Resultados de la prueba rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.



**Gráfica 7. Evaluación de los antígenos recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1 mediante la prueba rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.** A, B y C representan las muestras (eje X) evaluadas con los antígenos recombinantes (rSAG1, rGRA7 y rROP1, respectivamente) y sus correspondientes absorbancias (eje Y). Las líneas rojas ilustran los puntos de corte del rec-ELISA IgG con cada antígeno recombinante; cada punto de corte corresponde a la media más dos veces la desviación estándar de las absorbancias obtenidas con 15 sueros de pacientes sanos.

#### 4.7. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* POR rec-ELISA

De las 371 muestras evaluadas por la prueba cap-ELISA IgM anti-*Toxoplasma*, 200 de estas fueron clasificadas en dos grupos: un grupo de muestras positivas (grupo 1; n= 14) y un grupo de muestras negativas (grupo 2; n= 186), que luego fueron analizadas por la técnica rec-ELISA IgM anti-*Toxoplasma* al emplear los antígenos rSAG1, rGRA7 y rROP1. Con base en los puntos de corte representados en la Gráfica 8, de las 14 muestras pertenecientes al grupo 1, 5 fueron reactivas contra el antígeno rSAG1 (35.7%), 13 contra el antígeno rGRA7 (92.8%) y 12 frente al antígeno rROP1 (85.7%). Por otro lado, para el grupo 2 fueron igualmente negativas 141 muestras (75.8%) para el antígeno rSAG1, 167 muestras (89.8%) para el antígeno rGRA7 y 163 (87.6%) para el antígeno rROP1 (Tabla 10).

IgM rec-ELISA	N° sueros positivos	N° sueros negativos
	Grupo 1 (n= 14)	Grupo 2 (n= 186)
rSAG1	5 (35.7 %)	141 (75.8 %)
rGRA7	13 (92.8 %)/	167 (89.8)
rROP1	12 (85.7 %)	163 (87.6 %)

Tabla 10. Resultados de la prueba rec-ELISA IgM.

#### 4.8. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS an-ELISA IgG ANTI-TOXOPLASMA, rec-ELISA IgG Y rec-ELISA IgM CON LOS ANTÍGENOS rSAG1, rGRA7 Y rROP1

##### 4.8.1. Determinación de la Sensibilidad y Especificidad de la Prueba an-ELISA IgG

Para determinar la sensibilidad y la especificidad de la técnica an-ELISA IgG frente a los resultados encontrados por la prueba de IFI, se tomó como muestra 25 sueros que incluían 15 positivos y 10 negativos por la técnica IFI. Al evaluar las 15 muestras positivas por la prueba an-ELISA IgG, 14 fueron positivas y una fue falsa negativa (tabla 11), indicando una sensibilidad de 93.33 % para esta prueba en comparación a IFI (tabla 12).

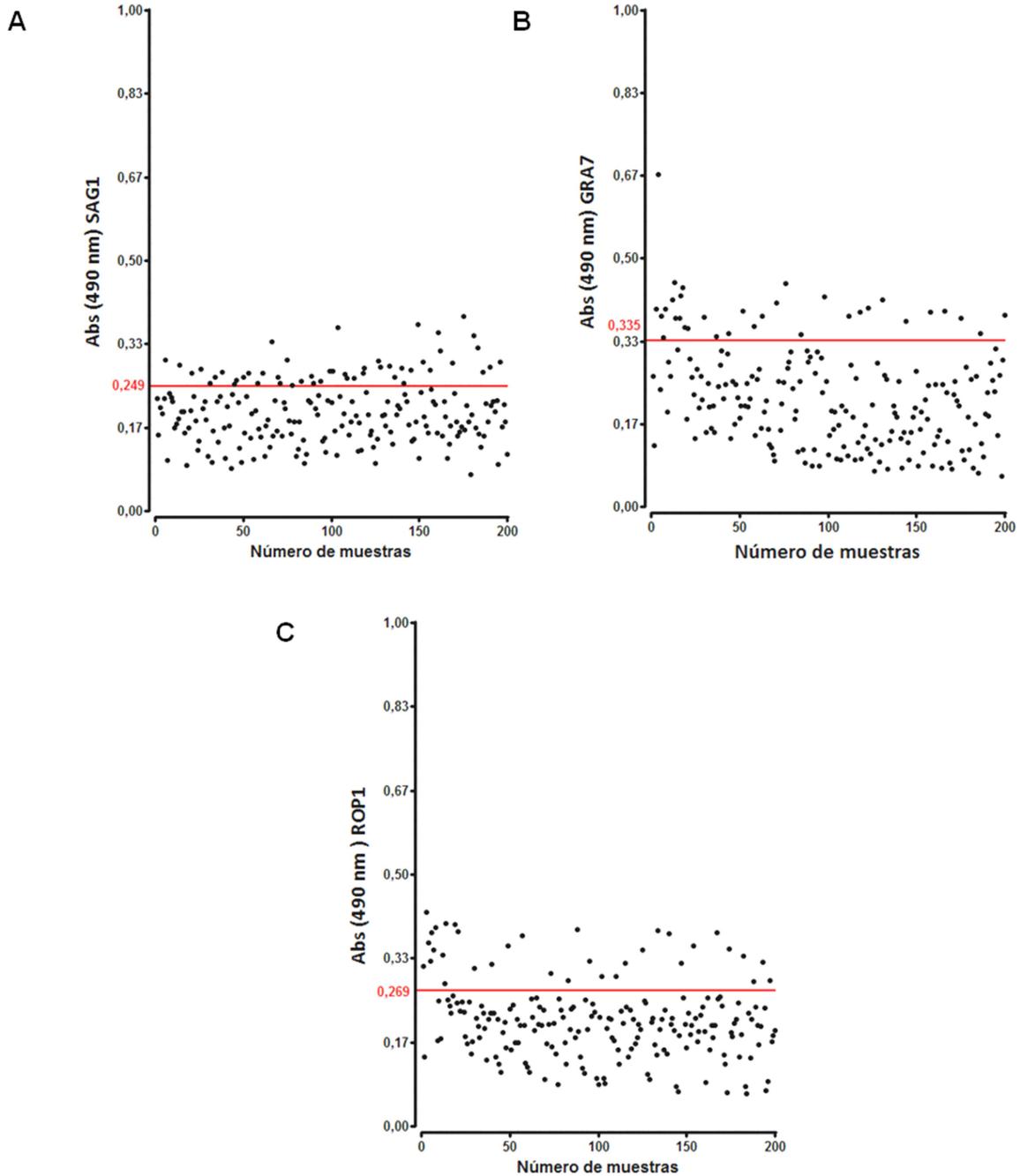
an-ELISA IgG	IFI IgG		TOTAL
	Positivo (15)	Negativo (10)	
Positivo	14	3	17
Negativo	1	7	8
TOTAL	15	10	25

**Tabla 11. Resultados encontrados por la prueba an-ELISA.**

De las muestras negativas por la prueba IFI, 7 fueron negativas y 3 fueron falsas positivas (Tabla 11) cuando se evaluaron por an-ELISA IgG, indicando una especificidad de 70% frente a la técnica de referencia (Tabla 12). Al comparar los resultados del an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.

an-ELISA IgG	Porcentaje (%)
Sensibilidad	93.3
Especificidad	70.0
Valor predictivo (+)	82.4
Valor predictivo (-)	87.5

**Tabla 12. Sensibilidad y especificidad de la prueba an-ELISA IgG.**



**Gráfica 8. Evaluación de los antígenos recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1 mediante la prueba rec-ELISA IgM anti-*Toxoplasma*.** El eje X ilustra las muestras analizadas mediante rec-ELISA IgM con los antígenos rSAG1 (A), rGRA7 (B) y rROP1 (C) y sus respectivas absorbancias (eje Y). La línea roja muestra el punto de corte que corresponde a la media más tres veces la desviación estándar de las absorbancias obtenidas con 15 sueros de pacientes sanos.

#### 4.8.2. Determinación de la Sensibilidad y Especificidad de la Prueba rec-ELISA IgG Empleando los Antígenos rSAG1, rGRA7 y rROP1

La sensibilidad y la especificidad de la técnica rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* con los antígenos rSAG1, rGRA7 y rROP1 se determinó de la misma manera que el an-ELISA, al comparar los resultados de la prueba rec-ELISA IgG frente a los resultados encontrados de la prueba IFI. De las muestras positivas por IFI, 14 fueron positivas y una fue falsa negativa cuando se utilizó la prueba rec-ELISA IgG empleando el antígeno rSAG1. Cuando se utilizó el antígeno rGRA7, 13 muestras fueron positivas y dos fueron falsas negativas. Por otro lado, cuando se evaluaron las muestras con el antígeno recombinante rROP1, solo cinco muestras fueron reactivas y 10 resultaron falsas negativas con respecto a la técnica de referencia (Tabla 13). Lo anterior indica una sensibilidad del 93.33% para la prueba rec-ELISA IgG al emplear el antígeno rSAG1, de 86.7% con el antígeno rGRA7 y 33.3% con el antígeno rROP1 (Tabla 14).

rec-ELISA IgG		IFI IgG		Total
		Positivo (n= 15)	Negativo (n= 10)	
rSAG1	Positivo	14	1	15
	Negativo	1	9	10
	Total	15	10	25
rGRA7	Positivo	13	2	15
	Negativo	2	8	10
	Total	15	10	25
rROP1	Positivo	5	5	10
	Negativo	10	5	15
	Total	15	10	25

**Tabla 13. Resultados prueba rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* frente a la prueba de referencia (IFI).**

Por otra parte, al evaluar las 10 muestras negativas por IFI por la prueba rec-ELISA con el antígeno rSAG1, nueve fueron negativas y una fue falsa positiva, mientras que ocho fueron positivas y dos falsas positivas con el antígeno rGRA7 y se encontraron cinco negativas y cinco falsas positivas con el antígeno rROP1 (Tabla 13). En comparación a la prueba de referencia (IFI), la prueba rec-ELISA

IgG con el antígeno rSAG1 frente presenta una especificidad de 90%, siendo los valores predictivo positivo y negativo de 93.3% y 90%, respectivamente. Entretanto, la especificidad de la prueba rec-ELISA IgG con el antígeno rGRA7 fue de 80%, con valores predictivo positivo y negativo de 86.7% y 80%. De otro lado, la especificidad de la prueba rec-ELISA IgG fue de 50% con el antígeno rROP1, con valores predictivo positivo y negativo de 50% y 33%, respectivamente (Tabla 14).

<b>Antígenos Recombinantes</b>	<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>	<b>Valor Predictivo Positivo (%)</b>	<b>Valor Predictivo Negativo (%)</b>
<b>rSAG1</b>	93.3	90	93.3	90
<b>rGRA7</b>	86.7	80	86.7	80
<b>rROP1</b>	33.3	50	50	33.3

**Tabla 14. Sensibilidad y especificidad de la prueba rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.**

#### **4.8.3. Determinación de la Sensibilidad y Especificidad de la Prueba rec-ELISA IgM Empleando los Antígenos Recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1**

Para determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba rec-ELISA IgM, 200 muestras fueron evaluadas por la prueba cap-ELISA IgM, de las cuales 14 fueron positivas y 186 negativas. De las muestras positivas por la prueba IgM de captura, 5 fueron positivas y 9 fueron falsas negativas por la prueba rec-ELISA IgM empleando rSAG1, mientras que 13 fueron positivas y una fue falsa negativa cuando se usó rGRA7; en cambio, 12 muestras fueron positivas y 2 falsas negativas cuando se utilizó rROP1 (Tabla 15). Esto indica una sensibilidad de 35.7% para la prueba rec-ELISA IgM utilizando el antígeno rSAG1, 92.9% con rGRA7 y 85.7% cuando se usó rROP1 (Tabla 16).

rec-ELISA IgM		cap-ELISA IgM		Total
		Positivo (14)	Negativo (186)	
rSAG1	Positivo	5	45	50
	Negativo	9	141	150
	Total	14	186	200
rGRA7	Positivo	13	19	32
	Negativo	1	167	10
	Total	14	186	200
rROP1	Positivo	12	23	35
	Negativo	2	163	165
	Total	14	186	200

**Tabla 15. Resultados encontrados por la prueba rec-ELISA IgM anti-*Toxoplasma* frente a la prueba cap-ELISA IgM.**

Por otra parte, de las muestras negativas por cap-ELISA IgM, 141 fueron negativas y 45 falsas positivas por la prueba rec-ELISA IgM empleando el antígeno rSAG1, 167 fueron negativas y 19 falsas positivas al emplear el antígeno rGRA7, mientras que con el antígeno rROP1 163 fueron negativas y 23 falsas positivas (Tabla 15). Lo anterior indica que la especificidad de la prueba rec-ELISA IgM para el antígeno rSAG1 fue de 75.8% con valores predictivo positivo y negativo de 10% y 94% respectivamente; la especificidad para el antígeno rGRA7 fue de 89.8% con valores predictivo positivo y negativo de 40.6% y 99.4%; mientras que para el antígeno rROP1 la especificidad fue de 87.6% con valores predictivo positivo y negativo de 34.3% y 98.8% respectivamente (Tabla 16).

Antígenos Recombinantes	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo Positivo (%)	Valor Predictivo Negativo (%)
rSAG1	35.7	75.8	10	94
rGRA7	92.9	89.8	40.6	99.4
rROP1	85.7	87.6	34.3	98.8

**Tabla 16. Sensibilidad y especificidad de la prueba rec-ELISA IgM anti-*Toxoplasma*.**

#### 4.9. ANÁLISIS DE CONCORDANCIA PARA LAS PRUEBAS an-ELISA IgG, rec-ELISA IgG Y rec-ELISA IgM ANTI-TOXOPLASMA FRENTE A LA PRUEBA DE IFI

##### 4.9.1. Análisis de Kappa de Cohen para las Pruebas an-ELISA IgG y rec-ELISA IgG Frente a la Técnica IFI

El análisis de concordancia de los resultados encontrados por la prueba an-ELISA IgG frente a la prueba IFI mediante el índice de Kappa ( $\kappa$ ) resultó en un valor de 0.65, que equivale a un grado de concordancia bueno según la escala de valores para este índice. Por otro lado, el valor de  $\kappa$  encontrado entre la prueba rec-ELISA IgG empleando el antígeno recombinante rSAG1 y la prueba de referencia (IFI) fue de 0.83 (C 95%  $p < 0.005$ ), indicando un grado de acuerdo excelente. En tanto, para el antígeno rGRA7 el valor de  $\kappa$  fue 0.66 (C 95%  $p < 0.005$ ), lo que demuestra un grado de acuerdo bueno. Sin embargo, para el antígeno rROP1 el valor de  $\kappa$  fue de -0.15 (C 95%  $p < 0.005$ ), lo que indica un grado de acuerdo deficiente (Tabla 17).

Prueba	$\kappa$ (C 95% $p < 0.005$ )	Interpretación
an-ELISA IgG	0.65	Bueno
rec-ELISA IgG (rSAG1)	0.83	Excelente
rec-ELISA IgG (rGRA7)	0.66	Bueno
rec-ELISA IgG (rROP1)	-0.15	Deficiente

**Tabla 17. Resultados del índice de Kappa ( $\kappa$ ) de las pruebas an-ELISA IgG y la prueba rec-ELISA IgG.** La prueba con el mayor grado de concordancia fue la rec-ELISA IgG con el antígeno rSAG1, con un grado de acuerdo excelente (0.83); le siguen con grado de acuerdo bueno la prueba rec-ELISA IgG con el antígeno rGRA7 y an-ELISA IgG (0.66 y 0.65 respectivamente).

#### 4.9.2. Análisis de Kappa de Cohen para la Pruebas rec-ELISA IgM Frente a la Técnica cap-ELISA IgM

El análisis de concordancia de los resultados encontrados por la prueba rec-ELISA IgM utilizando el antígeno rSAG1 frente la prueba cap-ELISA IgM produjo un valor de  $\kappa$  de 0.036, que corresponde a un grado de acuerdo deficiente ( $p > 0.005$ ) en la escala de valores para este índice. Cuando se comparó la prueba rec-ELISA con el antígeno rGRA7 y la prueba de referencia, el valor de  $\kappa$  fue de 0.548, lo que denota un grado de acuerdo aceptable. Por otra parte, cuando se evaluó la prueba rec-ELISA con el antígeno rROP1 se encontró un valor de  $\kappa$  de 0.41, que corresponde también a un grado de acuerdo aceptable (Tabla 18).

Prueba	$\kappa$ (C 95% $p < 0.005$ )	Interpretación
rec-ELISA IgM (rSAG1)	0.036	Deficiente
rec-ELISA IgM (rGRA7)	0.548	Aceptable
rec-ELISA IgM (rROP1)	0.41	Aceptable

Tabla 18. Resultados del índice de Kappa ( $\kappa$ ) de la prueba rec-ELISA IgM.

#### 4.10. PRUEBA ELISA IgG E IgM ANTI-TOXOPLASMA Y FACTORES DE RIESGO

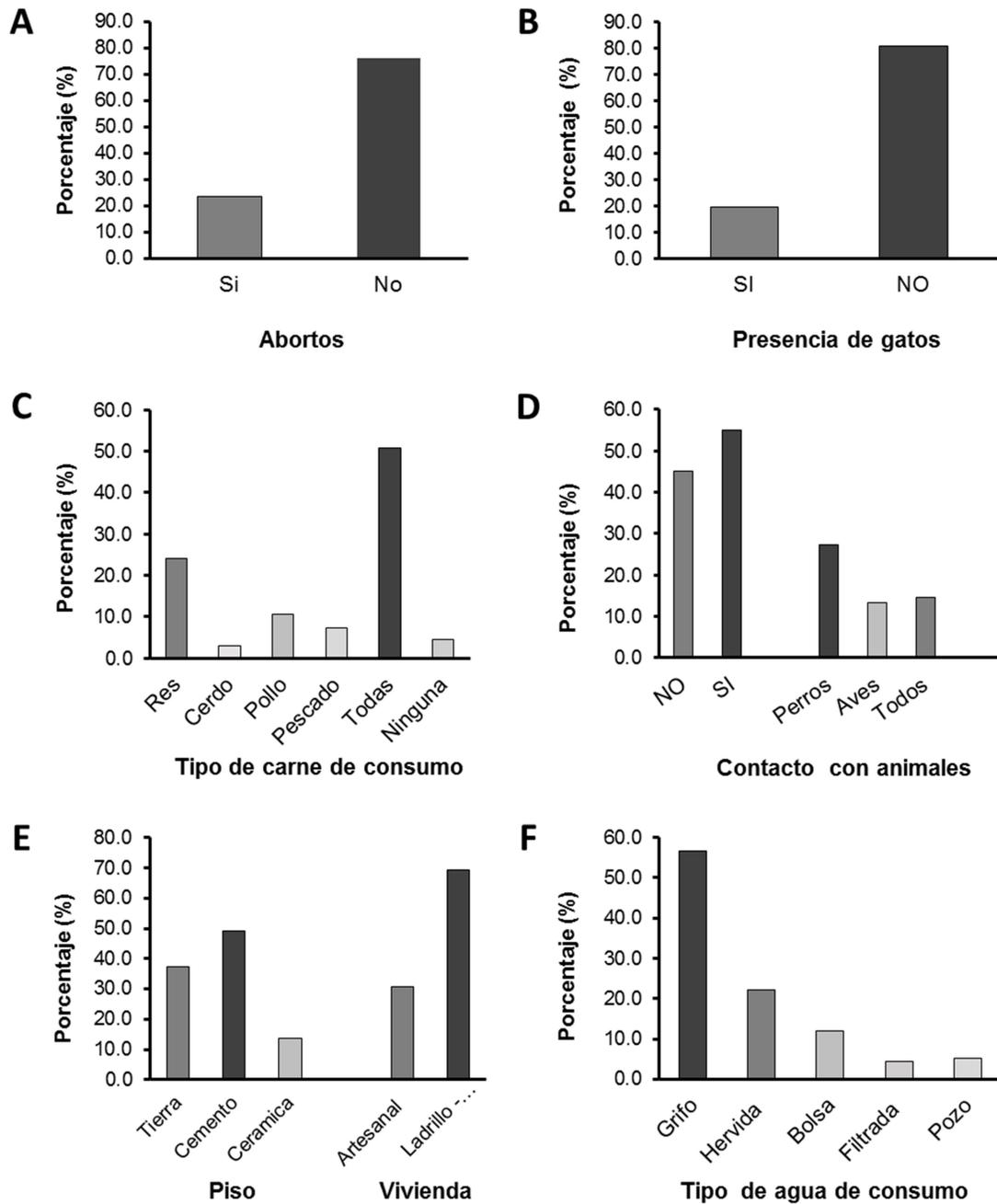
De las 371 gestantes incluidas en el estudio, 255 resultaron positivas para anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* mediante la prueba an-ELISA. Del total de gestantes, 76% manifestaron no haber presentado abortos previos a la gestación; sin embargo, 24% presentaron abortos (Gráfica 9A). Un alto porcentaje de las gestantes del estudio manifestaron no tener gatos, ni convivir con ellos en sus viviendas (80.6%), mientras que el 55% si tuvieron contacto con estos (Gráfica 9B).

El 50.7% de las gestantes del estudio manifestó comer varias carnes en su dieta, principalmente carne de res (24%) (Gráfica 9C). El 55% de las gestantes tuvieron contacto con animales domésticos, principalmente con perros (27.2%) (Gráfica 9D).

En cuanto a las condiciones de la vivienda, un alto porcentaje (69.3%) de las gestantes del estudio manifestaron residir en casas de ladrillo y cemento, mientras que 30.7% residían en viviendas artesanales. Además, 49.1% de las gestantes residían en viviendas con piso de cemento mientras que 37.2% en viviendas con piso de tierra (Gráfica 9E).

Se observó además que el mayor porcentaje de las gestantes del estudio consumían agua directamente del grifo (56.6%), y un porcentaje menor de gestantes (22.1%) consumía agua hervida (Gráfica 9F).

A partir de la comparación por  $X^2$  de las proporciones de cada una de las variables y los resultados de la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*, se encontró que los resultados positivos para anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* mostraron una asociación significativa ( $X^2= 6.26$ ;  $p= 0.0437$ ) con el tipo de piso de la vivienda, especialmente con las viviendas con piso de tierra ( $X^2= 6.26$ ;  $p= 0.0437$ ) (Anexo 6). En contraste, no se encontró asociación significativa entre las variables presencia de gatos y positividad para anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* ( $X^2= 0.18$ ;  $p= 0.66$ ). Tampoco se encontró asociación significativa entre los hábitos alimenticios (consumo de carnes) ( $X^2= 7.33$ ;  $p= 0.197$ ) y el consumo de agua sin tratar ( $X^2= 3.30$ ;  $p= 0.50$ ) con la presencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* (Anexo 6). Asimismo, no se encontró relación entre la edad y la edad gestacional con la positividad para anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* (Anexo 7).



**Gráfica 9. Factores asociados con la presencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* en gestantes del departamento de Sucre.** A) Frecuencia de abortos en las gestantes. B) Presencia de gatos. C) Consumo de carne en las gestantes. D) Contacto con animales domésticos. E) Frecuencia del material de la vivienda. F) Consumo de Agua en las gestantes.

De otro lado, de las 14 gestantes positivas para anticuerpos tipo IgM anti-*Toxoplasma*, 10 fueron positivas altas por IgG, 10 gestantes tenían una edad entre 13 y 23 años, mientras que cuatro gestantes estaban entre los 24 y 33 años. Según su periodo de gestación, seis estaban en el segundo trimestre, cinco en el tercer trimestre y tres en el primer trimestre (Anexo 8). Al comparar por  $\chi^2$  los resultados obtenidos por la prueba IgM anti-*Toxoplasma* con las proporciones de las variables analizadas, no fue posible establecer relación estadísticamente significativa entre los resultados positivos para anticuerpos tipo IgM anti-*Toxoplasma* y el contacto con gatos, la fuente de agua para el consumo o el material del piso de vivienda, entre otras variables (Anexo 8).

## 5. DISCUSIÓN

En este estudio se encontró una alta seroprevalencia (68.7%) de anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* en gestantes del departamento de Sucre, lo que demuestra que las gestantes participantes del estudio tuvieron contacto con el parásito en algún momento de su vida. Estos datos son similares a los reportados en otro estudio realizado en la capital del departamento de Sucre, donde se encontró una seroprevalencia de 56% al emplear la prueba ELFA IgG anti-*Toxoplasma* (Machado et al., 2004), y en otro estudio en la ciudad de Valledupar en el cual se empleó la prueba IFI se reportó una seroprevalencia de 58% (Jacome, 2007). Estos resultados corroboran los reportados por el Instituto Nacional de Salud en donde la seroprevalencia más alta fue encontrada en la Costa Atlántica (56.8%-73%) (Juliao et al., 1983).

Por otro lado, estudios de toxoplasmosis en gestantes realizados en otras ciudades de Colombia reportan altas tasas de seroprevalencia. En Yopal se encontró una seroprevalencia de 77% y en Villavicencio de 52.5%, ambas mediante la prueba IFI (Castro et al., 2008). En Quindío la seroprevalencia en gestantes fue de 60% a 63% al utilizar las pruebas IFI y ELISA IgG (Gómez, 2002). Entretanto, en un estudio realizado en Bogotá se encontró seroprevalencia de 47% al emplear la técnica de IFI IgG (Barrera et al., 2002) mientras que en la ciudad de Cali se reportó una seroprevalencia de 46.2% al emplear la prueba ELISA IgG (Rosso et al., 2006).

Diferentes reportes en las regiones de Colombia muestran que más de la mitad de las mujeres en gestación (50% al 60%) tienen anticuerpos anti-*Toxoplasma*, lo que indica una alta exposición y circulación del parásito en nuestro país (Gómez, Ruiz, Silva, Cortés, & Beltrán, 2007).

La alta seroprevalencia de anticuerpos tipo IgG en el departamento de Sucre, así como en algunas regiones de Colombia y el mundo, está relacionada principalmente con algunos factores como el clima y la altitud sobre el nivel del mar. Ciertas condiciones climáticas favorecen la supervivencia de *T. gondii* en el

medio, ya que los ooquistes del parásito son capaces de sobrevivir en suelo húmedo y caliente; además pueden soportar la exposición a desecado y temperaturas ambientales altas constantes hasta por 18 meses (Saravia, 2004), lo que podría explicar la alta prevalencia de la enfermedad en zonas de climas templados y tropicales como los de nuestro país. Por tanto, se considera que los ooquistes y la supervivencia de estos son una pieza clave en la cadena epidemiológica de *T. gondii*; así mismo son considerados un determinante en la distribución y conservación de la infección en la naturaleza (Atías, 1997) (J. Dubey & Lappin, 2000).

Referente a la altitud, varios estudios han demostrado que existe una relación entre las tasas de seroprevalencia y la altitud sobre el nivel del mar del lugar estudiado. Por ejemplo, aunque en Colombia la seroprevalencia de la toxoplasmosis de la población general es de 47%, las tasas más altas se reportan en regiones con menor elevación sobre el nivel del mar como es la costa atlántica (56.8%-73%) y los llanos orientales (57.7%-66.2%), mientras que seroprevalencias más bajas se reportan en la región pacífica (33%-37.6%) y región central (31.6%-41.7%) (Juliao et al., 1983).

Adicionalmente, la infección por *T. gondii* es considerada una parasitosis de distribución mundial, reportándose mayores seroprevalencias en zonas de climas cálidos, húmedos o tropicales y menores prevalencias en zonas áridas y frías del mundo (Saravia, 2004). Es así que las seroprevalencias registradas van de 10.9% a 58.5% en Europa, 16% a 40% en Norte América, 35% a 76% en Centro América, 29.7% a 72% en Sur América, 21.9% a 58% en Asia y 11% a 77.1% en África (Kesenthri, 2009).

Además, aparte de los factores ambientales existen otros que influyen en la seroprevalencia e incidencia de la infección por *Toxoplasma*, como lo son factores socio-culturales, hábitos alimenticios y condiciones higiénico sanitarias (Petersen, 2007).

Por otro lado, la frecuencia de detección de anticuerpos tipo IgM anti-*T. gondii* encontrada en esta investigación fue de 3.8%, similar a la reportada en otros estudios realizados en diferentes regiones en donde las frecuencias de IgM anti-*T. gondii* en el embarazo van de 0.6% a 3% (Barrera et al., 2002) (Gómez et al., 2007). También se ha encontrado que los resultados positivos por IgM anti-*T. gondii* están presentes en aproximadamente el 4% a 5% de la población colombiana de mujeres gestantes (Gómez et al., 2007). Estudios realizados en Perú por Reátegui y colaboradores en el 2009 reportaron una frecuencia de detección de anticuerpos IgM anti-*T. gondii* de 3.1% en 355 gestantes estudiadas (Reátegui & Vela, 2011), similar a la frecuencia encontrada por esta investigación.

La alta frecuencia de anticuerpos IgM encontrada en este y otros estudios a nivel nacional puede estar relacionada con la duración de los títulos de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma* en un paciente, debido a que estos pueden permanecer detectables durante varios meses e incluso años después de producida la infección primaria (Montoya, 2002). Por tal motivo, para determinar la incidencia de la infección por *T. gondii* es necesario la puesta en práctica de otros métodos (prueba de avidéz, PCR) que permitan estimar los casos clínicos de la enfermedad, puesto que la seropositividad de la IgM anti-*Toxoplasma* no se puede tomar por sí sola como un indicador de infección reciente. En consecuencia, el papel principal de la IgM anti-*Toxoplasma* radica en que su ausencia descarta la infección reciente, pero su presencia por el contrario, implica la necesidad de determinar el estado de infección por el parásito (Sierra et al., 1998).

Para evaluar los antígenos rSAG1, rGRA7 y rROP1 en la detección de anticuerpos IgG e IgM se conformaron dos grupos de muestras de sueros para el análisis de cada inmunoglobulina. Para el análisis de anticuerpos IgG, el grupo 1 estuvo formado por 135 muestras positivas y el grupo 2 por 65 muestras negativas, mientras que para la detección de anticuerpos IgM los grupos estuvieron conformados por 14 muestras positivas (grupo 1) y 186 muestras negativas (grupo 2). Los antígenos rSAG1 y rGRA7 mostraron una alta reactividad en la detección de anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* en el grupo de muestras de sueros

positivos, con una sensibilidad de 94.8% y 89.6% respectivamente, mientras que el antígeno rROP1 reaccionó solo con 37% de las muestras positivas. Por otro lado, los antígenos que mostraron mayor reactividad con anticuerpos IgM fueron los antígenos rGRA7 (92.8%) y rROP1 (85.7%), y con una menor reactividad el antígeno rSAG1 (35.7%).

Los datos anteriores evidencian la elevada capacidad de detección del antígeno rSAG1 por anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma*, lo que demuestra su utilidad como marcador en el diagnóstico de toxoplasmosis crónica. Esto puede obedecer entre otras razones a que SAG1 es un antígeno específico del estado de taquizoíto, es conservado en la mayoría de los aislados de *T. gondii*, es el antígeno más abundante en la superficie del parásito y es el primer componente de contacto con la célula huésped (Liu et al., 2006; Selseleh, Keshavarz, Mohebbali, Shojaei, Modarressi, et al., 2012), además de considerarse como el antígeno más inmunogénico. Varios estudios en humanos han demostrado la reactividad de este antígeno con marcadores serológicos específicos de infección crónica (Harning, Spenter, Metsis, Vuust, & Petersen, 1996; Kotresha & Noordin, 2010).

Asimismo, el antígeno rGRA7 mostró una destacada detección de anticuerpos tipo IgG e IgM anti-*Toxoplasma*, lo que indica que GRA7 es un buen marcador tanto para la detección de anticuerpos tanto en fase aguda como crónica. Esto puede obedecer a que GRA7 es secretado por el taquizoíto y el bradizoíto y constituye el mayor componente en la vacuola que rodea al primero y hace parte de la pared del quiste que rodea al segundo, lo que podría explicar por qué rGRA7 puede reaccionar con sueros de pacientes tanto en fase aguda como crónica (Selseleh, Keshavarz, Mohebbali, Shojaei, Eshragian, et al., 2012).

De otro lado, el antígeno rROP1 solo reaccionó ampliamente con el grupo de sueros positivos para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma*. La detección de anticuerpos de fase aguda utilizando rROP1 podría relacionarse al papel de la proteína nativa en etapas tempranas de la infección, cuando interviene en la

formación de la vacuola parasitófora durante el proceso de invasión del parásito a la célula huésped (Dlugonska, 2008).

La prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* empleada en este estudio tuvo una sensibilidad de 93.3% y una especificidad de 70%, similar a las reportadas en investigaciones previas. Uchoa et al, encontró una sensibilidad de 96.7% y una especificidad de 75% (Uchoa et al., 1999) mientras que Santa cruz et al., reportó una sensibilidad de 75% y una especificidad de 84% (Santa Cruz Rodríguez, Figueroa Vaca, Condori, & Rioan, 2007).

El índice de concordancia existente entre la prueba an-ELISA IgG y la prueba IFI IgG anti-*Toxoplasma* corresponde a un grado de acuerdo bueno (0.65) con respecto a la escala de valores para *K*. Estudios previos reportan un grado de acuerdo excelente (0.91) (Cortés & Mancera, 2009), mientras que Uchoa y colaboradores reportan un grado de acuerdo aceptable entre estas dos técnicas (0.55) (Uchoa et al., 1999). Entretanto, otro estudio que se realizó con una variante de la técnica ELISA (Dot-ELISA) reporta un grado de acuerdo excelente (0.90) (Mehrabani, Malekpour, Zahedi, Dehghani, & Tondro, 2012). Sin embargo, existen pocos reportes sobre el índice de concordancia para estas pruebas en humanos puesto que la mayoría de los estudios realizados han sido en el campo de la veterinaria y utilizando diferentes técnicas. En este sentido se ha reportado un grado de acuerdo de 0.69 al comparar las pruebas IFI y ELISA (Silva, Cabral, Bernardina, Souza, & Mineo, 1997) en muestras de perros, mientras que se reportan índices de 0.46 (Germani & Pacheco, 2002) y 0.69 (Ishizuka, D'Angalino, & Souza, 1986) en muestras de cerdos, 0.24 en borregos (Huerta, Chávez, Casas, Falcón, & Raymundo, 2006) y 0.73 en gatos (Cerro, Chávez, Casas, Suárez, & Rubio, 2009) cuando se compara la prueba IFI y la prueba de hemaglutinación indirecta.

Las diferencias en los índices de concordancia entre las prueba an-ELISA IgG e IFI IgG anti-*Toxoplasma* en sueros humanos pueden estar relacionadas con los diferentes antígenos que emplean los distintos estuches comerciales de ELISA con respecto a la prueba de referencia. Por ejemplo, para utilizar parásitos

sonicados como antígenos, estos son producidos en fluido peritoneales de ratones infectados y luego cultivados, por lo que tales antígenos podrían contener residuos de los medios de cultivo, proteínas y otras macromoléculas que potencialmente pueden influir en los resultados de la prueba en la forma de falsos positivos y falsos negativos (Beghetto et al., 2006; Dai et al., 2012). Esto finalmente se refleja en la reducida sensibilidad y especificidad de los ensayos y puede interferir en la interpretación y manejo adecuado de los casos de infección (Hassl, Muller, & Aspöck, 1991; Remington et al., 2004). Ello podría también explicar las diferencias observadas entre el número de muestras positivas y negativas detectadas por las pruebas an-ELISA IgG y la prueba IFI IgG anti-*Toxoplasma* en este estudio, y la presencia de varios falsos positivos y falsos negativos cuando se emplearon taquizoítos sonicados como antígenos en las pruebas serológicas. No obstante, los valores de sensibilidad y especificidad de esta prueba junto con los resultados del análisis de *K* (grado de acuerdo bueno), permiten validar el empleo de la técnica an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* en el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis como prueba de rutina o como prueba para el tamizaje de la toxoplasmosis congénita, especialmente cuando no se cuenta con las instalaciones necesarias para la realización de la prueba IFI IgG, la cual es considerada una prueba de referencia por su alta sensibilidad y especificidad (Cortés & Mancera, 2009).

En este estudio se evaluó la utilidad del diagnóstico de la prueba rec-ELISA IgG e IgM empleando tres antígenos recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1 en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita en dos grupos de sueros (positivos y negativos). Para ello, se calculó la sensibilidad y especificidad de esta prueba con cada uno de los antígenos al correlacionar los resultados con la prueba de IFI e IgM de captura respectivamente.

La sensibilidad de la prueba rec-ELISA IgG anti-*Toxoplasma* al emplear el antígeno rSAG1 fue de 93.3% y su especificidad de 90%; al comparar estos resultados con el an-ELISA, la sensibilidad fue igual para ambas pruebas pero la especificidad fue mayor para la prueba rec-ELISA utilizando el antígeno rSAG1.

Estos resultados son similares a los reportados por Selseleh et al., en los que se encontró una sensibilidad de 93% y una especificidad de 95% en gestantes con infección crónica (Selseleh, Keshavarz, Mohebbali, Shojaee, Modarressi, et al., 2012). Otros estudios realizados reportaron una sensibilidad de 88.4% y una especificidad de 88% para la prueba rec-ELISA IgG, comparado con los resultados que se obtuvieron al emplear un kit de ELISA comercial (Jalallou et al., 2010), mientras Aubert et al., reportaron una sensibilidad de 83% al emplear este antígeno en pacientes con infección crónica (Aubert et al., 2000).

Por otro lado, la sensibilidad y la especificidad de la prueba rec-ELISA IgM de captura empleando el mismo antígeno fue de 35.7% y 75.8% respectivamente; estos resultados son similares a los reportados en otro estudio en el que se encontró una sensibilidad de 33.3% en pacientes en fase aguda (Kotresha & Noordin, 2010). Sin embargo, otros autores reportan sensibilidades menores a la encontrada en esta investigación; Pfrepper y colaboradores, reportaron una sensibilidad de 7.4% en la detección de anticuerpos tipo IgM anti-*Toxoplasma* (Pfrepper et al., 2005).

El antígeno SAG1 es una de las proteínas mayoritarias de superficie del parásito en el estadio de taquizoíto y es conservado en la totalidad de las cepas de *T. gondii*; además, es considerado el principal blanco de la respuesta inmune del hospedero y reacciona con la mayoría de los anticuerpos, principalmente IgG e IgM (Kotresha & Noordin, 2010). Los preparados antigénicos de SAG1 producidos en sistemas recombinantes y clonados en *E. coli* y levadura han demostrado estimular la respuesta inmune humoral y celular del huésped, proporcionando protección contra la infección por *T. gondii* (Wang & Yin, 2014); estas características de antigenicidad e inmunogenicidad han hecho de este antígeno un buen candidato para el serodiagnóstico. En tal sentido, varios estudios realizados con el antígeno SAG1 han demostrado su reactividad con anticuerpos en la fase aguda de la infección, mientras que en otros estudios la reactividad no fue observada en infección aguda sino en infección crónica (Kotresha & Noordin, 2010). En el presente trabajo se determinó que la detección de anticuerpos tipo

IgG anti-*Toxoplasma* contra el antígeno rSAG1 fue mayor en el grupo de gestantes con infección crónica, mientras que la detección de anticuerpos tipo IgM en muestras con posible infección aguda fue menor. La alta reactividad de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* contra rSAG1 en el grupo de sueros con infección previa, puede estar relacionada con el papel que cumplen algunos epitopes del antígeno SAG1 en la respuesta inmune humoral del huésped humano en la toxoplasmosis crónica (Selseleh, Keshavarz, Mohebbali, Shojaee, Modarressi, et al., 2012). Además, la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo tipo IgG en infecciones crónicas es más alta que la unión entre el antígeno y los anticuerpos de fase aguda. Por otra parte, la baja reactividad de rSAG1 con anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma* encontrada en el presente estudio, al igual que en otros reportes, podría obedecer a variantes en la composición de los epitopes del antígeno, ya que la reconstitución de epitopes es dependiente de la expresión del vector y de la purificación de la proteína (Pfrepper et al., 2005). Debido a que SAG1 es un antígeno altamente conformacional y a que con frecuencia la expresión en sistemas como *E. coli* resulta en una forma insoluble, podría perder su inmunorreactividad debido a un plegado incorrecto (Burg, Perelman, Kasper, Ware, & Boothrovd, 1988) y podría afectar la unión de las formas multimericas de IgM.

Por otro lado la sensibilidad y especificidad de la prueba rec-ELISA IgG al emplear el antígeno rGRA7 fue de 86.7% y de 80% respectivamente. Al comparar los resultados con la técnica an-ELISA, la especificidad fue mayor al emplear el antígeno rGRA7, pero su sensibilidad fue menor. Estos datos son similares a los reportados en estudios previos en los cuales se encontró una sensibilidad de 86.3% (Nigro et al., 2003), 89% (Selseleh, Keshavarz, Mohebbali, Shojaee, Eshragian, et al., 2012) y de 81% (D. Jacobs, Vercammen, & Saman, 1999). Entretanto, la especificidad varió con respecto a otros estudios; por ejemplo, Selseleh et al., reportaron una especificidad de 90% al emplear la prueba ELISA IgG (Selseleh, Keshavarz, Mohebbali, Shojaee, Eshragian, et al., 2012), mientras que al emplear como prueba diagnóstica el inmunobloting en gestantes con infección crónica se encontró una especificidad igual a 80% (Kotresha et al.,

2012). No obstante, la sensibilidad (92.9%) y la especificidad (89.8%) de la prueba ELISA IgM empleando rGRA7 fue mayor con respecto al ELISA IgG anti-*Toxoplasma*. Investigaciones previas reportan datos similares a los encontrados en el presente estudio; en una de ellas realizada en 2012 se reporta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 90% (Selseleh, Keshavarz, Mohebal, Shojaee, Eshragian, et al., 2012), mientras que otras reportan una sensibilidad menor de 88% (Araújo & Ferreira, 2011) y 68.9% (Kotresha & Noordin, 2010).

En el presente estudio rGRA7 presentó una fuerte reactividad contra anticuerpos tipo IgM anti-*Toxoplasma*, lo que indica su potencial como marcador de infección aguda. La proteína GRA7 constituye una parte importante de los antígenos que circulan en el torrente sanguíneo durante las primeras horas después de la infección (Alexander, Mital, Ward, Bradley, & JC., 2005); esto obedece a que las proteínas de los gránulos densos cumplen un papel importante en la invasión celular, al estar involucradas en el mantenimiento de la vacuola parasitófora y en la supervivencia del parásito en la célula huésped (Mercier, Adjogble, Daubener, & Delauw, 2005). Por lo anterior es probable que la elevada respuesta de anticuerpos expresada contra el antígeno rGRA7 esté asociada con el reconocimiento de GRA7 por el sistema inmunológico durante las etapas tempranas de invasión (Fischer H., Stachelhaus, Sahm, Meyer, & Reichmann, 1998). Adicionalmente, se ha documentado que estos antígeno producen fuertes respuestas de células B y células T (Filisetti & Candolfi, 2004), probablemente porque algunos epítopes en GRA7 juegan un papel importante en la respuesta de anticuerpos del huésped humano durante la toxoplasmosis aguda (Selseleh, Keshavarz, Mohebal, Shojaee, Eshragian, et al., 2012). Por otra parte, aunque la prueba rec-ELISA empleando el antígeno rGRA7 presentó una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos tipo IgM anti-*Toxoplasma*, la reactividad con anticuerpos tipo IgG también fue significativa. Esto puede deberse a que GRA7, además de ser el mayor componente de la vacuola parasitófora que rodea al taquizoíto y a secretarse en este estadio, también hace parte de la pared alrededor del quiste (Carruthers & Sibley, 1997); además, es secretado en bradizoítos por la ruptura constante de los quistes tisulares que permanecen en

pacientes con infecciones crónicas, lo que hace que la respuesta de anticuerpos IgG contra GRA7 sea alta (Selseleh, Keshavarz, Mohebbali, Shojaee, Eshragian, et al., 2012).

La sensibilidad y la especificidad de la prueba rec-ELISA empleando el antígeno recombinante rROP1 fue de 33.3% y 50%, respectivamente, en el grupo de sueros positivos para anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma*, menor en comparación con la prueba an-ELISA IgG. Datos previos reportan sensibilidades menores de 15.5% (Holec-Gasior, 2013) y 21.9% (Aubert et al., 2000) para la prueba rec-ELISA IgG empleando este antígeno. Otros estudios en los cuales se empleó la prueba de avidéz IgG se encontró sensibilidades de 25% (Holec-Gasior, Drapala, Lautenbach, & Kuri, 2010) y 38% (Pfrepper et al., 2005) en pacientes con infección previa.

Por otro lado, al evaluar el antígeno rROP1 en la detección de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma* con la prueba ELISA, se encontró una sensibilidad y especificidad de 85.7% y 87.6%, respectivamente. En estudios previos se halló una sensibilidad de 70.9% en pacientes con seroconversión reciente, y de 57.6% en pacientes con sospecha de infección aguda al emplear la prueba rec-ELISA IgM usando este antígeno (Aubert et al., 2000), mientras que otros autores reportan sensibilidades de 92.6% al emplear la prueba de avidéz (Pfrepper et al., 2005). La alta reactividad de rROP1 con sueros positivos para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma* en pacientes con posible infección aguda puede estar relacionada con la función que cumplen estas proteínas en el proceso de invasión del parásito a la célula huésped. Este proceso es una de las primeras etapas que se lleva a cabo y requiere la secreción de antígenos por parte de organelas secretoras del parásito. Dentro de estos antígenos secretados se encuentra ROP1, que está involucrado en el proceso de la formación de la vacuola parasitófora (Carruthers & Sibley, 1997). Además de mediar su unión con las organelas de la célula huésped, este antígeno es secretado dentro de la vacuola durante la entrada del parásito a la célula, desapareciendo rápidamente (Sam-Yellowe, 1996) (Dlugonska, 2008). Ello indicaría que ROP1 es un blanco temprano

de la respuesta humoral contra *T. gondii* y podría explicar el reconocimiento de este antígeno por anticuerpos tipo IgM de pacientes en fase aguda.

Por otra parte, el índice de *K* de Cohen mostró un valor de concordancia de 0.83 para rec-ELISA con el antígeno rSAG1 (excelente, de acuerdo a la escala de valores para este índice) y de 0.66 (bueno) para el antígeno rGRA7, mientras que para el antígeno rROP1 este valor de concordancia fue -0.15 (deficiente), al compararla con la prueba IFI. Por otro lado, el grado de concordancia entre la prueba IgM de captura y la prueba rec-ELISA IgM fue aceptable para los antígenos rGRA7 (0.548) y rROP1 (0.41), mientras que para el antígeno rSAG1 fue deficiente (0.036). Las diferencias en el grado de concordancia al emplear los diferentes antígenos recombinantes puede estar relacionada con la expresión de las proteínas nativas en los diferentes estadios del parásito, es decir, algunos antígenos solo se expresan en un estadio mientras que otras proteínas se pueden encontrar en todos los estadios (Kotresha & Noordin, 2010), por lo que la aparición de los anticuerpos dependerá entonces de la proteína secretada, el tiempo de aparición de estas y del estadio del parásito. Si los antígenos se producen en la etapa temprana de la infección serán detectadas por anticuerpos de fase aguda como IgM e IgA, los cuales son los primeros anticuerpos en aparecer. Además, si las proteínas hacen parte del estado taquizoíto es de esperarse que sean detectados por este tipo de anticuerpos, debido a que el estadio taquizoíto es la forma activa de replicación y se encuentra circulando en el torrente sanguíneo durante la infección aguda (Black & Boothroyd, 2000). Por el contrario, si los antígenos intervienen en procesos tardíos y son secretados por otras formas del parásito como los quistes tisulares, serán detectados por anticuerpos tipo IgG que aparecen después de producida la infección (Aubert et al., 2000).

Al correlacionar los resultados positivos para anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* con las variables estudiadas, se encontró una relación significativa mediante  $X^2$  entre la variable “tipo de piso de la vivienda” con la presencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* en gestantes (6.26;  $p= 0.043$ ) (Tabla 19), entre los cuales el que obtuvo mayor porcentaje de positividad fue la variable “habitar en viviendas con

piso de tierra” (73.9%; IC 95%: 65-80) (Tabla 19). Estos resultados son corroborados por diferentes estudios en embarazadas. En un estudio realizado por Alvarado y colaboradores en 343 gestantes mexicanas, el análisis multivariado con regresión logística mostró una asociación entre la presencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* y vivir en casa con piso de tierra (Odd Ratio (OR) ajustado = 7.16; IC 95%: 1.39-36.84) (Alvarado-Esquivel et al., 2006). De igual forma Sroka et al., reportaron que el 85.3% de las gestantes de su estudio positivas para anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* manifestaron habitar en viviendas con piso de tierra (OR: 2.73; IC 95%: 1.02-9.10;  $p= 0.037$ ) (S. Sroka et al., 2010). Por otro lado, otras investigaciones realizadas en otra población de estudio han demostrado también asociación entre la detección de títulos de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* y el piso de la vivienda habitada, en este caso piso de tierra. Uno de estos estudios fue realizado en 200 trabajadores expuestos al consumo de frutas y vegetales sin lavar y en el cual se encontró que las personas que vivían en casas con piso de tierra eran 3.10 veces más propensas a presentar anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* (OR = 3.10; IC 95%: 1.22-7.88;  $p= 0.01$ ). Asimismo, en otro estudio realizado en 760 niños de dos comunidades indígenas que presentaron una alta prevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma*, el análisis con regresión logística indicó que el piso de tierra de las chozas fue factor predictivo de presencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* ( $p= 0.001$ ) (Etheredge, Michael, Muehlenbein, & Frenkel, 2004).

Los ooquistes presentes en el ambiente pueden ser una fuente potencial de infección para humanos y otros huéspedes intermediarios, debido a que en condiciones ambientales con aireación suficiente, humedad y temperatura adecuada, los ooquistes pueden esporular y volverse infecciosos en un día (EFSA, 2007), e incluso pueden sobrevivir en el suelo hasta por 18 meses y mantener su infectividad (Llop et al., 2001). Una vez en el suelo, los ooquistes pueden ser diseminados mecánicamente por invertebrados tales como moscas, cucarachas, escarabajos y otros insectos (Ramírez, 2005). Existe evidencia de diseminación mecánica por cucarachas *Periplaneta americana*, las cuales pueden transportar ooquistes infectantes durante 10 días; también se ha demostrado que hay

transmisión a través de las heces de la misma luego de ingerir heces de gatos infectados. Adicionalmente, las moscas sinantrópicas, la mosca doméstica y escarabajos son considerados también excelentes vectores mecánicos de diversos microorganismos entre ellos *T. gondii* (Pérez, Villada, Naranjo, & S, 2011). Mediante los vectores mecánicos mencionados, *T. gondii* puede ser transportado al piso de tierra de las viviendas y permanecer allí por un periodo de tiempo, lo que hace propensas a las mujeres a infectarse debido a que por lo general son ellas las que realizan actividades caseras (barrer, recoger basuras) en las que están en contacto directo con el suelo; además, el no lavarse las manos después de estas actividades puede facilitar la transmisión del parásito por vía oral.

Por otro lado, existe otra vía de transmisión alterna que consiste en la transmisión por inhalación de ooquistes aerosolizados, que luego pueden ser ingeridos conllevando a la infección por *T. gondii*. Aunque esta vía es poco estudiada no se descarta, debido a que existen reportes de brotes de toxoplasmosis vinculados a esta vía de transmisión (Pérez et al., 2011).

## 6. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demuestra que la prueba ELISA empleando los antígenos recombinantes rSAG1, rGRA7 y rROP1 puede ser un buen método para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma* en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita. En ese sentido, los datos de sensibilidad, especificidad y grado de concordancia demuestran que el antígeno rSAG1 presenta mejores resultados en la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* que los arrojados al emplear antígenos sonicados. Asimismo, la sensibilidad, especificidad y grado de concordancia de la prueba rec-ELISA IgM frente a la prueba IgM de Captura muestran que la proteína recombinante rGRA7 puede ser usada de forma confiable como antígeno en la detección de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma*.

De otro lado, el aumento de la seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* (68.7%) y la incidencia en la población de estudio (3.8%) demuestran la alta exposición de las gestantes del departamento de Sucre a *T. gondii* y la constante circulación del parásito en esta zona. Además, se determinó que residir en viviendas con piso de tierra mostró ser un factor asociado con la presencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma*, lo que podría evidenciar el papel de este factor en la adquisición de la enfermedad.

## **7. RECOMENDACIONES**

Con base en los resultados de la presente investigación se recomienda realizar nuevos estudios para validar otros antígenos recombinantes en forma individual y en combinación, como herramienta para el mejoramiento del diagnóstico de la toxoplasmosis congénita.

De otro lado, se hace necesario realizar nuevos estudios en la región con el fin de establecer datos de seroprevalencia e incidencia de la toxoplasmosis en la población general y en gestantes. También, se recomienda realizar pruebas de tamizaje en mujeres en edad fértil para conocer su estado inmunológico frente a toxoplasma en un tiempo anterior al embarazo. Además, es preciso realizar nuevos estudios que ayuden a explicar el origen de la infección y las fuentes de contaminación.

Para finalizar, se recomienda desarrollar programas de promoción y prevención de la toxoplasmosis en la población susceptible de adquirir la infección (gestantes seronegativas y pacientes inmunodeprimidos), haciendo énfasis en la importancia de las medidas higiénicas.

## 8. REFERENCIAS

- Acha, P., & Szyfres, B. (2003). Parasitosis En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales (3 ed., Vol. III, pp. 88 - 97): Publicación Científica y Técnica N° 580. OPS.
- Ahn, H.-J., Kim, S., Kim, H.-E., & Nam, H.-W. (2006). Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean Journal of Parasitology*, 44(4), 303-312.
- Ajioka, J. W., Fitzpatrick, J. M., & Reitter, C. P. (2001). *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 1-19.
- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, & JC, B. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog*, 1(2), e 17.
- Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., & Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog*, 1(2), e17.
- Alvarado-Esquivel, C., Sifuentes-Alvarez, A., Narro-Duarte, S. G., Estrada-Martínez, S., Diaz-Garcia, J. H., Liesenfeld, O., Canales-Molina, A. (2006). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in a public hospital in northern Mexico. *BMC Infect Dis*, 6, 113.
- Aramini, J. J., Stephen, C., Dubey, J. P., Engelstoft, C., Schwantje, H., & Ribble, C. S. (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect*, 122(2), 305-315.
- Araújo, P., & Ferreira, A. (2011). High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (map1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop*, 52(2), 63 - 68.

Atías, A. (1997). *Parasitología Clínica*. Santiago de Chile: Publicaciones Mediterráneo

Aubert, D., Maine, G. T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., Pinon, J. M. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, 38(3), 1144-1150.

Barrera, A. M., Castiblanco, P., Gómez, J. E., López, M. C., Ruiz, A., Moncada, L., Corredor, A. (2002). Toxoplasmosis Adquirida Durante el Embarazo, en el Instituto Materno Infantil en Bogotá. *Rev Salud Pública*, 4(3), 286 - 293.

Beaman, R., McCabe, R., & Remington, J. (1995). *Toxoplasma gondii: Principles and practice of infectious diseases* (4 ed.). New York: Churchill and Livingstone.

Beghetto, E., Spadoni, A., Bruno, L., Buffolano, W., & Gargano, N. (2006). Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. *J Clin Microbiol*, 44(6), 2133-2140.

Black, M., & Boothroyd, J. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology*, 64(3), 607 - 623.

Blanco, P., Assia, Y., Montero, Y., & Orozco, K. (2011). ELFA IgG anti-*Toxoplasma* y PCR anidada para el diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres gestantes de Sincelejo, Colombia. *Infectio*, 15(4), 253 - 258.

Bonhomme, A., Maine, G. T., Beorchia, A., Burlet, H., Aubert, D., Villena, I., Pinon, J. M. (1998). Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Histochem Cytochem*, 46(12), 1411-1422.

Boothroyd, J. C., & Dubremetz, J. F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol*, 6(1), 79 - 88.

Bosch-Driessen, L. H., Karimi, S., Stilma, J. S., & Rothova, A. (2000). Retinal detachment in ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*, 107(1), 36-40.

Botero, D., & Restrepo, M. (1998). *Parasitosis Humana* (3 ed.). Medellín – Colombia: Corporación para la investigación.

Burg, J., Perelman, D., Kasper, L., Ware, P., & Boothrovd, J. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 141, 3584 - 3591.

Butler, N. J., Furtado, J. M., Winthrop, K. L., & Smith, J. R. (2013). Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. *Clin Experiment Ophthalmol*, 41(1), 95-108.

Campo-Arias, A., Herazo, E. (2010). Concordancia intra- e interevaluadores. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 39(2), 424 - 432.

Canon-Franco, W. A., López-Orozco, N., Gómez-Marín, J. E., & Dubey, J. P. (2014). An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasit Vectors*, 7, 427.

Carellós, E. V., de Andrade, G. M., Vasconcelos-Santos, D. V., Januario, J. N., Romanelli, R. M., Abreu, M. N., Caiaffa, W. T. (2014). Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. *PLoS One*, 9(2), e88588.

Carey, K. L., Jongco, A. M., Kim, K., & Ward, G. E. (2004). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot Cell*, 3(5), 1320-1330.

Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Darde, M. L. (2002). Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*, 40(11), 4037-4044.

Carrada, T. (2005). Toxoplasmosis: parasitosis reemergente del nuevo milenio. *Revista mexicana de patología clínica*, 52(3), 151 - 162.

Carruthers, V., & Tomley, F. (2008). Receptor-ligand interaction and invasion: Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell Biochem*, 47, 33 - 45.

Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology*, 73(2), 123.

Castro, A., Góngora, A., & González, M. (2008). Seroprevalencia de anticuerpos a *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas de Villavicencio, Colombia. *Orinoquía*, 12(1), 91 - 100.

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. *Rev Inv Vet Perú*, 20(2), 285 - 290.

Commodaro, A. G., Belfort, R. N., Rizzo, L. V., Muccioli, C., Silveira, C., Burnier Jr, M. N., & Belfort Jr, R. (2009). Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(2), 345-350.

Cong, H., Zhang, M., Zhang, Q., Gong, J., Xin, Q., & He, S. (2013). Analysis of structures and epitopes of surface antigen glycoproteins expressed in bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Biomed Res Int*, 2013, 165342.

Corredor, A. (1981). Programa de Educación Continuada en Salud: Toxoplasmosis (pp. 1- 33). Bogotá Colombia: Ministerio de Salud.

Cortés, L., & Mancera, L. (2009). Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. *Infectio*, 13(2), 76 - 82.

Chardes, T., & Bout, D. (1993). Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res Immunol*, 144(1), 57-60.

Chiang, T. Y., Kuo, M. C., Chen, C. H., Yang, J. Y., Kao, C. F., Ji, D. D., & Fang, C. T. (2014). Risk factors for acute *Toxoplasma gondii* diseases in Taiwan: a population-based case-control study. *PLoS One*, 9(3), e90880.

Dai, J., Jiang, M., Wang, Y., Qu, L., Gong, R., & Si, J. (2012). Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Vaccine Immunol*, 19(3), 338-342.

DANE. (2012). Nacimiento por sitio de parto, según departamento, municipio de ocurrencia y régimen de seguridad social de la madre año 2012. from DANE. <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/nacimientos-y-defunciones/118-demograficas/estadisticas-vitales/2864-nacimientos-2012-preliminar>

Darde, M. L. (2008). *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite*, 15(3), 366-371.

De Moura, L., Bahia-Oliveira, L. M., Wada, M. Y., Jones, J. L., Tuboi, S. H., Carmo, E. H., Garrett, D. O. (2006). Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*, 12(2), 326-329.

Delair, E., Latkany, P., Noble, A. G., Rabiah, P., McLeod, R., & Brezin, A. (2011). Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm*, 19(2), 91-102.

Demar, M., Ajzenberg, D., Maubon, D., Djossou, F., Panchoe, D., Punwasi, W., Carne, B. (2007). Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis*, 45(7), e88-95.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2013). InfoStat (Versión 2013). Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Díaz, L., Zambrano, B., Chacón, G., Rocha, A., & Díaz, S. (2010). Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Obstet Ginecol venez*, 70(3), 190 - 205.

Dlugonska, H. (2008). Toxoplasma Rhoptries: Unique Secretory Organelles and Source of Promising Vaccine Proteins for Immunoprevention of Toxoplasmosis. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2008, 1- 7.

Dubey, J., & Lappin, M. (2000). Enfermedades infecciosas en perros y gatos. In M. G. H. Interamericana (Ed.), Toxoplasmosis y Neosporosis (2 ed., pp. 542- 560). México.

Dubey, J., & LAPPIN, M. (2000). Toxoplasmosis y Neosporosis in green, C.E: (eds) Enfermedades infecciosas en perros y gatos (2da edición ed., pp. 542 - 560). México: Mc. Grawm Hill Interamericana.

Dubey, J. P. (1986). Toxoplasmosis. J Am Vet Med Assoc, 189(2), 166-170.

Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol, 126(1-2), 57-72.

Dubey, J. P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. J Eukaryot Microbiol, 55(6), 467-475.

Dubey, J. P., Hill, D. E., Jones, J. L., Hightower, A. W., Kirkland, E., Roberts, J. M., Gamble, H. R. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. J Parasitol, 91(5), 1082-1093.

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev, 11(2), 267-299.

Dubremetz, J. F. (2007). Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. Cell Microbiol, 9(4), 841-848.

Dubremetz, J. F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., & Fourmaux, M. N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. Int J Parasitol, 28(7), 1007-1013.

Dunay, I. R., & Sibley, L. D. (2010). Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol*, 22(4), 461-466.

Dunn, J. D., Ravindran, S., Kim, S. K., & Boothroyd, J. C. (2008). 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*, 76(12), 5853-5861.

Eckert, G. U., Melamed, J., & Menegaz, B. (2007). Optic nerve changes in ocular toxoplasmosis. *Eye (Lond)*, 21(6), 746-751.

EFSA, E. F. S. A. (2007). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals. *The EFSA Journal* 583, 1 - 64.

Elhence, P., Agarwal, P., Prasad, K. N., & Chaudhary, R. K. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in North Indian blood donors: implications for transfusion transmissible toxoplasmosis. *Transfus Apher Sci*, 43(1), 37-40.

Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol*, 26(4), 190-196.

Eslamirad, Z., Dalimi, A., Ghaffarifar, F., & Sharifi, Z. (2008). Cloning rhoptry protein 1 (ROP1) gene of *Toxoplasma gondii* (RH) in expression vector. *Archives of Razi Institute*, 63( 2 ), 11-17.

Eslava, A., Houghton, M., Serrano, G., & Riaño, J. (2011). Toxoplasmosis Gestacional y Neonatal en el Instituto Materno Infantil y el Hospital de Engativá, de Bogotá, Colombia en 2009-2010. Tesis en Especialista en Obstetricia y Ginecología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Etheredge, G. D., Michael, G., Muehlenbein, M. P., & Frenkel, J. K. (2004). The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. *Rev Panam Salud Pública*, 16(3), 176-186.

Filisetti, D., & Candolfi, E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*, 40(1), 71-80.

Fischer H., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H., & Reichmann, R. (1998). GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91, 251 - 252.

Flegr, J., Prandota, J., Sovickova, M., & Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One*, 9(3), e90203.

Fonseca, D. (2002). PCR en Toxoplasmosis. *Rev. Salud Pública*, 4(2), 63 - 64.

Garcia de la Fuente, I., Ansari, M., Rougemont, A. L., Passweg, J. R., Gumy-Pause, F., Ozsahin, H., Posfay-Barbe, K. M. (2010). Acute disseminated fatal toxoplasmosis after haploidentical stem cell transplantation despite atovaquone prophylaxis in a young man. *Pediatr Infect Dis J*, 29(11), 1059-1060.

Germani, C., & Pacheco, F. (2002). Comparison between indirect immunofluorescence and indirect haemagglutination techniques for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in swine sera. *Acta Scientiae Veterinariae*, 30(3), 185 - 189.

Ginorio, D. (2001). *Toxoplasma gondii*, en: *Microbiología y Parasitología Médicas*. In A. Llop, M. Valdés-Dapena & J. Zuazo (Eds.), *Ciencias Médicas* (pp. 141 - 149).

Gómez-Marín, J. E., de-la-Torre, A., Angel-Muller, E., Rubio, J., Arenas, J., Osorio, E., Castaño, G. (2011). First Colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5), e1195.

Gómez-Marín, J. E., Montoya-de-Londoño, M. T., & Castaño-Osorio, J. C. (1997). A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío, Colombia and application of mathematical models to estimate incidences using age-stratified data. *Am J Trop Med Hyg*, 57(2), 180- 186.

Gómez, A. (1998). Caracterización de pruebas diagnósticas. *Medicine*, 7(105), 4872 - 4877.

Gómez, F., & Gracia, M. (2004). Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alturgell. Tesis Doctoral, Barcelona, España.

Gómez, J. (2000). Diagnóstico de la toxoplasmosis humana: nuevos conceptos y técnicas. *Medicina & Laboratorio*, 9(3 - 4), 167- 185.

Gómez, J., & Pinon, J. (2001). Virulencia en *Toxoplasma gondii*: las presentaciones clínicas inusuales en la Amazonia pueden poner en evidencia factores de virulencia. *Rev Salud Pública*, 3(1), 35 - 41.

Gómez, J. E. (2002). Toxoplasmosis: Un problema de Salud Pública en Colombia. *Rev. Salud Pública*, 4(2), 7 - 10.

Gómez, J. E., Montoya, M., Castaño, J., & Ríos, M. (2003). Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en estantes de Armenia (Quindío). *Colombia Medica*, 24, 14 - 18.

Gómez, J. E., Montoya, M. T., & Castaño, J. C. (1997). A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío, Colombia and application of mathematical models to estimate incidences using age-stratified data. *Am J Trop Med Hyg* 57, 180 - 186.

Gómez, J. E., Ruiz, B., Silva, P., Cortés, J., & Beltrán, S. (2007). Guía de práctica clínica para toxoplasmosis durante el embarazo y toxoplasmosis congénita en Colombia. *Infectio*, 11(3), 129 - 141.

González, M. M., Castaño, J. C., Jiménez, J. E., Barrera, J. G., & Gómez, J. E. (2004). Seroprevalencia de la toxoplasmosis gestacional en el departamento del Quindío. *Infectio*, 8, 95.

Halonen, S. K., & Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*, 114, 125-145.

Harning, D., Spenter, J., Metsis, A., Vuust, J., & Petersen, E. (1996). Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3(3), 355-357.

Hassl, A., Muller, W. A., & Aspöck, H. (1991). An identical epitope in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* causing serological cross reactions. *Parasitol Res*, 77(4), 351-352.

He, X. L., Grigg, M. E., Boothroyd, J. C., & Garcia, K. C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nat Struct Biol*, 9(8), 606-611.

Hofhuis, A., van Pelt, W., van Duynhoven, Y. T., Nijhuis, C. D., Mollema, L., van der Klis, F. R., Kortbeek, L. M. (2011). Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. *Epidemiol Infect*, 139(4), 530-538.

Holec-Gasior, L. (2013). *Toxoplasma gondii* Recombinant Antigens as Tools for Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis: Current Status of Studies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(9), 1343 –1351.

Holec-Gasior, L., Drapala, D., Lautenbach, D., & Kuri, J. (2010). *Toxoplasma gondii*: usefulness of ROP1 recombinant antigen in an immunoglobulin G avidity assay for diagnosis of acute toxoplasmosis in humans. *Pol J Microbiol*, 59(4), 307-310.

Holec, L., Gasior, A., Brillowska-Dabrowska, A., & Kur, J. (2008). *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. *Exp Parasitol*, 119(1), 1-6.

Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, 172(6), 1561-1566.

Huerta, S., Chávez, A., Casas, E., Falcón, N., & Raymundo, F. (2006). Concordancia entre las pruebas de Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta para determinar la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en ovinos. *Rev Inv Vet Perú*, 17(2), 178 -183.

Hutchison, W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206(987), 961-962.

IBM, C. (2013). IBM SPSS Statistics for Windows (Version 22.0). NY: IBM Corp. Retrieved from <http://www-01.ibm.com/software/co/analytics/spss/>.

Ishizuka, M., D'Angalino, J., & Souza, J. (1986). *Toxoplasmosis* suína II. Estudo comparativo das provas de imunofluorescencia indireta e hemaglutinacao para avaliacao de anticorpos anti-toxoplasma em soros suínos. *Boletín de la oficina Sanitaria Panamericana*, 100, 524 - 530.

Jacobs, D., Vercammen, M., & Saman, E. (1999). Evaluation of Recombinant Dense Granule Antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies and Analysis of a Major Antigenic Domain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 6(1), 24 - 29.

Jacobs, L., Remington, J. S., & Melton, M. L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*, 46, 11-21.

Jacome, J. (2007). Prevalencia de infección por *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas, en Valledupar, Cesar año 2007. Maestría en Salud Pública Universidad del Magdalena- Universidad Nacional, Santa Marta, Colombia.

Jalallou, N., Bandepour, M., Khazan, H., Haghghi, A., Abdollahi, S., & Kazemi, B. (2010). Recombinant SAG1 Antigen to Detect *Toxoplasma gondii* Specific Immunoglobulin G in Human Sera by ELISA Test. Iranian J Parasitol, 5(2), 1 - 9.

Jeffrey, D., Kravetz, M., Daniel, G., & Federman, M. (2005). Toxoplasmosis in pregnancy. The American Journal of Medicine, 118, 212 – 216.

Jenum, P. A., & Stray-Pedersen, B. (1998). Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. J Clin Microbiol, 36(10), 2907-2913.

Joiner, K. A., & Dubremetz, J. F. (1993). *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. Infect Immun, 61(4), 1169-1172.

Jones, J. L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C., Remington, J. S., & Montoya, J. G. (2009). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. Clin Infect Dis, 49(6), 878-884.

Jones, L. A., Alexander, J., & Roberts, C. W. (2006). Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. Parasite Immunol, 28(12), 635-642.

Juliao, R., Corredor, C., & Moreno, G. (1983). Toxoplasmosis en Colombia. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud Bogotá.

Jung, C., Lee, C. Y., & Grigg, M. E. (2004). The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. Int J Parasitol, 34(3), 285-296.

Kesenthi, K. (2009). Studies on the epidemiology of toxoplasmosis in South Africa Master of Science in Medicine, University of the Witwatersrand, Johannesburg.

Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A. L., Rizzo, L. V., Belfort, R., Jr., Sibley, L. D. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 12(6), 942-949.

Kim, K., & Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*, 34(3), 423 - 432.

Kim, S. K., & Boothroyd, J. C. (2005). Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. *J Immunol*, 174(12), 8038-8048.

Kissinger, J. C., Gajria, B., Li, L., Paulsen, I. T., & Roos, D. S. (2003). ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res*, 31(1), 234 - 236.

Kotresha, D., & Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS*, 118(8), 529-542.

Kotresha, D., Poonam, D., Muhammad Hafiznur, Y., Saadatnia, G., Nurulhasanah, O., Sabariah, O., Rahmah, N. (2012). Recombinant proteins from new constructs of SAG1 and GRA7 sequences and their usefulness to detect acute toxoplasmosis. *Tropical Biomedicine*, 29(1), 129 - 137.

LaRosa, D., Stumhofer, J., Gelman, A., Rahman, A., Taylor, D., Hunter, C., & Turka, L. (2008). T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *PNAS*, 105(10), 3855 - 3860.

Li, S., Galvan, G., Araujo, F. G., Suzuki, Y., Remington, J. S., & Parmley, S. (2000). Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(5), 781-787.

Li, S., Maine, G., Suzuki, Y., Araujo, F. G., Galvan, G., Remington, J. S., & Parmley, S. (2000). Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J Clin Microbiol*, 38(1), 179-184.

Liang, L., Doskaya, M., Juarez, S., Caner, A., Jasinskas, A., Tan, X., Davies, D. H. (2011). Identification of potential serodiagnostic and subunit vaccine antigens by antibody profiling of toxoplasmosis cases in Turkey. *Mol Cell Proteomics*, 10(7), M110 006916.

Liu, K. Y., Zhang, D. B., Wei, Q. K., Li, J., Li, G. P., & Yu, J. Z. (2006). Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. *World J Gastroenterol*, 12(15), 2363-2368.

Lopez-Castillo, C. A., Diaz-Ramirez, J., & Gomez-Marin, J. E. (2005). [Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in Armenia, Colombia. *Rev Salud Pública (Bogotá)*, 7(2), 180-190.

Lorca, M., & Contreras, M. (1997). Métodos de diagnósticos indirectos. In: Atías, *Parasitología Médica* (4 ed., pp. 571-576.). Santiago - Chile: Mediterráneo.

Luder, C. G., Bohne, W., & Soldati, D. (2001). Toxoplasmosis: a persisting challenge. *Trends Parasitol*, 17(10), 460-463.

Llop, A., Valdez-Dapena, M., & Zuazo, J. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas* (Vol. 3). La Habana - Cuba: Ciencias Médicas.

Machado, N., Manrique, E., Ruiz, B., & Blanco, P. (2004). Alta frecuencia de seroconversión toxoplásmica en gestantes de Sincelejo-Sucre. *Infectio*, 8(4), 263 - 266.

Martín, I., & García, S. (2003). Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*, 28(3), 19 - 27.

Mehrabani, D., Malekpour, A., Zahedi, S., Dehghani, S., & Tondro, G. (2012). Comparison of Dot-Elisa with IFA Test for Diagnosis of Human Toxoplasmosis and Seroepidemiological Evaluation of the Disease. *Middle-East J. Sci. Res*, 11(11), 1530 -1535.

Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V. B., Tourse, C., Tomavo, S., Soldati, D. (2002). A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci*, 115(Pt 3), 563-574.

Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Banuls, A. L., Durand, P., Darde, M. L. (2010). Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(11), e876.

Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, & Delaunay MF. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all Apicomplexa parasites? *Int J Parasitol*, 35(829 – 849).

Ministerio Salud Protección Social-Colciencias. (2013). Guías de práctica clínica para la prevención, detección temprana y tratamiento de complicaciones del embarazo, parto o puerperio. Centro Nacional de Investigación en Evidencia y Tecnologías en Salud CINETS.

Mohamed, K., Kodum, P., Maly, M., & Rayah, I. E. (2014). Environmental and Food Habitat Risk Factors Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Rural Women in Sudan. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(2), 208-222.

Montealegre, I., Valbuena, Y., Cortes, L., & Flórez, A. (2008). Seroprevalencia de la toxoplasmosis y factores relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos en trabajadores de plantas de beneficio animal en cinco ciudades capitales de Colombia, 2008. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 7(11), 66 - 70.

Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363(9425), 1965-1976.

Montoya, J. G., & Remington, J. S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*, 47(4), 554-566.

Montoya, M. (2002). Programa de Diagnóstico de Toxoplasmosis Materna en Armenia. *Rev. Salud Pública.*, 4(1), 23 - 28.

Montoya, M., Gómez-Marín, J. E., Ruiz, B., & Castaño, J. (2000). Frequency of specific IgM and IgA anti-Toxoplasma in pregnant women from Armenia. Paper presented at the XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Cartagena.

Moreno, D., Pérez-Oliva, J., Mármol, A., & Gámez, A. (1999). Prevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en pacientes con insuficiencia renal y trasplantados renales. *NEFROLOGIA*, 19(1).

Muñiz, S., & Mondragón, R. (2009). *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *REB*, 28(2), 52 - 58.

Nam, H. W. (2009). GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. [Review]. *Korean J Parasitol*, 47 Suppl, S29-37.

Nash, J. Q., Chissel, S., Jones, J., Warburton, F., & Verlander, N. Q. (2005). Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in Kent, United Kingdom. *Epidemiol Infect*, 133(3), 475-483.

Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G., & Fischer, H. G. (2002). Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infect*, 4(6), 581-590.

Nigro, M., Gutierrez, A., Hoffer, A. M., Clemente, M., Kaufer, F., Carral, L., Angel, S. O. (2003). Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 47(4), 609-613.

Nishi, M., Hu, K., Murray, J. M., & Roos, D. S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*, 121(Pt 9), 1559 - 1568.

Njunda, A., Nsagha, S., Assob, J., Kamg, H., Tafil, R., & Achidi, E. (2011). Seroepidemiology of Toxoplasmosis in Pregnant Women Attending the University Teaching Hospital in Yaounde Cameroon. *International Journal of Health Research*, 4(1), 1 - 9.

Ortega, M. (2003). Prevalencia de la toxoplasmosis en rumiantes de abastos de la provincia de Sevilla. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Sevilla, España.

Ospina, S. (1993). Toxoplasmosis. In L. M (Ed.), *Clínica y complicaciones de las parasitosis* (pp. 591 - 611). Medellín: Universidad de Antioquia.

Osthoff, M., Chew, E., Bajel, A., Kelsey, G., Panek-Hudson, Y., Mason, K., Slavin, M. (2013). Disseminated toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation in a seronegative recipient. *Transpl Infect Dis*, 15(1), E14-19.

Oz, H. S. (2014). Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. *Front Microbiol*, 5, 385.

Pantoja, A., & Pérez, L. (2001). Reseña histórica acerca de las investigaciones relacionadas con la toxoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop*, 53(2), 111 - 117.

Payá, E., Noemí, I., Tassara, R., Catalán, P., & Aviles, C. L. (2012). Profilaxis de toxoplasmosis en niños y adultos sometidos a trasplante de órganos sólidos y precursores hematopoyéticos. *Revista chilena de Infectología*, 29, 37-39.

Pereira-Chioccola, V. L., Vidal, J. E., & Su, C. (2009). *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol*, 4(10), 1363-1379.

Pérez-Rendón González, J., Moreno Montañez, T., Becerra, C., & Martínez Cruz, M. S. (1992). The seroprevalence of human toxoplasmosis in Cordoba. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)*, 66(1), 83-91.

Pérez, J., Villada, J., Naranjo, O., & S, C. (2011). Formas alternativas de transmisión de *Toxoplasma gondii*. *Biosalud* 10(2), 123 - 137.

Perna, C., Rodrigues-Figueira, Y., Morales, C., Rodríguez, J., Hardisson, D., & Viquer, J. (2012). Revisión de casos con diagnóstico de toxoplasmosis en el Hospital La Paz de Madrid. *Rev Esp Patol*, 45(1), 5 -13.

Petersen, E. (2007). Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal Neonatal Medicine*, 12 (3), 214 - 223.

Pfrepper, K. I., Enders, G., Gohl, M., Krczal, D., Hlobil, H., Wassenberg, D., & Soutschek, E. (2005). Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(8), 977-982.

Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H. V., Paul, M., Myjak, P. (2007). Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol Res*, 100(2), 333-337.

Pino, L., Salinas J, & M, L. (2009). Descripción de un brote epidémico de toxoplasmosis aguda en pacientes inmunocompetentes miembros de las fuerzas militares de Colombia durante operaciones de selva. *Infectio*, 13(2), 83 - 91.

Pizzi, H. (1997). Toxoplasmosis. Rhone Poulenc Roner, Buenos Aires – Argentina, 84.

Praga, G. (1998). *Toxoplasma* y embarazo: Tamizaje Universal: Acta Médica Colombiana, 23, 271- 274.

Ramírez, J. (2005). Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en alpacas de cuatro distritos de la provincia de chanchis - cusco. Médico veterinario pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Perú.

Rawal, B. D. (1959). Toxoplasmosis; a dye-test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 53(1), 61-63.

Reátegui, C., & Vela, G. (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.

Reis, M. (2001). Diagnóstico de la toxoplasmosis congénita *Revista cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(2), 118 -122.

Remington, J., McLeod, R., Thulliez, P., & Desmonts, G. (2006). Toxoplasmosis. In E. Saunders (Ed.), *Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant* (6th edition ed., pp. 947 – 1091). Philadelphia: Remington, Klein, Wilson, and Baker.

Remington, J., Thulliez, P., & Montoya, J. (2004). Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, 42(3), 941-945.

Restrepo, M., Jaramillo, V., & Kurtzer, A. (1976). Infección por *Toxoplasma gondii* durante el embarazo. *Antioq Med*, 25, 335 - 347.

Robert-Gangneux, F., & Darde, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*, 25(2), 264-296.

Rorman, E., Zamir, C. S., Rilkis, I., & Ben-David, H. (2006). Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod Toxicol*, 21(4), 458-472.

Rosso, F., Agudelo, A., Isaza, A., & Montoya, J. (2007). Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colombia médica*, 38(3), 316 - 337.

Rosso, F., Les, J., Agudelo, A., & Villalobos, C. (2006). Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Cali, Colombia. Program and abstracts of the international conference on women and infectious diseases.

Saadatnia, G., Mohamed, Z., Ghaffarifar, F., Osman, E., Moghadam, Z. K., & Noordin, R. (2012). *Toxoplasma gondii* excretory secretory antigenic proteins of diagnostic potential. *APMIS*, 120(1), 47-55.

Salvia, M., Álvarez, e., Bosch, J., & Goncé, A. (2008). Infecciones congénitas. . Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología, 177 - 188.

Sam-Yellowe, T. (1996). Rhoptry organelles of the Apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today* 12, 308 - 316.

Santa Cruz Rodríguez, A.C., Figueroa Vaca, D.E., Condori, D., & Rioan; R. (2007).

Comparación de dos métodos serológicos para el diagnóstico de Toxoplasmosis. *Gaceta Médica Boliviana*, 30(2),11-14

Saravia, M. (2004). Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en llamas hembras adultas en la U. P. Médico veterinario Pregrado, Universidad Nacional mayor de San Marcos, Lima - Perú.

Sarkari, B., & Abdolahi Khabisi, S. (2015). Severe congenital toxoplasmosis: a case report and strain characterization. *Case Rep Infect Dis*, 2015, 851085.

Selseleh, M., Keshavarz, H., Mohebbali, M., Shojaee, S., Eshragian, M. R., Mansouri, F., & Modarressi, M. H. (2012). Production and evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant GRA7 for serodiagnosis of human infections. *Korean J Parasitol*, 50(3), 233 - 238.

Selseleh, M., Keshavarz, H., Mohebbali, M., Shojaee, S., Modarressi, M., & Eshragian, M. (2012). Production and Evaluation of *Toxoplasma gondii* Recombinant Surface Antigen 1 (SAG1) for Serodiagnosis of Acute and Chronic *Toxoplasma* Infection in Human Sera. *Iranian J Parasitol*, 7(3), 1- 9.

Serrano, N., & Cárdenas, M. (1999). Estado actual del diagnóstico de la toxoplasmosis en la mujer embarazada y su feto. *Revista Medunab*, 2(4).

Shapiro, K., Mazet, J. A., Schriewer, A., Wuertz, S., Fritz, H., Miller, W. A., Conrad, P. A. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration. *Water Res*, 44(3), 893-903.

Shchwartzmam, J. (2001). Toxoplasmosis, in: Principles and practice of clinical parasitology. In S. Gillespie & R. Pearson (Eds.), John Wiley & Sons (pp. 113 - 138).

Sibley, L. D., Khan, A., Ajioka, J. W., & Rosenthal, B. M. (2009). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1530), 2749-2761.

Siegel, S. E., Lunde, M. N., Gelderman, A. H., Halterman, R. H., Brown, J. A., Levine, A. S., & Graw, R. G., Jr. (1971). Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood*, 37(4), 388-394.

Sierra, M., Bosch, J., Juncosa, T., Matas, L., Muñoz, C., Andreu, A., Viñas, L. (1998). Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. *Bol Control de Calidad SEIMC*, 10, 31- 44.

Silva, D. A., Cabral, D. D., Bernardina, B. L., Souza, M. A., & Mineo, J. R. (1997). Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titers. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92(6), 785-789.

Singh, S., Munawwar, A., Rao, S., Mehta, S., & Hazarika, N. K. (2014). Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in Indian women of child bearing age and effects of social and environmental factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(3), e2737.

Skiest, D. J. (2002). Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*, 34(1), 103-115.

Sobral, C. A., Amendoeira, M. R., Teva, A., Patel, B. N., & Klein, C. H. (2005). Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. *Am J Trop Med Hyg*, 72(1), 37- 41.

Soldati, D., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 31(12), 1293-1302.

Soldati, D., Lassen, A., Dubremetz, J. F., & Boothroyd, J. C. (1998). Processing of *Toxoplasma* ROP1 protein in nascent rhoptries. *Mol Biochem Parasitol*, 96(1-2), 37-48.

Sonar, S., & Brahmabhatt, M. (2010). Toxoplasmosis: An Important Protozoan Zoonosis. *Veterinary World*, 3(9), 436 – 439.

Soulby, E. (1987). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*. México, D.F.

Souza, W. (2006). Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad Bras Cienc*, 78(2), 271 - 291.

Sroka, J., Wojcik-Fatla, A., & Dutkiewicz, J. (2006). Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Ann Agric Environ Med*, 13(1), 169-175.

Sroka, S., Bartelheimer, N., Winter, A., Heukelbach, J., Ariza, L., Ribeiro, H., Liesenfeld, O. (2010). Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 83(3), 528-533.

Sullivan, W. J., Jr., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*, 36(3), 717-733.

Sun, H., Wang, Y., Zhang, Y., Ge, W., Zhang, F., He, B., Liu, Q. (2013). Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in bats in Myanmar. *Appl Environ Microbiol*, 79(11), 3526-3528.

Team, R. D. C. (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Thiermann, E., Mufioz, P., Lorca, M., & Atias, A. (1985). El Estudio de las Infecciones Congenitas por *Toxoplasma Gondii* y *Trypanosoma Cruz*. *Rev. Chil. Pediatr*, 56(3), 143 – 150.

Uchoa, C. M., Duarte, R., Laurentino-Silva, V., Alexandre, G. M., Ferreira, H. G., & Amendoeira, M. R. (1999). Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay ELISA to detect anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies, and comparison with the indirect immunofluorescence technique. *Rev Soc Bras Med Trop*, 32(6), 661- 669.

Vidal, J. E., Hernandez, A. V., de Oliveira, A. C., Dauar, R. F., Barbosa, S. P., Jr., & Focaccia, R. (2005). Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDS*, 19(10), 626-634.

Wainwright, K. E., Miller, M. A., Barr, B. C., Gardner, I. A., Melli, A. C., Essert, T., Conrad, P. A. (2007). Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *J Parasitol*, 93(4), 925-931.

Wang, Y., & Yin, H. (2014). Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors*, 7(1), 180.

Weinman, D., & Chandler, A. H. (1954). Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proc Soc Exp Biol Med*, 87(1), 211-216.

Weiss, L., & Kim, K. (2007). *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods* (1era ed.). USA.

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

Weiss, L. M., & Kim, K. (2007). *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. Perspectives and methods*: Academic Press.

Wellness, A. H. a. (2011). Congenital toxoplasmosis. *Public Health Notifiable Disease Management Guidelines*, 1 - 6.

Wiener, L. (2000). Toxo Test HAI. Prueba de Hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*. Argentina.

Wolf, A., Cowen, D., & Paige, B. (1939). Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science*, 89(2306), 226-227.

Wolf, A., Cowen, D., & Paige, B. H. (1939). Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *Am J Pathol*, 15(6), 657- 694 611.

Wreghitt, T. G., Hakim, M., Gray, J. J., Balfour, A. H., Stovin, P. G., Stewart, S., Wallwork, J. (1989). Toxoplasmosis in heart and heart and lung transplant recipients. *J Clin Pathol*, 42(2), 194-199.

Zhao, G., Yin, S., & K, Y. (2014). Research progress of interaction between *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins and host cells. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, 26(4), 453 - 456.

## ANEXOS

### Anexo 1. Folleto entregado a las gestantes del estudio.

#### ¿CÓMO SE PUEDE DIAGNOSTICAR LA TOXOPLASMOSIS?

##### DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Consiste en la detección de anticuerpos (IgG, IgM, IgA e Ige) producidos en las personas cuando se ha producido contacto con el parásito.

##### ¿Cómo se realiza?

El diagnóstico se realiza a partir de una muestra de sangre a la cual se realizan pruebas como:

ELISA, IFI, ELFA, quimioluminiscencia entre otras.



#### ¿POR QUÉ ES IMPORTANTE EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE LA TOXOPLASMOSIS?

El seguimiento serológico es importante en las embarazadas que presentan títulos altos por la prueba Toxoplasma IgG e IgM para evitar las secuelas de la enfermedad en el recién nacido a través del tratamiento clínico oportuno.

En embarazadas, se recomienda la detección de anticuerpos IgG e IgM al inicio del embarazo. En aquellas que no presenten títulos IgG (0.0) es fundamental un monitoreo mensual.

##### ¿CÓMO PODEMOS PREVENIR LA TOXOPLASMOSIS?

- Consumir carne bien cocida
- Tomar agua hervida
- Lavar bien las verduras y frutas
- No manipular carne cruda
- Utilizar guantes para la manipulación de tierra
- Evitar contacto con las heces de gatos
- Asistir a control prenatal
- Realizarse la prueba anti toxoplasma IgG e IgM en el caso que sea necesario

## TOXOPLASMOSIS



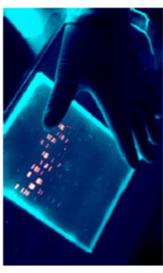
#### PROYECTO:

**"Papel de los Subtipos de IgG Contra Antígenos Recombinantes de *Toxoplasma gondii* "Como Marcadores Diagnósticos en la Toxoplasmosis Congénita": Estudio Multicéntrico"**

Grupo Investigaciones Biomédicas  
Universidad de Sucre

#### DIAGNÓSTICO MOLECULAR

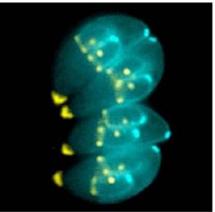
Consiste en la detección directa del parásito (ADN) en muestras de sangre y líquido amniótico a través de la prueba de PCR.





## TOXOPLASMOSIS

La toxoplasmosis es una enfermedad producida por el parásito *Toxoplasma gondii*, la cual afecta al hombre y a diferentes especies de animales. Su huésped definitivo es el gato y los huéspedes intermediarios los mamíferos y aves.



### ¿QUIÉNES SON LOS MÁS AFECTADOS?

Los más afectados son:

- Las mujeres embarazadas que no han tenido contacto con el parásito.
- Personas con inmunodeficiencia (SIDA)



### ¿CÓMO SE TRANSMITE?

La infección se puede transmitir por:

#### VÍA ORAL

- Consumo de carne cruda o poco cocida
- Manipulación de carne cruda
- Ingestión accidental por manipulación de tierra contaminada con parásitos
- Presentes heces de gatos
- Consumo de agua y verduras contaminadas con el parásito



#### VIA TRANSPLENTARIA

- Transmisión de la madre al feto a través de la placenta.



### ¿CUÁLES SON LOS SINTOMAS?

Pueden presentarse síntomas parecidos a un resfriado:

- Dolor de cabeza
- Dolor en el cuerpo
- Fiebre
- Dolor de garganta



### ¿Cuáles son las manifestaciones clínicas en el feto?

Las manifestaciones clínicas dependen del trimestre del embarazo en el cual se adquirió la enfermedad, dentro de ellas tenemos:

- Hidrocefalia y/o microcefalia
- Problemas visuales
- Retraso psicomotriz
- Epilepsia
- Retardo en el desarrollo neurológico
- Aborto



## Anexo 2. Consentimiento informado

### “Papel de los Subtipos de IgG Contra Antígenos Recombinantes de *Toxoplasma gondii* Como Marcadores Diagnósticos en la Toxoplasmosis Congénita: Estudio Multicéntrico”



Investigador responsable: **Pedro Blanco Tuirán.**

#### **Estimada señora:**

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por un parásito, que infecta a una variedad de animales y al hombre, puede ser transmitida a las personas por el consumo de agua, vegetales y carnes contaminadas con el parásito expulsado en las heces de gatos infectados. En caso de adquirir la infección durante el embarazo, el parásito puede ser transmitido al feto y ocasionar abortos y problemas de aprendizaje, problemas visuales, retardo en el crecimiento, e hidrocefalia en el niño. Queremos invitarla a participar en este estudio, dado que la Universidad de Sucre está interesada en buscar métodos para prevenir y mejorar el diagnóstico de esta enfermedad. Para su participación, necesitamos su autorización.

A continuación le contamos de qué se trata el estudio y la forma en que usted podría participar. En caso de tener alguna duda, por favor pregúntenos para aclararle.

- 1. En qué consiste el estudio:** Queremos prevenir la ocurrencia de la infección por este parásito y mejorar las pruebas empleadas en el diagnóstico de esta enfermedad a través de un monitoreo o control trimestral realizado a partir de una muestra de sangre a la cual se realizará varias pruebas para detectar casos de infección.
- 2. Cómo sería su participación en el estudio:** Si usted lo autoriza, se le tomará una muestra de sangre cada tres meses para el respectivo control prenatal. En caso de haber ocurrido infección durante el embarazo se le realizara un control a su bebé a partir de muestras de sangre tomadas durante los tres primeros meses de vida y luego a los seis, nueve y doce meses de vida.
- 3. Riesgos de su participación en el estudio:** No hay riesgo para usted, ni para su bebé, si decide participar en el estudio.

**4. Beneficios de su participación en el estudio:** Los resultados obtenidos lo beneficiarán a usted y a su bebe porque con el control realizado mediante la aplicación de pruebas de diagnóstico, ofrecidas en este estudio de carácter gratuito, podremos detectar oportunamente casos de infección para disminuir los daños causados en el niño mediante un tratamiento clínico adecuado, así como promover programas de prevención y control de la enfermedad.

**5. Derechos de los participantes:** Su participación en este estudio es voluntaria y gratuita. Si usted decide rechazar esta invitación a participar ó retirarse voluntariamente del estudio en cualquier momento, puede hacerlo.

Si usted ahora o en cualquier momento tiene cualquier pregunta, relacionada con esta investigación puede dirigirse al investigador principal **Pedro Blanco Tuirán**, Universidad de Sucre, Teléfono: 2820830 Celular: 3008033174.

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:** Si usted autoriza su participación, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.

Yo, \_\_\_\_\_ (Nombre completo de la gestante) declaro que se me han leído y explicado detalladamente los objetivos, los procedimientos y todos los aspectos relacionados con este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.

Acepto voluntariamente mi participación en el estudio y sé que estoy en libertad de retirarme cuando lo desee.

**Nombre, firma y documento de identidad de la gestante.**

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía N°. \_\_\_\_\_ De: \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_\_)

**Nombre, firma y documento de identidad del investigador.**

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía N°. \_\_\_\_\_ De: \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_\_)

### Anexo 3. Formato de colección de información tipo encuesta.

## “Papel de los Subtipos de IgG contra Antígenos Recombinantes de *Toxoplasma gondii* como Marcadores Diagnósticos en la Toxoplasmosis Congénita: Estudio Multicéntrico”



Encuesta N°: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### 1. Datos personales:

Nombre: \_\_\_\_\_  
CC.: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_  
Dirección de residencia: \_\_\_\_\_ Barrio: \_\_\_\_\_  
Entidad de salud: \_\_\_\_\_  
Centro de atención (IPS): \_\_\_\_\_

#### 2. Antecedentes Gineco-Obstétricos:

N° de partos: \_\_\_\_\_ N° de abortos: \_\_\_\_\_ Edad gestacional actual: \_\_\_\_ (semanas)

#### 3. Vivienda actual:

Material de la vivienda: Madera: \_\_\_\_ Bahareque: \_\_\_\_ Ladrillo-cemento: \_\_\_\_  
Plástico: \_\_\_\_ Cartón: \_\_\_\_ Otro: \_\_\_\_ ¿Cuál?: \_\_\_\_\_  
Piso de la vivienda: Cerámica: \_\_\_\_ Cemento: \_\_\_\_ Tierra: \_\_\_\_

#### 4. Contacto con gatos:

Tiene gatos en la casa: Si: \_\_\_\_ No: \_\_\_\_ Cuantos gatos tiene: \_\_\_\_\_  
Hace cuánto tiempo: \_\_\_\_\_ Tenía gatos: \_\_\_\_  
Tiene contacto con el gato/los gatos: Si: \_\_\_\_ No: \_\_\_\_

#### 5. Otros animales domésticos tiene en su vivienda: \_\_\_\_\_

#### 6. Hábitos alimenticios

- Que carne consume con mayor frecuencia: Res: \_\_\_\_ Cerdo: \_\_\_\_ Pollo: \_\_\_\_  
Pescado: \_\_\_\_ otra: \_\_\_\_ ¿Cuál?: \_\_\_\_\_
- Consume la carne: Bien cocida: \_\_\_\_ A medio cocer: \_\_\_\_ Cruda: \_\_\_\_
- Consume el agua: Directamente del grifo: \_\_\_\_ Hervida: \_\_\_\_ Filtrada: \_\_\_\_ En Bolsa: \_\_\_\_ De pozo: \_\_\_\_
- Ingiere jugos naturales que compra en la calle: Si: \_\_\_\_ No: \_\_\_\_

#### 7. Otros:

Manipula suelo: Si: \_\_\_\_ No: \_\_\_\_  
Manipula carne cruda: Si: \_\_\_\_ No: \_\_\_\_

#### **Anexo 4. Protocolo prueba Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma*.**

Para este ensayo se dejan secar a temperatura ambiente las láminas impregnadas con el antígeno (taquizoítos de *T. gondii*, a una concentración de 40 parásitos por campo microscópico), luego son adicionados en las áreas circulares de las láminas IFI, 15 µL de las muestras de suero problema, el control positivo (suero positivo a *T. gondii*) y el control negativo (suero negativo a *T. gondii*) previamente diluidos en una solución de PBS -Tween 80 al 1%, a partir de 1:16.

Las láminas son incubadas a 37°C en cámara húmeda por 30 minutos, luego lavadas con buffer fosfato salino (pH 7.2, 0.01M) 3 veces por 10 minutos y escurridas con papel filtro, las láminas se dejan secar a temperatura ambiente, luego se lavan y se adiciona en cada área circular 15 µL de anti-IgG humano marcado con fluoresceína (FITC), son incubadas a 37°C por 30 minutos.

Las láminas son lavadas con buffer fosfato 3 veces por 10 minutos, dejando secar a temperatura ambiente. Luego se adicionan gotas de Glicerina tamponada pH 8.5 y se utiliza una laminilla para observar en el microscopio de fluorescencia a 40X de aumento (Figura 4). Para la lectura se tiene en cuenta, que en el suero de referencia (positivo) se observe la superficie de los parásitos de un color verde amarillento fluorescente y en el suero control negativo se observara los parásitos de color rojizo opaco. Una muestra se considera reactiva para Toxoplasmosis cuando los títulos de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* fueron iguales o mayores a 1/16.

**Anexo 5. Fórmulas empleadas en el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y grado de concordancia Kappa de Cohen.**

Prueba a evaluar	Prueba de Referencia		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	VP	FP	Total positivos
Negativos	FN	VN	Total negativos
Total	Total de enfermos	Total de no enfermos	Total muestras

**Dónde:**

**VP:** Verdaderos positivos

**VN:** Verdaderos Negativos

**FP:** Falsos Positivos

**FN:** Falsos Negativos

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo} = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

**Análisis de Kappa de Cohen (Prueba de Concordancia)**

$$\text{Kappa} = \frac{Po - Pe}{(1 - Pe)}$$

\* Proporción de acuerdos encontrados (Po)

$$Po = \frac{VP + VN}{\text{Total muestras}}$$

\* Proporción de acuerdos al azar (Pe)

$$Pe = \frac{PA + NA}{\text{Total muestras}}$$

**Dónde:**

**VP:** Verdaderos Positivos

**VN:** Verdaderos Negativos

$$PA = \frac{\text{Total Positivos prueba de referencia} + \text{Total Positivos prueba evaluada}}{\text{Total muestras}}$$

$$NA = \frac{\text{Total Negativos prueba de referencia} + \text{Total Negativos prueba evaluada}}{\text{Total muestras}}$$

Luego de calcular el índice de Kappa de Cohen, el resultado obtenido se compara con los valores de la siguiente tabla y se determina el grado de concordancia de la prueba evaluada.

<b>Valores Kappa</b>	<b>Grado de acuerdo</b>
>0.00 – 0.20	Deficiente
0.21 – 0.40	Pobre
>0.41 – 0.60	Aceptable
0.61 – 0.80	Bueno
0.81 – 1.00	Excelente

**Anexo 6. Relación entre factores de riesgo y positividad para anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma*.**

<b>Factor Asociado</b>	<b>N° de Casos</b>	<b>N° de Casos Positivos</b>	<b>N° de Casos Negativos</b>	<b>Prevalencia (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>
<b>Localidad</b>						0.16; p= 0.67
Urbana	305	211	94	69.1	63 - 74	
Rural	66	44	22	66.6	53 - 74	
<b>Vivienda</b>						1.27; p= 0.25
Artesanal	114	83	31	66.9	60 - 72	
Ladrillo	257	172	85	72.8	63 - 80	
<b>Material piso</b>						6.26; p= 0.043
Tierra	138	102	35	73.9	65 - 80	
Cemento	182	125	57	68.6	61 - 75	
Cerámica	51	28	23	54.9	40 - 68	
<b>Presencia de animales domésticos</b>						0.39; p= 0.53
Si	204	143	61	70	63 - 76	
No	167	112	55	67	59 - 74	
<b>Presencia de gatos</b>						0.18; p= 0.66
Si	72	51	21	70	58 - 80	
No	299	204	95	68.2	62 - 70	
<b>Otros animales doméstico</b>						
Aves	49	37	12	75.5	60 - 80	1.39; p= 0.53
Perros	101	70	31	69.3	59 - 77	
Todos (aves-perros)	54	36	18	66.6	52 - 78	
Ninguno	167	112	55	67	59.3 - 74	
<b>Tipo de carne que consume</b>						7.33; p= 0.197
Cerdo	11	9	2	81.8	47.7 - 96.7	
Pollo	39	23	16	58.9	42.1 - 74	
Res	89	65	24	73	62.4 - 81.6	
Pescado	27	18	9	66.6	46 - 82.7	
Todas	188	132	56	70	63 - 76.5	
Ninguna	17	8	9	47	23.8 - 71.4	
<b>Consumo de agua</b>						3.30; p= 0.50
Bolsa	44	26	18	59	43.3 - 73.2	
Filtrada	16	10	6	62.5	35.8 - 83.7	
Hervida	82	57	25	69.5	58.2 - 78.9	
Pozo	19	15	4	78.9	53.3 - 93	
Grifo	210	147	63	70	63.4 - 76	
<b>Ha estado enferma</b>						0.65; p= 0.42
Si	111	73	38	65.7	56 - 74.3	
No	260	182	78	70	63.9 - 75.4	
<b>Ha presentado abortos</b>						0.02; p= 0.89
Si	88	61	27	69.3	58.4 - 78.4	
No	283	194	89	68.5	62.7 - 73.8	

**Anexo 7. Relación de las variables edad y periodo de gestación con resultados positivos por la prueba an-ELISA IgG anti-*Toxoplasma*.**

Factor Asociado	N° de Casos	N° de Casos Positivos	N° de Casos Negativos	Prevalencia (%)	IC 95%	$\chi^2$
<b>Edad gestantes</b>						2.85; p= 0.241
Entre 13 y 23 años	223	146	77	65.4	58.7 - 71.6	
Entre 24 y 33 años	123	90	33	73.1	64.2 - 80.5	
Entre 33 y 43 años	25	19	6	76	54.4 - 89.8	1.27; p= 0.25
<b>Edad gestacional</b>						
I trimestre	257	172	85	72.8	63 - 80	
II trimestre						6.26; p= 0.043
III trimestre	138	102	35	73.9	65 - 80	

**Anexo 8. Relación entre factores de riesgo y positividad para anticuerpos tipo IgM anti-*Toxoplasma*.**

<b>Factor Asociado</b>	<b>N° de Casos</b>	<b>N° de Casos Positivos</b>	<b>N° de Casos Negativos</b>	<b>Prevalencia (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>X<sup>2</sup></b>
<b>Localidad</b>						3.20; p= 0.073
Urbana	305	9	256	7.5	2.8 - 17	
Rural	66	5	61	2.9	1.4 - 5	
<b>Vivienda</b>						0.17; p= 0.68
Artisanal	114	5	109	4.3	1.6 - 10	
Ladrillo	257	9	248	3.5	1.7 - 6.7	
<b>Material piso</b>						0.23; p= 0.89
Tierra	138	6	132	4.3	1.7 - 9.6	
Cemento	181	6	175	3.3	1.3 - 7.4	
Cerámica	51	2	49	3.9	0.68 - 1.4	
<b>Presencia de animales domésticos</b>						3.21; p= 0.07
Si	204	11	193	5.3	2.8 - 9.6	
No	167	3	164	1.7	0.46 - 5.5	
<b>Presencia de gatos</b>						2.47; p= 0.115
Si	72	5	67	6.9	2.5 - 16	
No	299	9	290	3	1.4 - 5.8	
<b>Otros animales domésticos</b>						4.16; p= 0.244
Aves	49	2	47	4	0.7 - 1.5	
Perros	101	5	96	4.9	1.8 - 11	
Todos (aves-perros)	54	4	50	7.4	2.3 - 18	
Ninguno	167	3	164	1.7	0.4 - 5.5	
<b>Tipo de carne que consume</b>						1.53; p= 0.90
Cerdo	11	0	11	0	0 - 32	
Pollo	39	2	37	5.1	0.89 - 18	
Res	89	2	87	2.2	0.39 - 8	
Pescado	27	1	26	3.7	0.19 - 20	
Todas	188	8	180	4.2	1.9 - 8,5	
Ninguna	17	1	16	5.8	0.3 - 30	
<b>Consumo de agua</b>						3.85; p= 0.427
Bolsa	44	2	42	4.5	0.79 - 16	
Filtrada	16	0	16	0	0 - 24	
Hervida	82	4	78	4.8	1.5 - 12	
Pozo	19	2	17	10	1.8 - 34	
Grifo	210	6	204	2.8	1.1 - 6.4	
<b>Ha estado enferma</b>						1.16; p= 0.281
Si	111	6	105	5.4	2.2 - 11	
No	260	8	252	3	1.4 - 6	
<b>Ha presentado abortos</b>						0.04; p=0.83
Si	88	3	85	3.8	2 - 7	
No	283	11	272	3.4	0.88 - 10	