

Estandarization of an ELISA for Anti *Toxoplasma gondii* antibodies detection in Peruvian population

Mogollón Almidón, Miguel ^(1,2); Jiménez-Chunga, Juan A. ⁽²⁾

¹ Universidad Privada del Norte - (PE), Perú. <https://orcid.org/0000-0001-5252-156X>

² Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://orcid.org/0000-0002-0128-3028>

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

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

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

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

Keywords– Estandarization, ELISA, IgG antibodies, *Toxoplasma gondii*, Peru

Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en población peruana

Resumen– La infección por *Toxoplasma gondii* es una zoonosis de amplia distribución mundial cuyo impacto en salud pública se circunscribe mayormente a los cuadros clínicos de toxoplasmosis congénita, ocular y cerebral. A la fecha, se han implementado y adaptado una variedad de técnicas serológicas para el diagnóstico y estudio de esta parasitosis; sin embargo, son escasos los estudios en torno a la evaluación y validación de las mismas. El objetivo del presente estudio fue estandarizar y evaluar un ELISA casero para la detección de anticuerpos IgG anti *T. gondii* en población peruana.

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

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

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

Palabras clave– Estandarización, ELISA, anticuerpos IgG, *Toxoplasma gondii*, Perú

I. INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito cosmopolita capaz de infectar vertebrados homeotermos tanto de ambientes marinos como terrestres y aéreos, incluido el ser humano [1]. La zoonosis normalmente es originada por la ingesta de carnes poco cocidas infectadas con quistes o de ooquistes presentes en el ambiente. En individuos inmunocompetentes la infección es asintomática y controlada por el sistema inmune, pero la mayor morbi-mortalidad está asociada a la toxoplasmosis congénita y encefálica en neonatos y pacientes con VIH-SIDA, respectivamente [2–4].

En América del Sur es común la infección por *T. gondii*, lo cual estaría asociado a prácticas sanitarias deficientes en poblaciones nativas americanas, pues tienen un acceso limitado a servicios de saneamiento. A lo anterior se suma la diversidad genética del parásito en esta región, la cual está asociada a su virulencia y a los cuadros clínicos [5,6]. Sin

embargo, son pocos los estudios sobre esta zoonosis en Perú y estos indican seroprevalencias que oscilan entre el 40.0 y 56.7% [7,8].

La Organización Mundial de la Salud, en el marco de las prioridades de investigación en zoonosis e infecciones marginadas, destaca la necesidad de desarrollar técnicas diagnósticas que sean económicas y seguras para el estudio de la toxoplasmosis; lo cual demanda procesos de validación que brinden una mejor aproximación a la situación real de esta zoonosis [9,10].

El objetivo de este estudio fue estandarizar y evaluar la técnica inmunológica “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (ELISA) indirecto para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en población peruana.

II. METODOLOGÍA

a) Muestras biológicas

El tamaño de la muestra fue obtenido de acuerdo con lo propuesto por Jacobson y Flahault para la evaluación y validación de pruebas diagnósticas [11,12]. Considerando una sensibilidad diagnóstica del 97%, error del 5%, intervalo de confianza del 95% ($\alpha=1.96$), así como una prevalencia del 31% [7]. Se obtuvo un total de 100 sueros negativos y 45 sueros positivos.

Se muestreó un total de 178 voluntarios peruanos, mayores de edad, de ambos sexos, procedentes de Lima y Cusco. Además, se incluyeron muestras de la seroteca del Laboratorio de Neurocisticercosis del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (Lima). Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa en el antebrazo para la posterior obtención del suero por centrifugación a 2,300 rpm durante 5 minutos. Finalmente se fraccionaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.

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

b) Estandarización del ELISA

Se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno (1 ug/mL y 2 ug/mL), suero (1:500, 1:1000, 1:2000) y conjugado anti-IgG humana (1:5 000, 1:10 000) con la finalidad de estandarizar la técnica. Para ello se incluyeron 3 sueros positivos y 3 negativos (controles altos, medios y bajos),

obtenidos a partir de una distribución normal de absorbancias en el ELISA y confirmados por Western Blot.

c) ELISA

La técnica se desarrolló considerando la metodología de la Referencia [13] y los resultados obtenidos en la estandarización. Las placas de ELISA de poliestireno (Thermo Scientific, USA) fueron sensibilizadas con 100 μ L/pozo de antígeno total de *Toxoplasma gondii* cepa RH (2 μ g/mL) en solución amortiguadora de carbonatos 0.015 M pH 9.6 durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon los pozos con leche descremada al 5% en solución diluyente (PBS -Tween 20 al 0,05%, o PT). Posterior a tres lavados con PT, se agregaron 100 μ L de suero (1:500) diluido en PBS-T y se incubó a 37°C durante dos horas. Luego de la incubación y más lavados, se adicionaron 100 μ L/pozo de conjugado anti-IgG humana ligado a peroxidasa (Sigma, USA) diluido 1:5000 y se incubó nuevamente a 37°C, dos horas. Luego del último lavado se reveló la reacción con 100 μ L/pozo de la solución de cromógeno-sustrato (5 mL de ácido cítrico 0.1M, 5mL de citrato de sodio 0.1M, 4mg de O-fenilendiamina y 4 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%); la reacción se detuvo con 50 μ L/pozo de ácido sulfúrico 1 N. La absorbancia se registró a 492 nm haciendo uso de un lector de placas de ELISA ER500 (Sinnowa, China).

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

d) Prueba referencial

Todas las muestras de suero colectadas fueron sometidas a evaluación de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* mediante ELISA desarrollado y validado por el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría de México, siguiendo el protocolo establecido en la Referencia [13]. Esta técnica presenta una sensibilidad del 98.4% y una especificidad del 65%.

e) Análisis estadístico

El punto de corte se determinó mediante curvas ROC. Para determinar la bondad diagnóstica del ELISA se obtuvieron los índices de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y coeficientes de verosimilitud. Los datos fueron analizados mediante los programas SPSS 20 y Excel 2013.

f) Análisis inter e intra-ensayo

La evaluación inter ensayo consistió en la determinación de la correlación entre el registro de absorbancias de las muestras mediante la evaluación de los sueros peruanos

usando el estuche de ELISA mexicano en dos momentos diferentes.

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

Las evaluaciones de correlación inter e intra ensayo se hicieron por medio de la prueba de Pearson

III. RESULTADOS

Producto de la estandarización se halló una mejor discriminación entre sueros positivos y negativos bajo las siguientes condiciones: antígeno 2 μ g/ml, dilución de suero 1:500 y dilución de conjugado anti IgG humana 1:5000 (Figura 1).

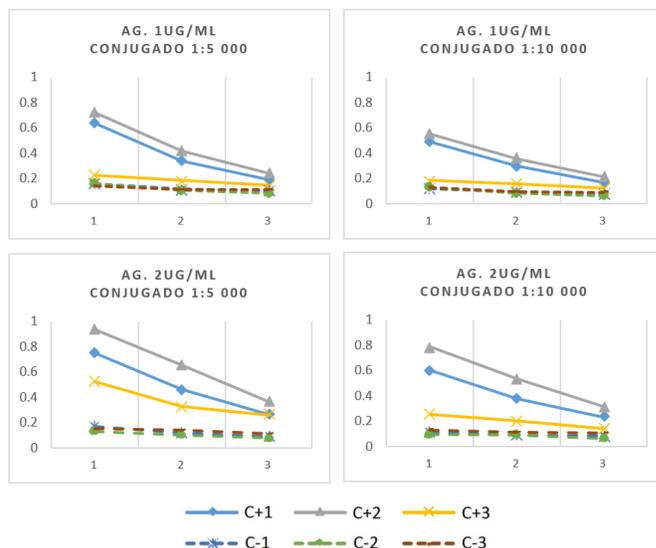
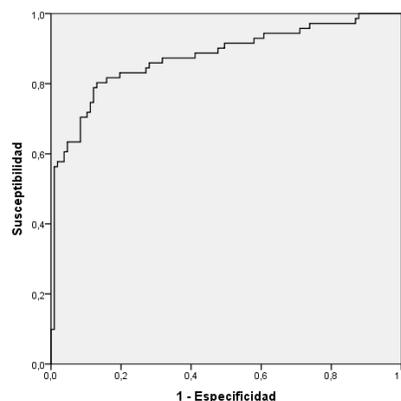


Fig. 1 Optimización del ELISA bajo diferentes concentraciones de antígeno, suero y conjugado
C+1, C+2, C+3: sueros positivos; C-1, C-2, C-3: sueros negativos
AG: Antígeno de *Toxoplasma gondii*

Mediante el análisis por curvas ROC se obtuvo un índice de reactividad (IR) óptimo de 1, con un área bajo la curva de 0.877 (Figura 2). En la evaluación posterior de todas las muestras se obtuvo un total de 93 positivas (IR \geq 1) y 85 negativas (IR < 1) (Figura 3). El resultado de estas muestras fue confirmado con el estuche de ELISA referencial.



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

Fig. 2 Curva ROC para la optimización del punto de corte

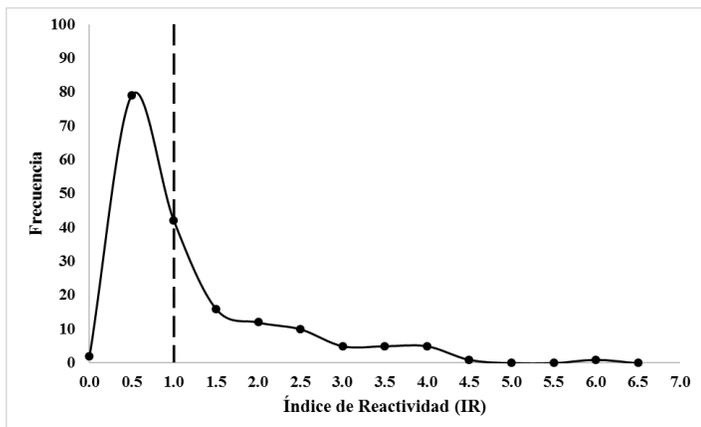


Fig. 3 Distribución de frecuencias de los índices de reactividad mediante la técnica de ELISA estandarizada
La línea punteada indica el punto de corte (IR = 1). n = 178.

IV. DISCUSIÓN

La infección causada por el protozooario parásito *Toxoplasma gondii* es una de las zoonosis más frecuentes a nivel mundial; ello debido a que, en comparación con otras parasitosis, el hombre como hospedero accidental se halla expuesto a varias vías de infección siendo la alimentaria la más frecuente [14]. La importancia que representa el estudio de la infección por *Toxoplasma gondii* y la toxoplasmosis, reside en los cuadros clínicos asociados a grupos de riesgo como pacientes VIH-SIDA y gestantes en los cuales se presenta la toxoplasmosis en su forma ocular - cerebral y congénita, respectivamente [15]. En ese sentido, el desarrollo de técnicas diagnósticas seguras para la confirmación de casos en la clínica o en estudios epidemiológicos, es una necesidad que se debe abordar y adaptar a contextos locales considerando la practicidad, seguridad y economía de estas [13,9]. A fin de brindar una mejor aproximación al estado de infección, es necesario someter estas técnicas a un proceso de validación en el cual se evalúa su idoneidad para el proceso que el investigador requiera [16,17]. Para el Perú, son escasos los reportes epidemiológicos sobre la infección por *T. gondii*, no habiendo sometido ninguno de ellos su técnica a un proceso de evaluación apropiada. Por ello, esta investigación fue orientada al desarrollo y evaluación de un ELISA capaz de detectar anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en población peruana, con el objetivo de contar con una herramienta útil para estudios subsecuentes en la epidemiología de esta zoonosis en el país.

Los parámetros diagnósticos del ELISA estandarizado fueron 85.9% y 70.1% para la sensibilidad y especificidad, respectivamente. El valor predictivo positivo (VPP) fue del 65.6%, mientras que el valor predictivo negativo (VPN) fue del 88.2% (Tabla 1).

TABLA 1
PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS DEL ELISA ESTANDARIZADO Y REFERENCIAL

	ELISA estandarizado	ELISA referencial
Sensibilidad diagnóstica (SD)	85.9	98.4
Especificidad diagnóstica (ED)	70.1	65.0
Valor predictivo positivo (VPP)	65.6	65.2
Valor predictivo negativo (VPN)	88.2	98.3
Coefficiente de verosimilitud positivo (CVP)	2.87	2.8
Coefficiente de verosimilitud negativo (CVN)	0.20	0.03

En la fase de estandarización se evaluaron diferentes condiciones de reactivos como parte de la optimización de los mismos para el mejor desempeño en la discriminación entre muestras positivas y negativas. Estas condiciones concuerdan con lo descrito en la referencia [18] quien estandarizó y validó un ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti *T. gondii* en mujeres gestantes. Un aspecto importante para destacar en este sentido es que entonces se requiere apenas un microlitro de suero para hacer la evaluación por esta técnica, lo cual facilita el proceso aun cuando haya dificultades en la toma de muestra o esta deba ser pequeña.

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

Mediante el análisis de índices de reactividad mediante curvas ROC, fue posible determinar el punto de corte óptimo con el cual se obtiene la mejor sensibilidad y especificidad, lo cual resultó en un 85.9% y 71%, respectivamente. Estos valores aunque no igualan o superan a los estuches disponibles en el mercado, permiten una buena captación de positivos y negativos, por lo que para fines diagnósticos tendría que estar acompañada de una prueba confirmatoria con alta

especificidad como el Western Blot. Con base en los coeficientes de verosimilitud, el ELISA peruano tiene una mejor capacidad para confirmar presencia de infección respecto al estuche ELISA mexicano, en tanto que la situación es inversa si se trata de confirmar ausencia de infección [13].

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

En la referencia [19] realizaron un estudio comparativo entre dos estuches comerciales que detectan anticuerpos IgG: Cobas 6000 Toxo IgG assay (Roche Diagnostics, USA; SD= 99.5%, ED= 98.8%) y Axsym Toxo IgG assay (Abbott Laboratories, USA; SD= 99.7%, ED= 99.1%). De acuerdo con sus valores de sensibilidad y especificidad, tienen una resolución casi perfecta para calificar las muestras como positivas o negativas en comparación con el ELISA desarrollado en el presente trabajo; sin embargo, es importante considerar que ambos estuches involucran antígenos recombinantes y procesos automatizados, lo cual eleva su costo y restringe su uso para estudios exploratorios de tipo epidemiológicos.

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

V. CONCLUSIÓN

El ELISA estandarizado y evaluado para la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii*, es una técnica altamente sensible, por lo cual puede ser empleado en estudios de tamiz o seroprevalencia; además de su fácil ejecución y bajo costo.

REFERENCIAS

[1] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217–58.
 [2] Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol.* 2008;38:1359–70.
 [3] Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol [Internet].* 2014;304(7):917–29. Available

from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422114001180>.
 [4] Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:264–96.
 [5] Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol [Internet].* 2009;39(12):1385–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>.
 [6] Cañón-Franco W, López-Orozco N, Gómez-Marín J, Dubey JP. An overview of seventy years of research (1944 – 2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasit Vectors [Internet].* 2014;7:427. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/427>.
 [7] Calderón M, Madico G, Gilman R, Montenegro T, Castillo R, Miranda E. detección de anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii* en tres áreas geográficas del Perú por IFI, ELISA y EITB. In: *Memoria X CONABIOL PERU.* 1992. p. 333–8.
 [8] Soria J, Pinto R, Tejada A. Estudio clínico serológico de la Toxoplasmosis. *Rev Peru Med Trop.* 2004;9:33–50.
 [9] WHO. Research Priorities for Zoonoses and Marginalized Infections - Technical report of the TDR Disease Reference Group on Zoonoses and Marginalized Infectious Diseases of Poverty. Vol. 971. Ginebra; 2012.
 [10] Conraths FJ, Schares G. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Vet Parasitol.* 2006;136:91–8.
 [11] Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1998;17(2):507–26.
 [12] Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol.* 2005;58:859–62.
 [13] Caballero-Ortega H, Castillo-Cruz R, Murrieta S, Ortíz-Alegría LB, Calderón-Segura E, Conde-Glez CJ, et al. Diagnostic-test evaluation of immunoassays for anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in a random sample of Mexican population. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:642–7.
 [14] El-Tras, W., Tayel, A.A. & El-Kady, N. Source diversity of *Toxoplasma gondii* infection during meal preparation. *Journal of Food Safety.* 2012; 32:1-5.
 [15] Sepúlveda-Arias, J. C., Gómez-Marín, J. E., Bobić, B., Naranjo-Galvis, C., & Djurković-Djaković, O. Toxoplasmosis as a travel risk. *Travel Medicine and Infectious Disease.* 2014; 592-601.
 [16] Van den Bruel, A., Aertgeerts, B. & Buntinx, F. Results of diagnostics accuracy studies are not always validated. *Journal of Clinical Epidemiology.* 2006;5: 559-566.
 [17] Knottnerus, J.A., Van Weel, C. & Murriss, J.W. Evaluation of diagnostic procedures. *BMJ.* 2002; 324, 477-480.
 [18] Ortíz-Alegría, L. B. (2004). Validación de Técnicas de Laboratorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM

contra *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México.

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