


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, seated on a throne and holding a book. The figure is surrounded by architectural elements like columns and arches. The Latin motto "SALVEMUS OBIS CONSPICUA CAROLINA ACCEPIIT" is inscribed along the top inner edge, and "SACRAE THEOLOGICAE FACULTATIS COACTEMALENSIS INTER" is inscribed along the bottom inner edge.


**“Adaptación y evaluación de un ensayo inmunoenzimático
para detección de toxoplasmosis neonatal”**

Manuel Alejandro Díaz Paz

Químico Biólogo

Guatemala, mayo de 2012

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**“Adaptación y evaluación de un ensayo inmunoenzimático
para detección de toxoplasmosis neonatal”**

Informe de Tesis
Presentado por

Manuel Alejandro Díaz Paz

Para optar al título de
Químico Biólogo

Guatemala, mayo de 2012

JUNTA DIRECTIVA

OSCAR CÓBAR PINTO, PH. D.

DECANO

LIC. PABLO ERNESTO OLIVA SOTO, M.A.

SECRETARIO

LICDA. LILIANA VIDES DE URIZAR

VOCAL I

DR. SERGIO ALEJANDRO MELGAR VALLADARES

VOCAL II

LIC. LUIS ANTONIO GÁLVEZ SANCHINELLI

VOCAL III

BR. FAUSTO RENÉ BEBER GARCÍA

VOCAL IV

BR. CARLOS FRANCISCO PORRAS LÓPEZ

VOCAL V

Agradecimientos

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, nuestra *alma mater*.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A mi asesora, Licda. Karla Lange, por toda su ayuda y jalones de oreja, muchas gracias por acompañarme en esta aventura.

A mis revisores: Lic. Armando Cáceres y Lic. Gerardo Arroyo, por sus correcciones y observaciones en este trabajo de tesis.

Al Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica y a todo su personal. Con un agradecimiento especial para la Licda. María del Carmen Bran, MSPH. Blanca Samayoa y Dra. Karin Herrera.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
III. ANTECEDENTES	2
A. <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1. Morfología	2
2. Ciclo de vida	3
3. Vías de trasmisión	4
B. Toxoplasmosis	5
1. Respuesta inmunitaria del hombre.....	6
2. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis neonatal	7
3. Epidemiología	8
4. Toxoplasmosis neonatal en Guatemala	8
5. Diagnostico	10
6. Diagnostico de infección congénita	14
7. Tratamiento	14
C. Tamizaje neonatal	14
1. Situación actual de tamizaje neonatal para la toxoplasmosis congénita	16
D. Adaptación de métodos inmunoenzimatico para detección en muestras de papel filtro	17
E. Evaluación de métodos analíticos cualitativos.....	18
F. Variables a evaluar en la validación de métodos inmunoenzimaticos para tamizaje neonatal	19
IV. JUSTIFICACIÓN.	26
V. OBJETIVOS.	28
VI. HIPÓTESIS	29
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
VIII. RESULTADOS	38
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
X. CONCLUSIONES.....	45

	Página
XI. RECOMENDACIONES.....	46
XII. REFERENCIAS.....	47
XIII. ANEXOS.....	51

I. RESUMEN

Desde la introducción de la técnica de ELISA se ha evaluado la opción de utilizar muestras de sangre seca en papel filtro como un método fácil y de bajo costo para obtener y transportar muestras de sangre entera y a partir de ello detectar anticuerpos para el diagnóstico serológico en enfermedades infecciosas provocadas por parásitos, virus, bacterias y enfermedades metabólicas .

Sin embargo para poder adaptar una metodología que utiliza como matriz sangre entera recolectada en papel filtro a una ya establecida en la cual se utiliza suero es necesaria la evaluación previa de esta adaptación, para comprobar si esta es capaz de obtener resultados confiables y reproducibles.

Los parámetros establecidos fueron el eluyente que funcione mejor como un agente extractor de anticuerpos (amortiguador fosfato salino, seroalbúmina bovina y el diluyente del kit comercial), el tiempo de incubación requerido para poder extraer la cantidad suficiente de anticuerpos que pueda ser detectada por métodos ELISA (18 y 24 horas de incubación) y el diámetro de papel filtro impregnado con la muestra (3 mm (11.25 μ L de suero) y 6 mm (22.5 μ L de suero)). Estas variables fueron evaluadas en conjunto para establecer la combinación más sencilla, reproducible y exacta.

Los resultados más precisos fueron los obtenidos al combinar las variables de 6 mm de diámetro de papel filtro impregnado con muestra, un tiempo de incubación de 24 horas utilizando como agente extractor de anticuerpos el diluyente del kit comercial. Estos resultados evidenciaron ser estadísticamente significativos al ser evaluados por medio de la prueba de hipótesis binomial.

Al establecer estos parámetros se consiguió adaptar los sistemas convencionales de ensayos inmunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA) para que puedan ser utilizados con muestras recolectadas en papel filtro como una prueba de rutina de tamizaje neonatal.

II. INTRODUCCION

La toxoplasmosis es una zoonosis frecuente, pero que pocas veces produce síntomas. Cuando una gestante sufre una infección aguda por *Toxoplasma gondii* puede transmitirla al feto. Si el feto se afecta, la enfermedad puede ser tan grave como para causarle la muerte o graves alteraciones en la vida postnatal.

Los programas de tamizaje neonatal tienen como objetivo detectar en los recién nacidos aparentemente sanos condiciones de riesgo que pueden conducir a retraso mental o muerte prematura. El papel de los programas de tamizaje ha sido exitoso para el diagnóstico de enfermedades subclínicas, ya que se logra un diagnóstico en los primeros días de vida del recién nacido, que permiten brindar el tratamiento oportunamente, evitando así las manifestaciones clínicas.

En el presente estudio se establecieron los parámetros para adaptar un método sérico inmunoenzimático (ELISA) comercial a la detección de anticuerpos IgM anti *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro, técnica estándar utilizada en los programas de tamizaje neonatal.

III. ANTECEDENTES

A. *Toxoplasma gondii*

T. gondii es un parásito coccidiano que se encuentra relacionado con el género *Plasmodium*, *Isospora* y otros miembros del tipo *Apicomplexa*. Se trata de un parásito intracelular que se encuentra en una amplia variedad de animales, como los gatos, cerdos, ovejas y aves, así como en el ser humano. Se conoce de su existencia desde 1908 cuando Nicolle y Monceaux, lo aislaron del hígado y el bazo del roedor salvaje tunecino *Ctenodactylus gondii*. Desde entonces se ha observado que *T. gondii* puede infectar a personas inmunocompetentes, mujeres embarazadas y a pacientes con alguna inmunosupresión. Tan solo se ha descrito una especie y parece existir poca variación entre las distintas cepas. El reservorio natural de *T. gondii* es el gato doméstico común y otros felinos (1-2).

1. Morfología

Este parásito adopta tres diferentes estadios principales, los cuales son: los taquizoítos, quistes tisulares y ooquiste. Además el ciclo biológico de *T. gondii* se encuentra conformado por otros dos estadios, los cuales son los bradizoítos que se desarrollan dentro de los quistes formados en tejido humano y los merozoítos que se desarrollan en las células intestinales de los animales que funcionan como reservorio (1-3).

La forma infectante es el ooquiste que sale de su reservorio, que son las materias fecales de los animales infectados, es casi esférico y mide de 10 a 12 μ , en su interior se forman los esporoquistes y en cada uno de ellos hay 4 esporozoítos (4).

El taquizoíto mide 6 μ de longitud por 2 μ de ancho. Su forma es alargada y un poco arqueada, con una membrana externa compuesta por laminina unida a proteínas y otra membrana interna, ambas interrumpidas en uno de sus lados por una pequeña boca llamada microporo. Al microscopio electrónico se observan varias estructuras semejantes a las mencionadas para los merozoítos de *Plasmodium*, ya que ambos parásitos tienen las características del filo Apicomplexa. En el citoplasma se les visualiza el citoesqueleto con los microtúbulos y en la parte anterior se localiza el conoide y los anillos preconoidales. Tienen, además, los micronemas, mitocondrias, aparato de Golgi y varios gránulos (Anexo 1) (4).

Los quistes tisulares poseen una membrana propia y miden entre 20 y 200 μ , de forma generalmente redondeada, algunas veces alargada. En su interior se encuentran cientos de

parásitos conocidos como bradizoítos, término que señala los elementos extraepiteliales que se forman por multiplicación lenta. Estos parásitos intraquísticos miden aproximadamente 7 μ de longitud por 2 μ de ancho (Anexo, Figura 1) (4).

2. Ciclo de vida

El ciclo de *T. gondii* corresponde al de las coccidias, las cuales representan un ciclo enteroepitelial, en donde aparece formas sexual y asexual. Cuando el gato u otro animal que funcione como reservorio ingiere alguna de las formas del parásito, sufre en las células epiteliales de su intestino ambos ciclos (asexual y luego sexual), eliminándose en sus heces millones de ooquistes; cuando estos esporulan, se vuelven infecciosos pudiéndose infectar otros animales por su ingestión. La esporulación es un proceso que requiere varios días y depende de condiciones favorables como terreno húmedo y cálido (3,4)

a) Ciclo de vida en el animal reservorio.

El animal se infecta por taquizoítos, quistes u oocistos que al ser ingeridos penetran en los enterocitos del intestino delgado, principalmente en el íleon (el gato es quien presenta la tasa mas alta de infectividad). Allí el parásito se multiplica por medio de esquizogonias y se diferencian las formas sexuales o gametogonias en donde se origina los macro y microgametocitos que luego pasan a gametos. El microgameto que es flagelado y con capacidad de desplazarse corresponde al parásito masculino y es el que fecunda el macrogameto o parásito femenino. Así se realiza la reproducción sexuada en el intestino del gato y que a partir de este se desarrollan los ooquistes que salen en grandes cantidades con las materias fecales y maduran en 1 a 5 días en el medio ambiente, allí esporulan y en su interior forman dos espororquistes, cada uno de los cuales desarrolla 4 esporozoítos. Los ooquistes constituyen las formas infectantes del parásito en condiciones naturales y cada gato puede eliminar varios millones de estas formas parasitarias (3,4).

b) Ciclo de vida en el hombre

El hombre se infecta mediante la ingestión de los ooquistes esporulados diseminados en el medio ambiente. Aproximadamente a los 30 min. de haber sido ingeridos, los esporozoítos emergen y ocasionan la invasión extraintestinal, de esta manera se desarrolla un ciclo incompleto en los huéspedes intermediarios. Los esporozoitos atraviesan el epitelio intestinal y se distribuyen

por fagocitosis o por invasión activa del parásito. Dentro de las células del huésped forman una vacuola parasitófora en donde se transforman en taquizoítos, llamados así porque son parásitos extraintestinales que se multiplican rápidamente y se reproducen mediante un proceso que se conoce como endodiogenia, en el cual se generan dos parásitos dentro de una célula madre. Al aumentarse el número de parásitos intracelulares la célula se destruye y se inicia un nuevo proceso de invasión en las células vecinas, en un ciclo prolifreativo (4).

El parásito que se aloja en los tejidos forma un quiste intracelular. En las infecciones crónicas los quistes son las formas predominantes. Los merozoítos que resultan del desarrollo asexual penetran en los vasos linfáticos y la sangre, dando origen a la formación de pseudoquistes y quistes en diferentes órganos del cuerpo. La transmisión de madre a feto tiene lugar vía transplacentaria, produciéndose toxoplasmosis congénita (Anexo 1, Figura 2) (4,5).

3. Vías de transmisión

Se transmite fundamentalmente por dos vías, la oral y la transplacentaria, aunque, se ha visto en la actualidad la posible transmisión a través de los órganos de donantes seropositivos a los receptores seronegativos (1-5).

a) Transmisión por vía oral

La infección por *T. gondii* se adquiere mediante la ingestión de carne cruda o poco cocida que contenga quistes tisulares, o la ingestión de ooquistes excretados en las heces de gatos parasitados y madurados en el ambiente. La contaminación de aguas u hortalizas por ooquistes, o la manipulación de tierra o plantas que estén en contacto con excrementos de gato, pueden acarrear la contaminación de los alimentos crudos o la transmisión por vía oral, a través de las manos (5).

Una vez ingeridos, la pared externa de quistes y ooquistes se rompe por digestión enzimática y las formas infecciosas del parásito son liberadas a la luz del intestino. A partir de este momento invaden rápidamente las células colindantes, donde se transforman en taquizoítos, que son las formas invasivas, pasando a la fase parasitémica, por diseminación. Cuando se desarrolla la respuesta inmunitaria, los taquizoítos libres disminuyen la velocidad de multiplicación intracelular pasando, en el transcurso de unas semanas, de la fase proliferativa o aguda a la fase crónica, en la que algunos parásitos continuarán multiplicándose lentamente (bradizoítos) formando los quistes

tisulares. *T. gondii* puede infectar prácticamente todos los tejidos del organismo, con posibilidad de diseminación generalizada (5-7).

b) Transmisión transplacentaria

Se produce durante la fase parasitémica de la infección por *T. gondii* en el embarazo, en donde diversos factores como el inóculo parasitario, la virulencia de la cepa y el estadio evolutivo de la placenta van a condicionar la posibilidad de una infección fetal, el tiempo que media entre ambos procesos y su gravedad. Las mujeres infectadas antes de la concepción no suelen transmitir la toxoplasmosis al feto. El riesgo de infección transplacentaria aumenta desde el 15% hasta el 30 y el 60% cuando la madre se contagia durante el primero, el segundo o el tercer trimestre del embarazo, respectivamente (2,4,6).

B. Toxoplasmosis

1. Clínica de la enfermedad

La mayoría de las infecciones por *T. gondii* son benignas y asintomáticas, y los síntomas tan sólo aparecen cuando los parásitos pasan de la sangre a los tejidos, donde se convierten en formas intracelulares. En los casos con enfermedad sintomática, la infección se caracteriza por destrucción celular, multiplicación de los organismos y, en última instancia, guardan relación con la localización de las lesiones y pueden incluir hemiparesia, convulsiones, trastornos visuales, confusión y letargo. Sin embargo, en esta parasitosis es necesario diferenciar tres tipos de pacientes: los individuos inmunocompetentes, las mujeres embarazadas y sus fetos (toxoplasmosis congénita) y los pacientes inmunosuprimidos (1-4,6).

a) Toxoplasmosis en individuos inmunocompetentes

En ellos la toxoplasmosis es una enfermedad de la infancia o de la adolescencia que a menudo pasa desapercibida. A pesar de que se pueden manifestar síntomas como dolor muscular, astenia, cefaleas e inflamación de los ganglios linfáticos, ninguno de ellos es característico de esta parasitosis (2,4).

b) Toxoplasmosis en individuos inmunosuprimidos

Esta parasitosis oportunista afecta a muchas personas viviendo con VIH/Sida (PVVS) que han estado en contacto previamente con *T. gondii* y albergan en su organismo formas de vida latentes. En las primeras fases del síndrome de inmunodeficiencia adquirida el sistema inmune aún no está deteriorado, y por lo tanto le es posible controlar la parasitosis, si bien, a medida que avanza la enfermedad y el sistema inmune se va deteriorando empiezan a manifestar síntomas, entre los que destacan astenia, febrículas, cefaleas, eritema cutáneo, mialgias, artralgias, náuseas y ocasionalmente diarreas, confusión, debilidad y cambios en la visión; pueden empeorar y progresar al coma o a la muerte a no ser que la toxoplasmosis sea identificada y tratada inmediatamente. La toxoplasmosis es una de las causas más comunes de lesiones cerebrales en PVVS que a menudo son confundidas con linfomas. También afecta a la retina provocando visión borrosa y a menudo hay compromiso pulmonar o del sistema nervioso central (1,3,5).

c) Toxoplasmosis congénita.

Se produce cuando la mujer gestante contrae la infección por primera vez durante el embarazo o inmediatamente antes de éste, afectando en un 65% de los casos al recién nacido. La infección materna es asintomática pero la parasitosis manifestada en el feto es muy grave, sin embargo los anticuerpos generados por toxoplasmosis previa a la concepción, protegen a la madre inmunocompetente de la infección durante el embarazo (2-4).

La tasa de infección fetal es inversamente proporcional a la etapa de la gestación en la que se contrae, ya que a medida que avanza el embarazo aumenta la capilaridad en la placenta facilitándose así el paso de los taquizoitos que pueden provocar lesiones necróticas en diferentes órganos fetales, retrasa el crecimiento intrauterino o provocar partos prematuros o abortos. La gravedad de la infección en el feto es mayor cuanto menor es la edad de éste y no está relacionada con la severidad de los síntomas maternos. Del 80 al 90% de los neonatos con infección adquirida durante el embarazo no presentan síntomas aparentes en el momento del parto, pudiendo aparecer éstos meses o años después del nacimiento. Las diferencias en las tasas de transmisión y en las consecuencias se deben probablemente al flujo sanguíneo placentario, a la virulencia y cantidad de *T. gondii* adquirido y a la capacidad inmunológica de la madre para limitar la parasitemia (2,4,7-9).

2. Respuesta inmunitaria del hombre

Los huéspedes que albergan el parásito, desarrollan gran actividad inmunitaria tanto de tipo celular como humoral y hay protección contra la reinfección. La inmunidad se logra en la infección inicial, por la actividad reproducción intracelular y destrucción de las células con salida de los parásitos. A medida que se estimula la respuesta inmune, esta induce al parásito a formar quistes en los tejidos; en este momento los taquizoítos extracelulares son lisados por acción de anticuerpos y el complemento (4,10).

Aunque la inmunidad mediada por anticuerpos es efectiva contra el parásito, se considera más importante la inmunidad celular. Hay evidencia de que los linfocitos T secretan sustancias específicas que inhiben o destruyen los parásitos. Se ha demostrado que los linfocitos CD4⁺ tienen actividad citotóxica contra células infectadas y parásitos libres. También se ha observado un aumento de los linfocitos CD8⁺ y una inversión de la relación entre los CD4⁺ y los CD8⁺, y un aumento de las células asesinas naturales (NK) y de macrófagos. La capacidad de los macrófagos para destruir a los parásitos depende del grado de activación de estos mediante el interferón gamma (IFN- γ) y otras citoquinas. La destrucción de los parásitos por los macrófagos se hace por metabolismo oxidativo (11).

3. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis neonatal

Las manifestaciones clínicas en los recién nacidos son diversas y entre ellas destaca hidrocefalia, convulsiones, coriorretinitis, ictericia, hepatoesplenomegalia, púrpura trombocitopénica, anemia, eosinofilia; o pueden aparecer manifestaciones más tardías como retraso en el desarrollo psicomotor, retraso mental, sordera, estrabismo, trastornos en el aprendizaje o calcificaciones intracraneales. Más de la mitad de los recién nacidos con infección congénita son considerados normales en el período perinatal, pero prácticamente todos ellos tendrán afectación ocular más tarde durante su vida. Los signos neurológicos en los neonatos, incluidas convulsiones, signo de la puesta de sol y aumento del perímetro craneal debido a la hidrocefalia, pueden asociarse un daño cerebral severo (2, 4, 7-10).

Couvreur, Desmonts y colaboradores realizaron un estudio del espectro y frecuencia de las manifestaciones de la infección congénita por *T. gondii* en 210 lactantes en hospitales de París, Francia. La infección inicialmente se sospechó porque se había identificado a sus madres mediante un programa de detección selectiva serológica, que detectaba infección aguda por *T. gondii* en embarazadas. 21 lactantes (10%) presentaban toxoplasmosis congénita grave con afección del

sistema nervioso central, lesiones oculares y manifestaciones sistémicas generales. 71 (34%) tenían una afección leve con exploración clínica normal, excepto por las cicatrices retinianas o calcificaciones intracraneales aisladas. En 116 (55%) no se encontraron manifestaciones clínicas detectables. Algunas de estas manifestaciones si no son tratadas provocan en la mayoría de los casos la muerte en el primer año de vida (12).

4. Epidemiología

Los gatos, mamíferos pequeños y pájaros son los reservorios naturales de *T. gondii*, pero puede infectarse prácticamente cualquier animal que tenga contacto e ingiera material contaminado por ooquistes o tejidos conteniendo quistes. La prevalencia de esta infección es generalmente mayor en las áreas rurales que en las urbanas, dependiendo de factores climáticos y socioeconómicos (1,4,13).

En países como Dinamarca, Finlandia, Noruega y Reino Unido (27,4%, 20,3%, 10,9% y 7,7%, respectivamente donde la seroprevalencia es baja), el porcentaje de mujeres con riesgo de contraer la infección primaria por *T. gondii* durante la gestación es alto, al igual que el riesgo para el feto. A nivel mundial la incidencia de la toxoplasmosis congénita varía de un lugar a otro, pero puede oscilar entre 1:1000 y 1:10000 nacidos vivos dependiendo de la zona geográfica, estilo de vida y nivel socioeconómico de la población. Anualmente nacen en Estados Unidos entre 400 y 4,000 niños afectados por toxoplasmosis congénita, mientras que en Francia nacen 6 de cada 700 con esta infección (3,14,15),

En Suecia donde la incidencia de infección por *T. gondii* durante el embarazo es baja, registra una prevalencia de 0.73 por cada 10 000. Tamizajes realizados en Brasil reportan una incidencia de toxoplasmosis congénita al nacer de 8 en 10 000. Los estudios epidemiológicos realizados en Cuba permiten estimar conservadoramente que el porcentaje de positividad a *T. gondii* en gestantes se encuentra entre un 51 y un 75% y que nacen anualmente alrededor de 250 niños infectados por este parásito, aunque en el momento del nacimiento sólo un pequeño número de ellos presente evidencias clínicas de la infección. Estudios de seroconversión indican tasas de 0.2 a 2.0%, dependiendo del área de salud estudiada (15,16,17).

5. Toxoplasmosis neonatal en Guatemala

Durante marzo de 1975 y febrero de 1979 Cáceres y colaboradores realizaron un estudio sobre la coriorretinitis toxoplasmósica en Guatemala, en el cual estudiaron 501 muestras,

provenientes del Hospital General San Juan de Dios (40.3%); oftalmólogos en el ejercicio privado (23.6%); Hospital Rodolfo Flores (6.6%); y muestras provenientes de otras instituciones públicas y privadas (29.5%). Las muestras provenían de personas en donde el motivo principal de consulta fueron coriorretinitis u otro síntoma indicativo de infección congénita o diseminada (hepatoesplegomegalia, microcefalia, calcificaciones, ictericia o linfadenopatías), en donde se pudo observar que tanto en los pacientes que presentaron coriorretinitis como único síntoma de consulta (65%), como en aquellos que tenían otros síntomas sospechosos de infección (73%), se encontraron con títulos significativos ($>1:160$) en el 30 % de ellos (18).

En Guatemala, diversos estudios llevados a cabo demuestran que entre 41.7% de la población general presenta evidencia serológica de la primoinfección, por lo que, entre el 30% la población general es susceptible de sufrir la enfermedad. Teniendo en cuenta que según el último censo de la población en el año 2000, 50.2% de la población era de sexo femenino y 2,098,943 mujeres se encontraban en edad fértil, existe aproximadamente tres cuartos de esta población esta en peligro de adquirir la infección aguda en estado de gravidez (13).

En 1992 Sinibaldi y de Ramírez realizaron un estudio en 150 muestras de sangre de cordón umbilical para la detección de toxoplasmosis congénita en un hospital del área urbana, en el cual 6 muestras fueron positivas para anticuerpos IgM anti *T. gondii* lo cual representa una incidencia de 10.9 por 1000 nacidos vivos (13).

En 1999, se llevó a cabo una encuesta serológica y un cuestionario con evaluación de factores de riesgo para *T. gondii* como parte de un proyecto de investigación financiado por Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), en este estudio se evaluaron 532 niños de 6 meses a 3 años de edad en aldeas de San Juan Sacatépequez, Municipio del Departamento de Guatemala, 66 (12.4%) fueron positivos para anticuerpos IgG a *T. gondii* (19).

Posteriormente en 2007, 8 años después de este estudio inicial, se intentó localizar a los 66 niños seropositivos para someterlos a un examen oftalmológico buscando toxoplasmosis ocular. Adicionalmente se examinó a 104 niños que habían sido seronegativos en el estudio inicial, como controles, de los 66 niños seropositivos, 44 (67%) fueron localizados y examinados para lesiones oculares, de los cuales dos de ellos presentaron lesiones oculares consistentes con toxoplasmosis ocular. Del grupo control (seronegativos en 1999) también se encontraron dos niños con lesiones oculares consistentes a toxoplasmosis, estos últimos datos concuerdan con lo reportado en la literatura acerca de que la prevalencia aumenta entre los 3-10 años de edad. Este

estudio presentó problemas en localizar a algunos individuos y dificultades para obtener la fotografías retinianas entre otros, sin embargo se demostró que las lesiones oculares pueden presentarse en niños que han sido infectados por *T. gondii* (8).

En 2006 se reportó la manifestación anual de toxoplasmosis congénita en Guatemala con datos provenientes del Hospital General San Juan de Dios (25 casos positivos), en una población de 623 neonatos que nacieron en este hospital, en la cual se buscó esta infección, ya que las madres presentaban pruebas positivas de anticuerpos IgM durante su embarazo (8).

En 2006, Zambrano realizó un estudio en el cual determinó la prevalencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii* en embarazadas que asistieron al Departamento de Maternidad del Hospital Roosevelt siendo este de 69.9%, durante los meses de junio y julio del año de 2004. Aunque estos datos nos indican el índice de exposición al parásito, no dan un reflejo sobre la infección aguda, la cual puede ser transmitida al feto (20).

Según las estadísticas del Comité Nacional Pro Ciegos y Sordos de Guatemala en el 2006 se reportan 130 casos de ceguera relacionada con toxoplasmosis, lo cual representa el mismo número de casos de toxoplasmosis subclínica no diagnosticada. Estos datos demuestran que en Guatemala se le presta poco interés a esta enfermedad lo cual hace necesaria la implementación de métodos alternos, sencillos y rápidos para determinar la toxoplasmosis congénita. La poca información de sobre el número de madres que padecen esta patología y la prevalencia en neonatos infectados por toxoplasmosis hace que las manifestaciones de la enfermedad se detecten solamente cuando son irreversibles. A pesar de todos estos estudios, ninguno ha sido realizado con el fin de detectar la toxoplasmosis congénita en un tiempo prudencial para evitar así las afecciones que causa esta infección a los neonatos (8,20).

6. Diagnóstico

Hoy en día, el diagnóstico etiológico de la toxoplasmosis se basa, casi exclusivamente, en la detección de anticuerpos específicos en suero, reservándose las técnicas de inoculación al ratón, biología molecular y el cultivo celular para investigaciones (1,2,4).

Las reacciones serológicas son el principal instrumento para el diagnóstico, dado que la mayoría de las infecciones por *T. gondii* son subclínicas o sus síntomas poco característicos y muchas veces, sutiles. La confirmación de una infección aguda en la embarazada puede ser difícil a pesar del uso de métodos altamente sensibles para medir los niveles de IgG, IgM, IgA e IgE.

Cuando se evalúa a una paciente en quien se sospecha una infección por *T. gondii*, debe considerarse el método serológico particular empleado para detectar los anticuerpos (4,5,21,22).

Los métodos usados para el diagnóstico difieren en las distintas situaciones clínicas, ya sea por infección adquirida en el huésped inmunocompetente, en el inmunodeficiente o infección congénita. Los métodos diagnósticos se clasifican en directos o indirectos (21).

a) Métodos directos

Se basan en la detección del parásito en sangre, líquidos orgánicos o biopsias de tejidos mediante la demostración de los taquizoítos en cortes o preparaciones de tejidos o líquidos corporales. Sin embargo es posible la detección por técnicas histológicas y su aislamiento en cultivos celulares o por inoculación en ratón (4,22).

i) Cultivo: Los parásitos se aíslan mediante la inoculación de líquidos corporales, leucocitos o muestras de tejido en ratones o cultivos tisulares. Los líquidos corporales deben de ser procesados e inoculados inmediatamente, aunque *T. gondii* se ha aislado en tejidos y sangre que se han almacenado a 4°C durante toda la noche. La congelación o el tratamiento de las muestras con formalina destruyen a *T. gondii*. A los 6-10 días de la inoculación en ratones, o antes si estos mueren, se deben buscar taquizoítos en el líquido peritoneal. Si sobreviven 6 semanas y hay anticuerpos en el plasma del ratón inoculado, el diagnóstico definitivo se realiza visualizando los quistes de *T. gondii* en el cerebro del ratón. Si no se ven quistes, se llevan a cabo subinoculaciones de tejido del ratón en otros ratones (4,16,23).

ii) Examen microscópico: La infección aguda puede diagnosticarse demostrando la presencia de taquizoítos en cortes tisulares de biopsias, en aspirados de médula ósea o en líquidos corporales como el líquido cefalorraquídeo o el líquido amniótico. Pueden necesitarse técnicas de tinción con anticuerpos fluorescentes o inmunoperoxidasas porque habitualmente es difícil ver los taquizoítos con las tinciones normales. Los quistes tisulares son diagnósticos de infección, pero no diferencian entre una infección aguda o crónica; la presencia de numerosos quistes sugieren infección aguda reciente. Los quistes placentarios o en los tejidos del recién nacido establecen el diagnóstico de infección congénita. Las características histológicas típicas sugieren el diagnóstico de linfadenitis toxoplásmica (4,10,16, 23).

iii) Técnicas moleculares: Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectarse el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *T. gondii* en tejidos y fluidos corporales. Cuando esta técnica se aplica a los tejidos (donde puede haber quistes) resulta imposible distinguir infección latente de activa pero es válida para el estudio de sangre, líquido amniótico o líquido cefalorraquídeo, donde no hay quistes (24).

b) Métodos indirectos

Se basan principalmente en la detección de anticuerpos específicos contra *T. gondii* del paciente frente a la infección. La interpretación de estos exámenes debe ser muy cuidadosa, ya que la prevalencia de la infección asintomática es muy alta en mujeres embarazadas y recién nacidos seropositivos (19,21).

i) Prueba de Sabin Feldman (Dye test): Esta es una prueba que ya no se usa, ya que se necesitan microorganismos vivos, detecta IgG e IgM específicas antimembrana. Es altamente sensible y específico, y no se conocen reacciones cruzadas con otras parasitosis humanas. Está sólo al alcance de laboratorios especializados. Un resultado negativo permite excluir la infección (22).

ii) Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Se puede usar para medir anticuerpos IgG ó IgM. La prueba se ha adoptado para demostrar anticuerpos IgM específicos, aunque se ha visto que esta prueba no tiene la sensibilidad para detectar una respuesta específica de anticuerpos IgM en el feto o en el recién nacido por lo cual no debe usarse para investigar infecciones congénitas. Sin embargo tiene inconvenientes importantes, como lo son la aparición de falsos positivos en sueros que contengan factor reumatoide, una reactividad negativa falsa debida a un efecto inhibitor de los títulos elevados de IgG y los kits comerciales varían respecto de la confiabilidad y la estandarización (4,22).

iii) Fijación de complemento (FC): Esta prueba es específica pero poco sensible. Se utiliza un antígeno soluble, los títulos de anticuerpos son generalmente bajos y pocas veces se elevan por encima de 1:256. La reacción tiene un valor limitado y se hace positiva más tardíamente cuando se compara con las técnicas de inmunoensayo, inmunofluorescencia y hemaglutinación indirecta. Generalmente aparece de 3 a 4 semanas después de iniciada la infección. Se vuelve

negativa rápidamente, entre 6 y 9 meses. Se pueden encontrar reacciones falsas positivas con factor reumatoide (7,23).

- iv) Hemaglutinación Indirecta (HAI): Detecta anticuerpos IgM e IgG, y es fácil de realizar. Se positiviza dentro de las 2 primeras semanas o más tardíamente (hasta 2 meses), y se considera actividad a un título igual o superior a 1:64. No se recomienda para el diagnóstico de infección congénita, ni para enfermedad aguda en embarazadas, ya que la prueba puede ser negativa al principio de la infección, y por un período más largo. Es útil como prueba adicional (7,23).

- v) Análisis de inmunoabsorción por enzimas (ELISA): Este detecta precozmente anticuerpos IgM e IgG, al igual que anticuerpos IgA específicos contra *T. gondii*, que tienen una cinética similar a los anticuerpos IgM. Es un método de relativa utilidad para el diagnóstico de la infección aguda y congénita. Para IgM la técnica elimina la posibilidad de falsos positivos por factor reumatoideo. Es más sensible este método por inmunofluorescencia para IgM. Sus ventajas incluyen la reducción de resultados falsos negativos debidos a la presencia de títulos elevados de IgG. Los títulos pueden volverse positivos durante las 2 primeras semanas de la infección, pero con este método pueden persistir hasta 1 año (23, 25).

- vi) Ensayo de aglutinación por inmunoabsorción (ISAGA IgM y DS-ELISA IgM): Permiten evaluar anticuerpos IgM e IgA en un estadio más temprano en el curso de la infección, y los títulos pueden persistir durante un lapso más prolongado (mayor de 1 año) después de la remisión de la infección aguda. Presenta buena sensibilidad y especificidad, por lo que evita los resultados falsos negativos, pero debe evaluarse un título positivo en forma adicional por medio de niveles seriados de IgG o IgM para determinar si la infección se halla realmente en un estadio agudo. Los títulos de IgM pueden persistir durante más de 1 año cuando se determinan por este método. La semivida de IgM en la toxoplasmosis congénita es de 3-5 días, por lo que, si existen pérdidas placentarias, el nivel de IgM en el plasma del neonato disminuyen significativamente en 1-2 semanas. En esta técnica como en el ELISA, detecta anticuerpos IgM antitoxoplasma más rápidamente que otros métodos de diagnóstico por lo que en la actualidad estas de técnicas son la mejor prueba para el diagnóstico de infección congénita (23).

vii) Prueba de Frenkel: Esta es una prueba cutánea (cutaneorreacción con toxoplasmina de Frenkel). Es una reacción de tipo alérgico retardada cualitativa. La inmunidad celular habitualmente se evidencia a las 4 semanas postinfección, y puede llegar hasta los 6 meses. Persiste en el individuo inmunocompetente de por vida. Su positividad muestra presencia de anticuerpos, pero no grado de actividad. El 60% de la población es positiva para éste. Su valor es limitado en el anciano (dermis atrófica) y en el niño antes del año de edad. Tiene valor como encuesta epidemiológica. No debe ser usado para control evolutivo de la enfermedad (21, 22).

7. Diagnóstico de infección congénita

La infección fetal debe buscarse siempre que se documente infección aguda materna en el curso del embarazo o bien haya indicios de que la madre estuvo en exposición con el vector más común, el gato. Los métodos convencionales exigen obtener una muestra de sangre fetal por punción del cordón (después de la semana 20 de gestación) o una muestra de sangre durante los primeros 40 días de nacido para demostrar presencia de IgM e IgA específicas. La presencia de IgM antitoxoplásmicas en el recién nacido es el signo más específico de la infección congénita porque el mismo neonato produce estos anticuerpos (no cruzan la barrera placentaria), esto puede ocurrir entre 4 y 16 semanas de embarazo, por lo que se debe considerar a la placenta infectada como una fuente potencial de infección al feto durante todo el embarazo (25).

En el neonato, entre 8 a 10 días después del nacimiento los anticuerpos IgM alcanzan su máxima concentración, pudiendo mantenerse así hasta 15 días, luego inicia su disminución progresiva. A los 45 días se encuentran en la mitad de su nivel y a los 60 días es muy escasa y se pueden encontrar vestigios a los 3 meses, por lo que en presunción de procesos congénitos solo después de ese tiempo tiene valor diagnóstico (Anexo 1, Figura 3) (25).

La ecografía demuestra si existen embriofetopatías o placentomegalia, requiriéndose un control mensual cuando se comprueba infección materna aguda. Después del parto, la placenta de toda mujer que haya recibido tratamiento para toxoplasmosis debe ser evaluada por medio de estudios microbiológicos y patológicos (7,24).

8. Tratamiento

La quimioterapia está dirigida a controlar la enfermedad (supresión de los síntomas), pero no logra eliminarla, quedando parásitos latentes en los quistes hísticos. El tratamiento precoz de la

embarazada con infección aguda reduce la transmisión transplacentaria en un 50-60% y disminuye la morbilidad fetal (3,4).

a) Tratamiento de embarazada con infección aguda:

Espiromicina, 3 g diarios divididos en 4 dosis por 4 semanas. Alternativa: Pirimetamina (1 mg/kg/día; máximo 25 mg/día, oral, en dos dosis diarias por 4 semanas) + sulfadiazina (120 mg/kg/día; máximo 4 g/día, oral, en cuatro dosis al día, por 4 semanas) + ácido fólico (5 mg/día, oral, una dosis, por 4 semanas). La Pirimetamina está contraindicada en las primeras 16 semanas de embarazo. Controlar hemograma cada 15 días (23).

b) Tratamiento de infección congénita en recién nacido:

Pirimetamina 1 mg/kg/día por 3 días, seguido de 1 mg/kg cada 2 días + sulfadiazina 100 mg/kg/día en dos dosis + ácido fólico 5 mg. oral, dos veces por semana. La duración del tratamiento debe decidirse en cada caso (consultar especialistas). Generalmente es de 6 meses a 1 año. Este régimen se puede administrar por 21 días, alternado con 4 semanas de espiromicina 100 mg/kg/día en tres dosis. Se recomienda el uso de corticoides sólo en casos de coriorretinitis progresiva que afecte la mácula (prednisona 1,5 mg/kg/día) (3,23).

C. Tamizaje neonatal

Uno de cada mil recién nacidos aparentemente normales, tienen en forma latente una enfermedad de consecuencias graves e irreversibles (como el hipotiroidismo, la fenilcetonuria, y un sinnúmero de enfermedades infecciosas) que no se manifiestan en el nacimiento, sino más tardíamente y que son causa de retraso mental, ceguera u otros trastornos graves, estas normalmente se ponen de manifiesto semanas o meses después del nacimiento (25,26).

El tamizaje neonatal se define como el procedimiento que se realiza para detectar en aquellos recién nacidos aparentemente sanos, patologías que con el tiempo puede producir daños graves e irreversibles o muerte prematura, con la finalidad de poder tratarla oportunamente, evitando o aminorando sus consecuencias (28,29).

Los criterios para que una patología sea considerada a ser evaluada en el tamizaje neonatal son:

- La enfermedad deber ser un importante problema a la salud cuya historia natural, incluyendo su desarrollo de latente a enfermedad declarada, sea suficientemente comprendido.
- Debe existir una prueba de laboratorio disponible exacta y sensible para su diagnóstico.
- Debe existir tratamiento para la administración a personas diagnosticadas con la enfermedad.
- El costo de un caso encontrado (incluyendo su diagnóstico y tratamiento) debe ser económicamente equilibrado en relación al gasto de una atención médica completa (28).

Si bien la utilidad del tamiz neonatal en un principio era solamente para el diagnóstico de la fenilcetonuria, (conocido como tamiz neonatal básico), y que ha sido muy efectivo para prevenir retardo mental en pacientes con fenilcetonuria, en la actualidad se han logrado adaptar nuevas técnicas analíticas al estudio de las gotas de sangre neonatal recolectadas en papel filtro, lo cual ha hecho posible la determinación de una amplia gama de moléculas y la detección oportuna de más de cien patologías (29).

Con dichos estudios se han extendido los beneficios a los recién nacidos bajo la denominación de “Tamiz neonatal ampliado”. Estos estudios hacen posible el diagnóstico precoz de otras manifestaciones graves tales como: crisis agudas en las primeras semanas o meses de vida (variedad “perdedor de sal” de la hiperplasia suprarrenal congénita), cuadros sépticos o síndrome de Reye (enfermedad de orina de jarabe de arce o “maple”), trastornos del ciclo de la urea (cadenas propiónica, metilmalónica, isovalérica) y una variedad de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos como lo son bacterias, parásitos y virus (17,29).

Los programas de tamizaje neonatal constituyen una prioridad dentro de la atención en problemas de salud pública en varios países, ya que, desde hace más de cuatro décadas, el tamizaje ha demostrado ser un procedimiento eficaz en un gran número de países desarrollados (29).

1. Situación actual de tamizaje neonatal para la toxoplasmosis congénita

En países desarrollados como Francia y Austria, de acuerdo con lo que expresa la ley, el tamizaje serológico es obligatorio, y entre ellas las pruebas a realizar se encuentra la detección de *T. gondii* en neonatos, utilizando desde métodos inmunoenzimáticos, hasta pruebas moleculares.

La disposición de los gobiernos en invertir en la detección temprana de estas enfermedades permite que puedan ser establecidos programas de tamizaje al alcance de su población en general (30).

Guatemala no cuenta en la actualidad con ningún programa para la detección de la toxoplasmosis en neonatos, esto aun cuando entrevistas realizada en el laboratorio de Serología del Hospital Roosevelt muestra que son tantos los casos que resultan positivos a toxoplasmosis, en su mayoría positivos a IgG, que al acumularse, por no ser tabulados, los archivos literalmente son tirados a la basura lo que representa una importante pérdida de información que solo contribuye a mantener las pocas o nulas líneas de control que puedan haber en el país (8).

Si se cuenta que no hay programas de salud pública destinados a encontrar casos y ofrecer tratamiento durante el embarazo, un alto porcentaje de madres podrían transmitir la infección a sus niños (8).

En Guatemala, en el 2003 se realizó una capacitación al personal de salud que trabaja en la mayoría de áreas de salud pública (exceptuando Alta Verapaz y Retalhuleu); y en los hospitales San Juan de Dios y Roosevelt, para la toma y manejo de muestras de recién nacidos que se le incluyeron dentro del tamiz para hipotiroidismo congénito con una cobertura a nivel nacional de un 7%, el cual podría ser aprovechado para la detección temprana de la toxoplasmosis congénita por medio del tamizaje en muestras recolectadas en papel filtro para un diagnóstico rápido (29).

D. Adaptación de métodos inmunoenzimáticos para detección de anticuerpos en muestras de papel filtro.

Desde la introducción de la técnica de ELISA se ha evaluado la opción de utilizar muestras de sangre seca en papel filtro como un método fácil y de bajo costo para obtener y transportar muestras de sangre entera y a partir de ello detectar anticuerpos para el diagnóstico serológico en enfermedades infecciosas provocadas por parásitos, virus, bacterias y enfermedades metabólicas (31,32).

Sin embargo para poder adaptar una metodología que utiliza como matriz sangre entera recolectada en papel filtro a una ya establecida en la cual se utiliza suero es necesaria la evaluación previa de esta adaptación. Lo cual permite documentar las ventajas y desventajas de del uso de esta adaptación, buscando un alto grado de seguridad que un proceso específico originará, de forma homogénea y reproducible, para que cumpla con las especificaciones

predeterminadas y sus atributos de calidad. Los procesos en un laboratorio son complejos y tienen muchas posibilidades de sufrir variaciones que pueden afectar al producto final (31,32).

Para lograr una adaptación de éxito y asegurar el correcto funcionamiento de esta es necesario:

- Garantizar la viabilidad del método antes de realizar un costoso ensayo colectivo formal.
- Obtener pruebas de la fiabilidad de los métodos analíticos si no se dispone de datos de un ensayo colectivo o si no es posible realizar un ensayo colectivo formal.
- Garantizar que se utilizan correctamente los métodos validados estándares (31).

Así mismo es importante determinar los factores intraanálisis que producen variaciones y alteraciones en los resultados, efectos que se producen durante el uso normal del método. (32,33).

En la evaluación de un método cualquiera, el investigador debe decidir qué parámetros de rendimiento del método debe caracterizar, teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y costos, además de los requerimientos a quien será dirigido, la experiencia con el método y si el método será de aplicación rutinaria o no (31,32).

E. Evaluación de métodos analíticos cualitativos

Cualquier diseño de método analítico debe de ser previamente evaluado, en el caso de los métodos cualitativos, en donde la respuesta es de tipo binaria (Sí/No), se obtiene de forma directa, sin ningún tratamiento de los datos. Estos sistemas se denominan habitualmente sistemas de tamizaje o de cribado. Desde el punto de vista práctico, el principal interés en el desarrollo de estos sistemas radica en que se utilizan como una etapa previa del tamizaje de muestras, de manera que se evita así que todas las muestras sean sometidas a todo el proceso de medida de algún analito de interés. El objetivo final es poder asegurar la veracidad de datos por medio de una fase de experimentación previa (33,34).

La evaluación de métodos cualitativos pueden ser modificaciones de métodos analíticos previamente validados, estos puede extenderse de tan poco como una determinación de la exactitud y de la precisión del intra-análisis a una validación casi completa que incluye la evaluación de modificaciones de los métodos con respecto a analitos, temperaturas, compuestos para detección distintos a los establecidos previamente y cambios en los instrumentos de medición. Los métodos cualitativos deben de ser validados para su uso en los laboratorios de

rutina. Esta validación comienza con la identificación de las necesidades de la selección del método de tamizaje o cribado que satisfacen los requerimientos informativos. Para estos métodos cualitativos, el factor clave para la validación es el valor umbral o *cut off* establecido como referencia. El método debe de ser lo suficientemente sensible y selectivo con respecto al valor umbral y a la naturaleza de las muestras, respectivamente, ya que su finalidad radica en discriminar muestras positivas o negativas a la presencia del analito. (32,33).

F. Variables en la evaluación del método inmunoenzimático para tamizaje neonatal.

1. Papel filtro.

En los últimos años se ha empleado papeles filtros diseñados para la recolección de muestras de sangre que puedan ser estables durante un tiempo prolongado sin que la característica de los analitos de interés sean afectados. El empleo de muestras de sangre seca sobre papel filtro, ofrece varias ventajas entre ellas está que no hace falta un adiestramiento especial para la toma de muestras, la cual se hace por punción del talón, del lóbulo de la oreja, o de cordón umbilical, no hay que centrifugar ni refrigerar las muestras, el transporte se facilita al no haber peligro de derrame del material biológico recolectado. Las muestras pueden enviarse por correo, la infectividad disminuye en las preparaciones de sangre seca en papel filtro respecto a las muestras líquidas y los riesgos de adquirir accidentalmente algún agente infeccioso presente en las muestras por ruptura de la cristalería son eliminados. Además, se facilita la conservación de muestras testigos por largos períodos, aún si se dispone de escasa capacidad de refrigeración. Estas ventajas son de gran importancia en aquellos países donde los recursos son limitados para realizar estudios epidemiológicos (34).

Desde la introducción de la técnica de ELISA se ha evaluado la opción de utilizar el papel filtro, como un método fácil y de bajo costo para obtener y transportar muestras de sangre entera y a partir de ello detectar anticuerpos para el diagnóstico serológico. García y col. en Perú, evaluaron con éxito su uso para detectar anticuerpos IgM contra el virus de dengue, comparándola por dos metodologías (Estándar ELISA y adaptación en papel filtro), en donde se obtuvo una concordancia por índice Kappa de 0,97, sensibilidad y especificidad de 96,0% y 98,0% respectivamente (35,36).

Las consideraciones de los análisis de manchas de sangre en papel filtro debe ser: tipo de papel filtro utilizado, estabilidad de los calibradores, tamaño de las manchas de sangre,

condiciones de almacenamiento y secado de la muestra. Los factores externos (tiempo que transcurre desde su obtención hasta el análisis en el laboratorio, temperatura y almacenamiento de la muestra) pueden alterar la actividad y el resultado de los analitos en los diferentes ensayos. Así mismo, una última consideración pero no menos importante, es que sus características funcionales estén dentro de los límites de aceptación para los ensayos destinados a la cuantificación de determinadas sustancias en fluidos biológicos colectados en papel de filtro (26,36).

Actualmente en el mercado se cuenta con una gran variedad de papeles filtros para su uso en el laboratorio clínico, entre estos se encuentra la marca Schleicher & Schuell™ que a demostrado ser superior con respecto a otras marcas. Fromenta y colaboradores en un estudio realizado en el Laboratorio de Tamizaje Neonatal en Cuba, evaluó tres distintos papeles de filtro para el tamizaje de hipotiroidismos congénito y fenilcetonuria por la técnica UMELISA, los resultados obtenidos demostraron que el porcentaje de pérdida de actividad de los analitos estudiados fue inferior al 17% y que los valores promedios de concentración en la distribución de tirotopina y fenilalanina son mayores en las muestras colectadas en papel Schleicher & Schuell™ 903 (35,36,37).

Como resultado de una encuesta a la comunidad internacional que se dedica al tamizaje neonatal y con el objetivo de mejorar la exactitud de los ensayos analíticos, de homogeneizar los controles y materiales de referencia, la compañía Schleicher & Schuell™ tomó la decisión de comercializar solamente el papel filtro S&S 903. Algunas de sus características es ser elaborado con algodón 100% puro libre de aditivos lo que garantiza que cada lote de papel posea un tiempo de vida de 12 meses y está diseñado para la absorción de 1.37-1.71 µl de sangre en un círculo de diámetro de 1/8 de pulgada y es fabricado de acuerdo al sistema de regulación de calidad de la Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en ingles). Este papel filtro actualmente es producido por la empresa Whatman™ que adquirió la empresa Schleicher & Schuell™, cambiando el nombre comercial del papel filtro a Whatman™ “Schleicher & Schuell “ 903 (37,38).

2. Agentes amortiguadores y agentes bloqueadores.

a) Agentes amortiguadores

Prácticamente en todos los procesos biológicos, al igual que en muchos procesos químicos, es indispensable un rango de pH determinado. Ejemplo de ello es el flujo sanguíneo durante el transporte de oxígeno de los pulmones y de nutrientes a los distintos órganos, donde se conserva un pH muy próximo a 7,4 (pH fisiológico), permitiéndose variaciones entre 7,35 y 7,45 (39).

En la conservación del pH de las muestras de sangre total o líquidos fisiológicos desempeña un papel fundamental la solución amortiguadora, la cual hace resistencia a la variación de la concentración de iones hidrógeno cuando se añade álcali o ácido, estando constituida casi invariablemente por una mezcla de un ácido débil, o una base débil, y su sal conjugada. Estas soluciones pueden clasificarse como generales, todos los amortiguadores comúnmente utilizados durante los últimos 75 años; amortiguadores universales, que presentan una baja capacidad amortiguación, pero un amplio rango de pH, y amortiguadores biológicos que presentan un moderado rango de pH, pero que contienen sustancias estables que no provocan reacciones secundarias con el medio (40,41).

En ensayos clínicos uno de los agentes amortiguadores más utilizados es el amortiguador fosfato salino (PBS), éste muestra mejores características como lo son: menor coeficiente de variación del pH con la temperatura, y menor efecto hemolítico de células rojas, con lo cual se logra disminuir las posibles interferencias provocada por la destrucción de eritrocitos (40).

b) Agentes bloqueadores

Es conocida la necesidad de emplear soluciones bloqueadoras de espacios libres en las fases sólidas durante el desarrollo de inmunoensayos y en particular su empleo obligado en las validaciones de nuevas metodologías, estas soluciones contribuirían a minimizar las interacciones inespecíficas. El principio se basa en la correcta separación de proteínas (anticuerpos o enzimas) que se encuentran en la sangre recolectada en el papel filtro, donde se encuentran accesibles para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación. Las proteínas quedan unidas a estas membranas de forma no covalente, mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. De esta forma se determina una proteína específica simultáneamente por su antigenicidad y su masa molecular (40-42).

En el análisis de muestras de sangre en papel filtro se realiza normalmente por un ensayo inmunoenzimático indirecto (que son los mas accesible por su costo), en el cual primero se bloquea la membrana sumergiéndola en un amortiguador de bloqueo, esta etapa es común en todo procedimiento de inmunodetección y consiste en prevenir la unión no específica del sistema de detección del papel, para obtener resultados significativos los anticuerpos deben unirse sólo a la proteína de interés y no a la membrana del papel. La unión no específica de anticuerpos puede ser reducida al bloquear los sitios no ocupados del papel filtro con proteínas inertes como lo son la seroalbúmina bovina, suero fetal de ternera o de otra especie, caseína o leche descremada (40,42).

Un agente bloqueador ideal debe tener las siguientes características:

- i) Inhibir a las proteínas no específicas (ya sea por enlaces covalentes o pasivamente) de los componentes a estudiar.
- ii) Inhibir las interacciones no específicas de proteínas.
- iii) Ser selectivo para dejar pasar las proteínas de interés.
- iv) Ser estable frente a biomoléculas para minimizar la desnaturalización causada por la elusión de un compuesto de interés.
- v) Exhibir poca actividad enzimática que pudieran afectar con los métodos de detección de los compuestos de interés (41).

- Tween 20

Uno de los agentes bloqueadores más utilizados son los detergentes (la gran mayoría no iónicos), de los cuales el más utilizado es el Tween 20. Este es considerado un agente bloqueador temporal debido a que su acción puede ser eliminada por simple lavado con agua, sin embargo cuando es utilizado en conjunto con un agente bloqueador de proteínas (leche descremada, seroalbúmina bovina o gelatina), provee un efecto bloqueante, ya que estos detergentes ayudan a la disociación selectiva de proteínas, lo cual permite el paso de anticuerpos que estaban atrapados físicamente en alguna superficie como lo son los poros de papel filtro (40.44).

- Seroalbúmina bovina.

La seroalbúmina bovina es un reactivo complementario de gran utilidad en técnicas inmunohematológicas diversas para potenciar la reacción entre anticuerpos y sus antígenos correspondientes. Ha sido utilizado en muchas técnicas de inmunodiagnóstico, como lo son la inmunofluorescencia y el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), en donde es utilizada como un agente que evita reacciones inespecíficas producidas por otras proteínas que no son de interés al momento de la evaluación, por medio la saturación de sitios evitando así el paso de proteínas inespecíficas (44,45).

3. Tamaño y concentración de proteínas a evaluar.

Las proteínas de gran tamaño no penetran los poros del papel filtro, las cuales quedan atrapadas en el papel que las captura y las retiene, impidiendo su paso, y aumentando así la selectividad de proteínas más pequeñas. La concentración tiene un papel importante en la separación de proteínas, ya que al aumentar esta ocurre un efecto de saturación, en el cual la separación no ocurre de una manera homogénea quedando las proteínas atrapadas entre ellas (44-47).

4. Tiempo y temperatura.

Estas dos variables tienen un efecto directamente proporcional a la adsorción de la evaluación de filtración anticuerpos, en donde el papel de filtro está diseñado para absorber un volumen fijo de sangre un área determinada y elución que permita que los anticuerpos sean extraídos. Sin embargo, cuando se prolonga demasiado el tiempo o se aumenta excesivamente la temperatura, puede disminuir la adsorción por desnaturalización de las proteínas. Hay una relación inversa entre tiempo y temperatura que debe ser controlada estrechamente, incubaciones de 2-4 horas a 37 °C son equivalentes a 16-20 horas a 2-8 °C. Generalmente esta última combinación es satisfactoria, aunque el tiempo y la temperatura óptimos son particulares para cada proteína a evaluar. Guzmán, Bravo y colaboradores realizaron un estudio en el Perú para la determinación de anticuerpos IgM contra el virus dengue, en muestra de papel filtro, utilizando la prueba de ELISA indirecta, en el cual determinaron que la sensibilidad del método es de 82% cuando las muestras de papel filtro son almacenadas a temperatura ambiente y procesada a los 30 días. Así mismo se a observado que cuando se estudian diversas etiologías, algunos autores encontraron que al conservar sueros servidos en papel filtro y en bolsas de polietileno de

sílica a temperatura ambiente o menos durante un año, los niveles de anticuerpos disminuyen sólo en un título (45-48).

5. Concentración de anticuerpos en muestra a evaluar

Un factor que puede afectar los resultados es el título de anticuerpo en las muestras, lo cual está relacionado con la sensibilidad del método. Por lo que es necesario determinar el rango del título de anticuerpos en el cual el método adaptado presente las características de especificidad y sensibilidad adecuadas para la determinación sin que se vean alteraciones derivadas del efecto "hook" el cual está relacionado con los efectos pro zona y post zona de la unión antígeno anticuerpo (43,45).

6. Condiciones de reacción

En la interacción antígeno-anticuerpo participan el pH, la fuerza iónica, la temperatura y los solventes orgánicos que influyen en la estabilidad del complejo. La formación de complejos generalmente se incrementa con la temperatura. Las más usadas son la temperatura de incubación 20-25°C y 37°C. El tiempo de reacción óptimo para muestra y conjugado se determina por la mayor discriminación entre el estándar o el control positivo y el control negativo. Debe tenerse en cuenta que un excesivo tiempo de reacción puede incrementar las uniones inespecíficas, sobre todo en los ensayos indirectos (45-48).

De forma similar se procede para determinar la concentración de trabajo (dilución) de muestras y conjugado. Cuando se requiere usar diferentes diluciones de una muestra, debe demostrarse un adecuado paralelismo y especificidad. En el caso del tamizaje neonatal es indispensable tener presente la dilución que se realiza con el tampón de elución para considerar el volumen de muestra a reaccionar, el cual generalmente, corresponde al inverso de la dilución realizada (48).

III. JUSTIFICACIÓN

Los programas de salud en Guatemala dirigidos al conocimiento y prevención de enfermedades de carácter subclínico son prácticamente inexistentes en la actualidad. Solamente los hospitales Roosevelt y San Juan de Dios tienen un programa de tamizaje neonatal para la detección de desórdenes congénitos metabólicos, así como un programa de tamizaje para detección de Virus de inmunodeficiencia adquirida en embarazadas (27,29).

No existe ningún programa de tamizaje para la detección de enfermedades producidas por parasitemias que pueden infectar el feto por vía vertical. La toxoplasmosis neonatal puede llegar a producir coriorretinitis, hidrocefalia, hepatoesplenomegalia, entre otras patologías, las cuales podrían ser evitadas si se logra un diagnóstico oportuno en el neonato. Lastimosamente, la mayoría de personas expuestas a este y otro gran número de enfermedades infecciosas viven en áreas rurales, en donde solamente un pequeño porcentaje tiene acceso a servicios de maternidad segura (8,29).

Zambrano encontró una prevalencia de 69.9% de anticuerpos IgG contra *T. gondii* en 279 embarazadas en el año 2004 en el Departamento de Maternidad del Hospital Roosevelt, así mismo Sinibaldi y de Ramírez, determinaron la prevalencia en 550 mujeres embarazadas, la cual fue de 55.8% en el año 1992 en la ciudad capital de Guatemala, estos datos dan una visión de la posible exposición al parásito, y como la infección puede ser transmitida al feto (3,13).

Como sistema recolector de muestras de sangre, el papel de filtro ha mostrado superioridad con respecto a otros sistemas, por el pequeño volumen de sangre requerido, fácil transporte, conservación a 4°C o a temperatura ambiente y estabilidad de los analitos, siendo este un método alternativo muy confiable y certero para cualquier ensayo en los sistemas de tamizaje neonatal. Las distintas formas de extraer los anticuerpos específicos en muestras de papel filtro han sido evaluadas utilizando soluciones que funcionan como agentes bloqueadores y extractores, como los son el amortiguador fosfato salino, la seroalbúmina bovina y los diluyentes utilizados para realizar la prueba de ELISA con suero, así como diferentes diámetros de perforación de papel filtro, y los tiempos de elusión para una mejor extracción de anticuerpos capaz de ser detectado por la metodología ELISA, todas estas variables deben de ser evaluadas para poder establecer cuáles son las condiciones óptimas para una adaptación en el diagnóstico de la toxoplasmosis neonatal (36-38,45).

La adaptación de ensayos ELISA a determinaciones de anticuerpos IgM anti- *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre completa recolectada en papel filtro, permitirá que los laboratorios puedan implementar la evaluación de pruebas para tamizaje neonatal.

IV. OBJETIVOS

A. General

Establecer las condiciones técnicas para adaptar un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgM anti - *T. gondii* aplicable a tamizaje neonatal.

B. Específicos

1. Determinar el eluyente que permita una mejor extracción de anticuerpos de la matriz de sangre entera recolectada en papel filtro.
2. Establecer el mejor tiempo de elución de las muestras.
3. Determinar el diámetro de papel filtro a utilizar en el ensayo.

V. HIPÓTESIS

El presente estudio no presenta hipótesis debido a que es un estudio descriptivo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

1. Universo: Variaciones analíticas de los métodos inmunoenzimáticos adaptados a tamizaje neonatal para la detección de anticuerpos IgM anti - *T. gondii*.
2. Muestra: Muestras de papel filtro impregnadas con sangre positivos y negativas para anticuerpos IgM anti - *T. gondii*.

B. Recursos

1. Humanos

- a) Investigador: Br. Manuel Alejandro Díaz Paz.
- b) Asesora: Licda. Karla Lange.

2. Institucionales

- a) Unidad de Inmunodiagnóstico, Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR), Departamento de Citohistología.

3. Físicos

a) Materiales

- Guantes de látex.
- Papel filtro "Schleicher & Schuell 903"
- Pipeta automática de volumen variable 10 - 100 μ l y pipeta automática de volumen variable 200 - 1000 μ l.
- Puntas de pipeta desechables para volúmenes de 10 - 100 μ l y 200 - 1000 μ l..
- Papel mayordomo.
- Algodón.
- Alcohol.
- Marcador indeleble negro.

- Perforador de hojas (agujeros de 3 y 6 milímetros)
- Tijeras.
- Cronómetro.
- Tubos cónicos de 40 mL.
- Agitador magnético.
- Tubos capilares con heparina.
- Sellador de tubos capilares.
- Pipetas de volumetricas (5, 10 y 25 mL)
- Pipetas Pasteur.
- Gradilla.

b) Equipo

- Refrigeradora.
- Rotador.
- Incubadora.
- Potenciómetro.
- Lector de placas de ELISA.
- Centrífuga.
- Microcentrífuga.
- Vortex.
- Balanza analítica.

c) Reactivos

- 3 Kits para la detección cualitativa de IgM anti-*Toxoplasma gondii* en suero o plasma humano por inmunoensayo enzimático (CALBIOTECH INC[®] Toxo IgM)
- Amortiguador fosfato salino con Tween 20 (PBS-T), 10mM a pH 7.2.
- Amortiguador fosfato salino + seroalbúmina bovina 1%
- Solución salina isotónica (0.85%) (Anexo 2).

C. Metodología

1. Elaboración de calibradores internos

Se elaboraron controles de calidad internos de la siguiente manera:

a) Lavado eritrocitos:

- i) Se verificó que la sangre a utilizar posea un resultado negativo para anticuerpos anti- *T. gondii* IgG e IgM, mediante evaluación de las mismas por método ELISA.
- ii) Se mezcló 20 mL. de sangre tipo O Rh+ con 20 mL. de solución salina (1:1) en tubos cónicos.
- iii) Se centrifugó 5 minutos a 5000 revoluciones por minuto y descartó el sobrenadante.
- iv) Se agregó solución salina 2 veces más en la misma proporción, centrifugó 10 minutos y descartó sobrenadante.
- v) Se combinaron todos los eritrocitos lavados en un beacker y se mezclaron con un agitador magnético por 20 minutos, se realizó las determinaciones de hematocrito el cual debía ser $\geq 90\%$.
- vi) Si no se obtenía este porcentaje de hematocrito se recentrifugó por 10 minutos, y se removía la solución salina residual, se mezcló con agitador magnético por 20 minutos y se determinó el hematocrito ($\geq 90\%$).
- vii) Se almacenaron los eritrocitos a 4 °C hasta su uso.

b) Preparación de calibradores internos de sangre completa con hematocrito de 55%

- i) Se mezcló por 30 minutos con agitador magnético la sangre del inciso a.
- ii) Si los eritrocitos habían sido almacenados la noche anterior, se realizaron 6 determinaciones adicionales del hematocrito.
- iii) Se calculó el volumen necesario de suero con anticuerpos IgM anti-*T. gondii* según la siguiente fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ para elaborar 20 mL de controles positivo y negativo, donde C_1 = sangre con hematocrito de 90%, V_1 = volumen de eritrocitos, C_2 = sangre con hematocrito de 55% y V_2 = volumen final (eritrocitos + suero).

- iv) Se adicionó el volumen de suero necesario utilizando según fue el caso sueros negativos para anticuerpos IgM anti-*T. gondii* (control negativo) y suero positivo para anticuerpos IgM anti-*T. gondii* (control positivo y calibrador bajo positivo).
- v) Se colocaron 50 µl de cada calibrador interno (positivo, negativo) sobre papel filtro Whatman Schleicher & Schuell 903[®](S&S 903[®]).
- vi) Se secó a temperatura ambiente por 24 horas en oscuridad.

2. Adaptación del método

Se evaluó un método de ELISA sérico comercial (Calbiotech Inc[®] Toxo IgM) para el tamizaje neonatal de la infección por *T. gondii* utilizando los calibradores internos elaborados anteriormente, de cada calibrador se analizaron las siguientes variables:

- Diámetros de muestra: 3 y 6 mm.
- Tiempos de elución: 18 y 24 horas.
- Amortiguadores de elución: Seroalbúmina bovina 1%, amortiguador fosfato salino 10 mM pH 7.2 + Tween 20 y diluyente del kit ELISA.

a) Evaluación de variables

1. Se perforaron 30 discos de cada calibrador (positivo y negativo) con ambos diámetros 3 y 6 milímetros con los perforadores de papel.
2. Para la evaluación de las variables
 - Se colocó un juego de cinco discos de cada calibrador positivo y negativo para cada diámetro (3 y 6 mm) en pozos individuales en un microplaca de 96 pozos fondo plano y se añadió a cada uno 50µl de amortiguador fosfato salino con Tween 20 (BFS) incubándose un juego de controles para cada tiempo de incubación 18 y 24 horas.
 - Se colocó un juego de cinco discos de cada calibrador positivo y negativo para cada diámetro (3 y 6 mm) en pozos individuales en un microplaca de 96 pozos fondo plano y se añadió a cada uno 50µl de buffer fosfato salino con seroalbúmina bovina 1% (SAB) incubándose un juego de controles para cada tiempo de incubación 18 y 24 horas.

- Se colocó un juego de cinco discos de calibrador positivo y negativo para cada diámetro (3 y 6 mm) en la placa de reacción del kit y añadir a cada uno 125µl del diluyente del kit incubándose un juego de controles para cada tiempo de incubación 18 y 24 horas.

b) Determinación de anticuerpos IgM contra *T.gondi*.

Se determinaron cualitativamente anticuerpos IgM contra *T. gondii* por la técnica inmunoenzimática (Calbiotech Inc[®] Toxo IgM) en los calibradores de la siguiente manera:

i) Evaluación con amortiguador fosfato + Tween 20 (BFS) y seroalbúmina bovina (SAB)

- Se identificó la distribución de los calibradores y controles a evaluar en la placa
- Se sacó la microplaca y las tiras reactivas a utilizar del embalaje protector y permitir que llegaran a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Se distribuyó 100µl de control negativo, control punto de corte, control positivo y las muestras de calibradores, dejar en incubación por 20 minutos.
- Se lavaron los pozos de la placa de reacción con la solución de lavado (previamente preparada para el numero de pozos evaluados), lavar cada pozo con 300µl, tres veces, Secar la placa dándole la vuelta sobre una hoja de papel absorbente.
- Se distribuyó 100 µl de la solución de trabajo de conjugado en cada pozo de reacción, se incubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se removió la solución de trabajo de conjugado, se realizaron 3 lavados con 300µl de solución de lavado diluida. Se secó la placa dándole la vuelta sobre una hoja de papel absorbente.
- Se distribuyó 100µl de la solución de trabajo substrato en cada pozo de reacción, se incubo por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Se añadió 100 µl de solución de parada manteniendo la misma secuencia y el mismo ritmo de distribución.
- Se limpió cuidadosamente la parte inferior de las placas. Se procedió a hacer la lectura de la densidad óptica a 450/620 nm con un lector de placas en los 10 minutos siguientes de haber detenido la reacción.
- Se comprobó la concordancia entre la lectura y el plan de distribución y de identificación de las placas y de las muestras.

ii) Evaluación con diluyente del kit

1. Se identificó la distribución de los calibradores a evaluar en la placa.
2. Se agregaron pozos que sirvieron para colocar los controles positivos, punto de corte y negativo para validar la corrida.
3. Se distribuyó 100µl de control negativo, control punto de corte, control positivo y se dejó en incubación por 20 minutos.
4. Se descartaron los discos de papel filtro que hayan quedado en los pozos de elución con una aguja estéril.
5. Se lavo tres veces los pozos de la placa de reacción con 300µL de la solución de lavado (previamente preparada para el número de pozos evaluados). Se secó la placa dándole la vuelta sobre una hoja de papel absorbente.
6. Se distribuyó 100µl de la solución de trabajo de conjugado en cada pozo de reacción, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Se removió la solución de trabajo de conjugado, se realizaron 3 lavados con 300µl de solución de lavado diluida. Se secó la placa dándole la vuelta sobre una hoja de papel absorbente.
8. Se distribuyó 100µl de la solución de trabajo substrato en cada pozo de reacción, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
9. Se añadió 100µl de solución de parada manteniendo la misma secuencia y el mismo ritmo de distribución.
10. Se limpió cuidadosamente la parte inferior de las placas. Se procedió a hacer la lectura de la densidad óptica a 450/620 nm con un lector de placas en los 10 minutos siguientes de haber detenido la reacción.
11. Se comprobó la concordancia entre la lectura y el plan de distribución y de identificación de las placas y de las muestras.

c) Obtención de Resultados

Se calculó la relación de la densidad óptica de control punto de corte y de la muestra con la siguiente forma:

1. Se calculó el valor de punto de corte del kit: multiplicar la densidad óptica del calibrador de punto de corte por el factor de calibración.
2. Se calculó el índice de anticuerpos de cada determinación dividiendo el valor de la densidad óptica de controles positivos y controles negativos.

La interpretación de resultados se deberá realizar de la siguiente manera:

- i) Límite inferior del valor del punto de corte: indica que no hay primoinfección por *T. gondii* (suero negativo).
- ii) Rango del valor del punto de corte: Será determinado por el promedio de la densidad óptica de 10 sueros controles negativos +/- 2 desviaciones estándar. Se deberá confirmar el resultado repitiendo el ensayo, de ser dudoso el resultado en la repetición citar al neonato a los 15 días de vida para su confirmación.
- iii) Límite superior del valor del punto de corte: indica infección por *T. gondii* (suero positivo o calibrador positivo); cuando el ensayo se aplique a muestras de neonatos deberá confirmarse el resultado repitiendo el ensayo, de ser confirmada la positividad, se cita al neonato y a la madre para confirmar resultados séricos antes de los 15 días de vida.

d) Control de calidad externo de los calibradores

Para control de calidad los calibradores positivos y negativos se participó en el programa de calidad externo para tamizaje neonatal de toxoplasmosis de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) en Estados Unidos de Norteamérica.

D. Diseño estadístico

1. Tipo de estudio

Descriptivo

2. Adaptación del método

Se utilizaron muestras de papel filtro previamente preparadas en laboratorio para que tuvieran las características de muestras neonatales (55% de hematocrito) más suero positivo para anticuerpos IgM anti-*T. gondii*.

a) Primera parte

Se utilizó la metodología ensayo y error para obtener las condiciones óptimas para la adaptación del método, en la cual se realizaron 5 repeticiones de cada variable (tiempo de incubación, diámetro papel filtro y eluyentes). Con esto se estableció cuál de las posibles combinaciones presentaba una mejor consistencia de resultados, esto se evaluó por la cantidad de verdaderos positivos y verdaderos negativos que presentó cada grupo de combinaciones.

b) Segunda parte

Una vez se establecieron las condiciones óptimas se evaluó la mejor combinación realizando 10 repeticiones de ésta, y por medio de la prueba de hipótesis binomial, en el cual se determina el número de éxitos y fracasos, siendo 9 el máximo de éxitos permitidos y 1 el máximo de fracasos permitidos, con un nivel α de 95%.

VII. RESULTADOS

En el presente estudio se establecieron parámetros técnicos para adaptar un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* séricos a muestras de sangre completa recolectada en papel filtro para aplicar tamizaje neonatal. Para establecer los parámetros técnicos se procedió a realizar primero una prueba de ensayo y error en la cual se evaluaron las distintas combinaciones de las variables (diámetro de papel, eluyentes y tiempo de incubación)

La fase experimental consistió en dos etapas; la primera se determinó por ensayo y error la combinación de los parámetros (eluyente, tiempos de elución y diámetro de muestra) para la elución de la muestra y determinar por medio del número de éxitos la combinación que presentó mejores resultados.

En la tabla 1 se aprecia los resultados obtenidos utilizando los tres diluyentes con muestras en papel filtro de 3 mm de diámetro evaluando tiempos de incubación de 18 y 24 horas, los cuales demuestran que ninguna combinación concuerdan con el resultado de referencia del control positivo (n=5) y negativo (n=5).

Por otro lado, los resultados de la evaluación del método con los diluyentes SAB y BFS, en muestras de papel filtro de 6 mm de diámetro y tiempos de incubación de 18 y 24 horas, tampoco mostraron resultados que concuerden con los resultados de los controles positivos (n=5) y negativos (n=5). Sin embargo, al combinar el diluyente del kit con el 6 mm de diámetro y 24 horas de tiempo de elución mostraron resultados con el 100% de acierto con respecto a las muestras del control positivo y control.

Se observó que dos combinaciones; diluyente del kit, diámetro de 6 mm de muestra de papel filtro y los tiempos de incubación de 18 y 24 horas, presentaron los mejores resultados, para ambos casos el número de aciertos fue del 100% ($p=0.001$), tanto para los casos de los controles positivos y negativos. Para poder establecer que tiempo de incubación presenta los valores más cercanos al valor sérico de referencia; se compararon los valores de las muestras séricas en papel filtro.

Tabla 1. Resultados comparativos de las distintas combinaciones según números de aciertos para la adaptación del método con muestras de papel filtro

Diámetro	Eluyente	Resultados adaptación 18 horas		Resultados adaptación 24 horas	
		Positivo _{n=5}	Negativo _{n=5}	Positivo _{n=5}	Negativo _{n=5}
3 mm	AFS	0	10	0	10
	SAB	0	10	0	10
	Kit	2	8	3	7
6 mm	AFS	0	10	0	10
	SAB	2	8	0	10
	Kit	5	5	5	5

Fuente: Datos experimentales obtenidos en laboratorio
AFS: amortiguador fosfato salino 10 mM pH 7.2 + Tween 20, SAB: seroalbúmina bovina 1%, Kit: Diluyente del kit.

En la tabla 2 se muestra la comparación entre los tiempos de elución y su relación entre los controles positivos y negativos, en el cual se obtuvo mejores índices al eluir a 24 horas.

Tabla 2. Relación de índice de anticuerpos con respecto al tiempo de elución y valor de referencia con muestras positivas para anticuerpos anti-*T. gondii*

Numero de repetición	Índice de anticuerpos		Valor de referencia
	18 horas	24 horas	
1	2.28	3.02	3.27
2	2.21	2.96	3.13
3	3.08	1.76	1.46
4	3.53	2.01	1.76
5	6.32	3.60	3.26

Fuente: Datos experimentales obtenidos en laboratorio

En base a estos resultados se aplica la prueba de hipótesis binomial, en la tabla 3 se puede observar los resultados en los cual se parte con 10 muestras de papel filtro positivas y 10 muestras de papel filtro negativas, para la evaluación en condiciones ideales establecidas; encontrándose que, la técnica en evaluación obtuvo 9 verdaderos positivos y 1 falso negativo, así como 10 verdaderos negativos y ningún falso positivo. En base a esto se determinó la concordancia del método a adaptar por medio del índice *kappa*, obteniéndose un valor de 0.9 que indica una relación óptima.

Para evidenciar si el método es estadísticamente significativo se evaluó el valor p de cada control. En el caso de las muestras positivas el valor p fue de 0.0107 y para las muestras negativas el valor p fue de 0.0010, para ambos caso el valor p fue menor de 0.05 lo cual establece que en ambos valores son estadísticamente significativos.

Tabla 3. Índice kappa y valor P de la adaptación comparándola con los valores de referencia de anticuerpos con respecto al tiempo de elución y valor de referencia

Valores adaptación	Séricos			Valor p	kappa
	Positivos	Negativos	Total		
Positivos	9	1	10	0.0107	0.9
Negativos	0	10	10	0.0010	
Total	11	9	20		

Concordancia (Índice *kappa*): 0.9 = optimo
 Fuerza de concordancia: <20: pobre; 0.21-40: Debil; 0.41-0.60: Moderada; 0.61-0.80: Buena; 0.81-1.00: Optima

Además se evaluó la concordancia de los resultados obtenidos de la mejor combinación con los valores séricos, esto se realizó por medio del índice kappa para evidenciar en qué nivel de concordancia se encontraba la adaptación tomando de valor de referencia los valores séricos, obteniéndose un índice kappa de 0.9, que cae dentro de la escala optima de concordancia de kappa (45).

Posteriormente para determinar el punto de corte de la adaptación del método se utilizó el promedio del valor de 10 repeticiones de muestras negativas +/- 2 desviaciones estándar. Siendo el promedio de 0.738, el límite superior de 0.963 y el límite inferior de 0.698

Por último y como parte de una evaluación externa, el método adaptado se evaluó con muestras provenientes del programa de control de calidad externo para tamizaje neonatal de toxoplasmosis congénita de los CDC, las cuales fueron evaluadas como muestras desconocidas. Las 10 muestras, 3 de ellas con un resultado positivo para anticuerpos IgM contra *T.gondi* y 7 con resultado negativo, dieron el mismo resultado cualitativo al momento de la evaluar la adaptación del método.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los programas de tamiz neonatal detectan la existencia de una enfermedad o deficiencia congénita antes de que ésta se manifieste, para instalar o iniciar el tratamiento adecuado que evite o disminuya sus consecuencias. Es importante resaltar que el tamizaje no es un procedimiento diagnóstico, ya que los sujetos deben someterse a una prueba diagnóstica confirmatoria (27)

En el presente estudio se evaluó la capacidad de detección de anticuerpos IgM anti- *T. gondii* recolectada en papel filtro S&S 903® con diferentes diámetros, con distintos agentes de elución, a diferentes tiempos de incubación para esta elución.

La utilización de las distintas soluciones como eluyentes, permitieron la extracción de los anticuerpos anti- *T. gondii* IgM. El amortiguador fosfato salino y la seroalbúmina no presentaron buena respuesta de extracción de anticuerpos, en ninguno de los dos casos de diámetro de papel filtro ni en los dos distintos tiempos de incubación. En ambos casos, todos los calibradores positivos dieron un índice de anticuerpos debajo del punto de corte, en comparación con los valores obtenidos en suero.

El bajo índice de anticuerpos obtenidos en muestras eluidas con el amortiguador fosfato salino y la seroalbúmina bovina fue posiblemente debido a que si bien estos agentes de elución actúan como bloqueadores de proteínas, no son específicos para permitir el paso de las inmunoglobulinas IgM sobre otras proteínas encontradas en la muestra de sangre seca en papel filtro. Un agente amortiguador que en este caso también tenía un objeto de bloqueador se uniría a todos los sitios posibles de interacción no específica, sin embargo los resultados obtenidos demostraron que debido a su poca especificidad no fue posible la extracción adecuada de los anticuerpos para obtener un índice de anticuerpos que dieran respuesta adecuada en los calibradores positivos (40, 43).

El tercer eluyente utilizado, el diluyente suministrado en el kit, obtuvo los mejores resultados, tanto cualitativamente (todos los calibradores tuvieron concordancia con los valores obtenidos en suero) como cuantitativamente (los valores de índice de anticuerpos fueron muy similares al compararse con los obtenidos en suero). La capacidad del diluyente del kit demuestra que no solo es capaz de ser selectivo para las inmunoglobulinas IgM en suero, sino que también en muestra de sangre en papel filtro, con la variación de un tiempo de incubación de 24 horas.

La elección adecuada de un agente bloqueador de interferentes en este tipo de muestras está determinada por las propiedades del anticuerpo y del tipo de muestra utilizada. Por ejemplo, en aplicaciones en las que se utiliza la fosfatasa alcalina como conjugado (43).

Los tiempos de incubación evaluados (18 y 24 horas) demostraron que el diluyente del kit presentó una mayor similitud de resultados en papel filtro con los valores en suero, en ambos casos las muestras positivas séricas dieron también un resultado positivo en la adaptación del método, sin embargo con incubación de 24 horas los resultados fueron más cercanos a los valores séricos por lo cual se pueden obtener índices de concordancia. La diferencia de índice de anticuerpos entre los dos tiempos de incubación se puede deber a que se requiere un tiempo mayor de elución para lograr que los anticuerpos queden unidos a los antígenos que se encuentran en los pozos de la placa.

Al momento de la evaluación del método con la mejor condición, es importante mencionar que si bien, de las 10 muestras positivas evaluadas, 9 dieron un resultado positivo, este único fracaso para poder detectar la cantidad de anticuerpos se atribuye a un error técnico, ya que ni en la evaluación de condiciones, ni en la posterior evaluación con controles externos de los CDC, mostró nuevamente un error de lectura.

Si bien todas las muestras y variables de este estudio fueron condicionadas en laboratorio, se evaluó posteriormente muestras externas provenientes del programa de control de calidad para tamizaje neonatal de toxoplasmosis de los CDC con dicha adaptación, esto para reafirmar los resultados obtenidos en la evaluación. Las muestras del CDC dieron los resultados esperados, esto se realizó con la mejor combinación de variables (24 horas de incubación, 6 mm de muestra y diluyente del kit), lo cual demuestra que la adaptación presenta resultados satisfactorios para la detección de anticuerpos IgM anti- *T. gondii*.

Al ser una adaptación para tamizaje neonatal, es importante determinar valores de punto de corte, si bien no son iguales a los suministrados por el kit, el rango obtenido en la adaptación evita que al momento de evaluar muestras, pudieran haber falsos positivos, ya que el rango determinado (0.698-0.738) es menor que el suministrado por el kit (0.9). Es de importancia resaltar que al momento de aplicar esta metodología en un estudio piloto, estos deben de adaptar el punto de corte, ya que esto permite una mejor distribución de datos negativos y así poder obtener un rango más preciso de corte.

Para la utilización de esta metodología en programa de tamizaje, es de importancia hacer un estudio piloto previo, en un área con alta prevalencia de toxoplasmosis neonatal, así como acondicionarla a otro tipo de enfermedades subclínicas, para poder brindar un panel más extenso de diagnóstico para confirmar los casos serológicos en neonatos (27).

IX. CONCLUSIONES

1. Se estableció que el eluyente que presentó los resultados estadísticamente significativos ($p=0.001$) fue el diluyente suministrado en el kit (directo).
2. Se estableció que el diámetro de muestra de 6 mm y el eluyente suministrado en el kit mostró los resultados estadísticamente significativos ($p=0.001$) en la adaptación del método.
3. La adaptación de la metodología evidencia una concordancia óptima con los resultados obtenidos en muestras séricas.

X. RECOMENDACIONES

1. Promover el estudio piloto para la evaluación de esta metodología, para que pueda ser utilizada en áreas endémicas.
2. Adaptar esta metodología para el diagnóstico inmunoenzimático de otras enfermedades subclínicas, para brindar un panel de diagnóstico de patologías.

XI. REFERENCIAS

1. Murray P. Microbiología Médica. 5ed. España: Editorial Elsevier, 2006. 927p.
2. Behrman N *et al.* Tratado de pediatría. 17ed. España: Editorial Elsevier, 2004. 2618p.
3. McCabe R, Chirugi V. Issues in toxoplasmosis, Infect Dis N A. 1993; 7 587p.
4. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4ed. Colombia: Editorial Corporación para Investigación Biológicas, 2006. 506p.
5. Koneman E *et al.* Diagnostico Microbiológico, Texto y atlas color. 5ed. Argentina: Editorial Medica Panamericana. 1999. 1431p.
6. Dubey JP. Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Br Med J 2000; 321: 127-8
7. Hirt J, Durlach R. Infecciones en Obstetricia y Ginecología. Toxoplasmosis y Embarazo. 1era ed. Buenos Aires: El Ateneo. 1998;3: 22-32
8. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Salud Pública, Toxoplasmosis. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 2001. 36p.
9. Andréu L, Toxoplasmosis: diagnóstico serológico en las gestantes. Servicio de Microbiología. Hospital Germans Trias i Pujol. Barcelona. Bol Control de Calidad SEIMC. 1998;6;3,12.
10. Wilson J *et al.* Principios de Medicina interna. 16ed. México: Editorial Internacional McGraw-Hill. 2002; 8,3: 369,644-649.
11. Purner M *et al.* CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans. Infect Immunol. 1996; 64:4330-4338.
12. Couvreur J, Desmonts G, *et al.* A homogeneous series of 210 cases of congenital toxoplasmosis in 0-10 month old infants detected prospectively. Ann Pediat. 1984; 31: 855p.
13. Sinibaldi J, de Ramirez I. Incidence of congenital toxoplasmosis in live Guatemalan newborns. Eur J Epidemiol. 1992; 8: 516-520p.
14. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Prevalencia de Infección por *Toxoplasma gondii* Estados Unidos: OMS. 1979; 86: 5p.
15. Allain J, Palmer C, Pearson G. Epidemiological study of latent and recent infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women from a regional population in the U.K. J Infect. 1998; 36: 189-96.

16. Małgorzata P, Petersen E, Szczapa J. Prevalence of Congenital *Toxoplasma gondii* Infection among Newborns from the Poznań Region of Poland: Validation of a New Combined Enzyme Immunoassay for *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin A and Immunoglobulin M Antibodies. *J Clin Microb.* 2001; 39: 1912-1916.
17. Mozzatto L *et al.* Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003; 45: 147-51.
18. Cáceres A *et al.* Estudio sobre la coriorretinitis toxoplasmósica en Guatemala. *Rev Latin Microbiol.* 1979; 27:208-220.
19. Jones J *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in rural Guatemalan children. *J Trop Med Hyg.* 2005; 72:295-300.
20. Zambrano J. Prevalencia de Toxoplasmosis en mujeres embarazadas que asisten a la maternidad del hospital Roosevelt, Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), Marzo 2006. 33,34,37p.
21. Sierra M, *et al.* Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. *Bol Control de Calidad SEIMC.* 1998; 10:31-44.
22. Hernández I, Toxoplasmosis congénita: una mirada al problema. *Rev Biomed.* 2004; 15:181-190.
23. Wilson M *et al.* Clinical immunoparasitology. 6ed. *Manual of Clinical Laboratory Immunology* Washington DC. 2002. 547-558p.
24. Dupon M *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus- seropositive patients. *J Clin Microb.* 1995; 33:2421-2426.
25. Reis M. Diagnóstico de la toxoplasmosis congénita. *Rev Cub Invest Biomed.* 2001; 20:18-21.
26. Therrell B. *Laboratory Methods for Neonatal Screening.* Washington, DC: American Public Health Association. 1993: 191-197.
27. Barba EJ. Tamiz neonatal: Una estrategia en la medicina preventiva. *Rev Mex Patol Clín.* 2004; 51: 130-144.
28. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and Association of Public Health Laboratories. *Newborn Screening Quality Assurance Program.* 2005; 22: 2,5-10
29. Baldellou A, Tamparillas M, Salazar I. Investigación sistemática neonatal de las hiperfenilalaninemias. *Bol Soc Ar Ped (Zar)* 1993; 23 (5): 138-44.
30. González T, Molina JR. Toxoplasmosis congénita. *Rev Cub Obstet Ginecol.* 1997; 23:7-12.

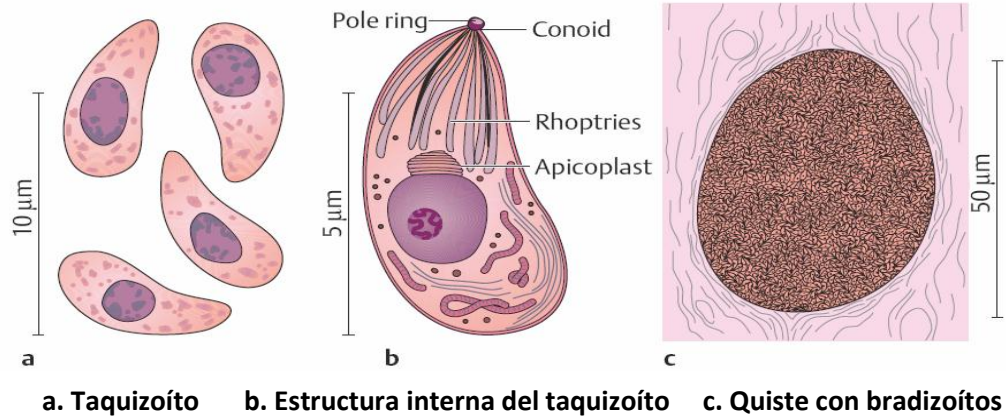
31. Curso de Gestión de Calidad para Laboratorios Módulo 7 Gestión y control de procesos, Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C. 2005. 12-15 p.
32. Guidance for industry bioanalytical, Methods, validation for human studies. Food and Drug Administration. US Department of health and human services. Doc Tec. 2001. 25p.
33. Thompson M, Ellison SL. Harmonized guidelines for single-laboratory validation methods of analysis. IUPAC Technical Report. Pure Appl Chem. 2002;74:835-855
34. Frómata A *et al.* Estudio comparativo de los tres papeles de filtro en los ensayos UMEELISA para el tamizaje neonatal de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. Laboratorio de Tamizaje Neonatal. Rev Biomed Cub. 2002; 13:241-247.
35. García M, Cabezas S, Martos D *et al.* Determinación de Anticuerpos IgM contra Virus dengue partir de sangre absorbida en papel filtro: Un método alternativo y sencillo. Rev. Perú Med Exp Salud Pub. 2000; 17:21-25.
36. Mei J *et al.* Guidelines for the Shipment of Dried Blood Spot Specimens Centers for Disease Control and Prevention Office of Health and Safety. J Nutr. 2001; 131:1631-1636.
37. Whatman. Whatman Neonatal Screening Cards, Capabilities.2008
38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). External Quality Assurance for HIV Rapid Tests Using Dried Blood Spots, 2007.
39. Guyton A C. Tratado de Fisiología Médica. 4ª ed Edición Revolucionaria, 1984. 509-527p.
40. Fernández G *et al.* Caracterización de los buffer fosfatos utilizados en la preparación de solución de hemoglobina (Hb) a pH controlado. Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Rev Cub Quím. 2001; 13:1-10.
41. Valmaceda T, Lázaro A, Ochoa R *et al.* Determinación de las condiciones de ensayo óptimas en un ELISA para la detección de anticuerpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* O11. Instituto Finlay. VacciMonitor. 2004; 13:18-26.
42. Guzmán M, Bravo J *et al.* Normalización de la toma de muestra de sangre en papel filtro para la serología del dengue. Rev Cub Med Trop. 1982; 34: 114-118.
43. Rodríguez L *et al.* Toma de muestra en papel de filtro para la detección de anticuerpos IgM anivirus de la hepatitis A. Rev Cub Med Trop. 1998; 50:42-47.
44. Gibbs J. Effective Blocking Procedures, United States of America, Corning. Doc Tec. 2007; 3:3-6.
45. Pino Y *et al.* Validación de un ensayo ELISA para la determinación de anticuerpos anti LPS de *Vibrio cholerae*. Instituto Finlay. VacciMonitor. 2003; 1:2-4.

46. Ochoa Rolando Felipe, PhD. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Cuba. 2004. 65 p.
47. Estrada E *et al.* Restauración en el Inmunoblotting de proteínas de *Neisseria meningitidis* dañadas por calor y agentes reductores. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. *VacciMonitor*. 2000; 9:19-23.
48. García O *et al.* Comparación de los resultados de la prueba de anticuerpos al VIH por Western Blot en muestras de suero y muestras de sangre seca en papel de filtro. *Infect.*, 2004; .8:310-313.
49. Leon Gordis. *Epidemiología*. 3ra ed. España: Editorial Elsevier, 2003. 543p.

XII. ANEXOS

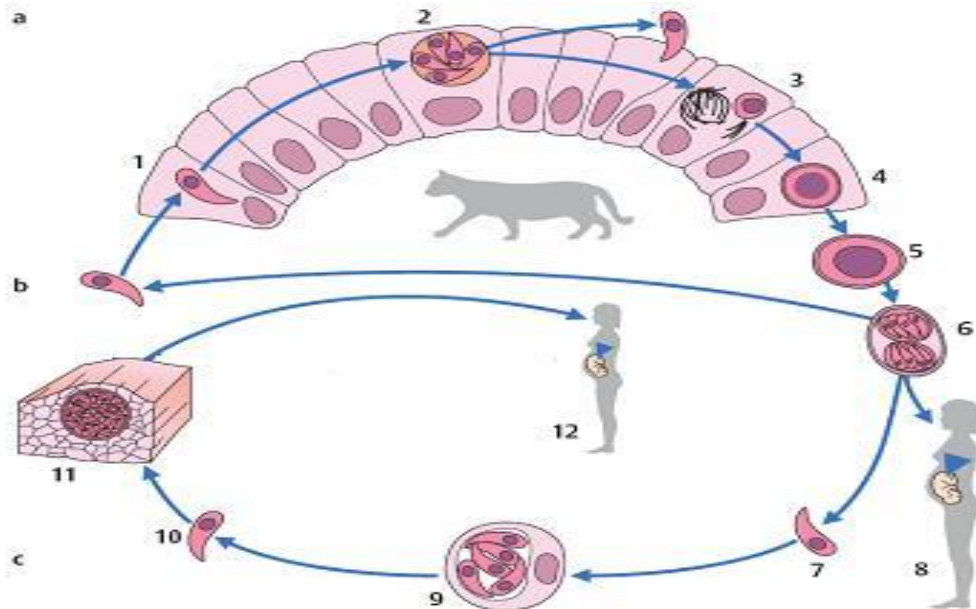
Anexo 1

Figura 1: Morfología de algunos estadios de *T. gondii*



Tomada de: Kayser F. *et al.* Color Atlas of Medical Microbiology. 1. Ed. Editorial Thieme. 2005. 509p.

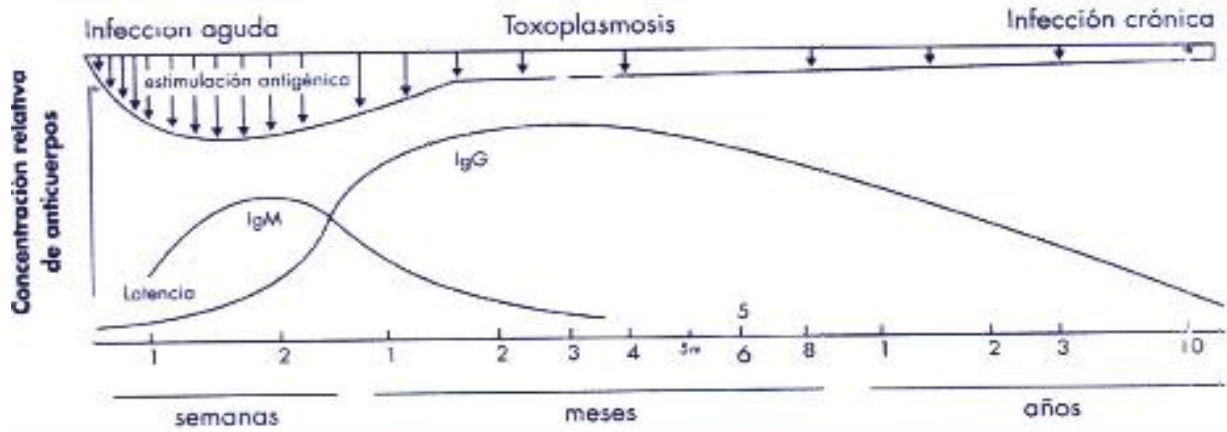
Figura 2: Ciclo de vida de *T. gondii*



a. Desarrollo en el gato: 1. *T.gondii* ingresa a las células epiteliales del intestino delgado; 2. Fase de reproducción asexual. La flecha indica cuando un merozoíto sale de este ciclo e infecta al gato con oocistos; 3. Producción de formas sexuales (gametogonias); 4. Oocisto. **b. Fase exterior de los esporozoítos:** 5. Un oocisto es expulsado en las heces del gato; 6. Esporulan y en su interior forman dos esporozoítos, cada uno de los cuales desarrolla 4 esporozoítos. **c. Desarrollo en el ser humano y la fase de multiplicación asexual:** 7. Ingresan al organismo tras la ingestión de oocistos; 8. Infección congénita; 9. Etapa de formación de vacuola parasitófora (formada por taquizoítos); 10. taquizoíto libre; 11. Quistes con bradizoítos en músculo; 12. Riesgo de infección transplacentaria.

Tomada de: Kayser F. *et al.* Color Atlas of Medical Microbiology. 1. Ed. Editorial Thieme. 2005. 509p.

Figura 3: Concentración de anticuerpos IgM e IgG en una infección por *T. gondii*



Tomada de: Angel G, Angel M. Interpretación Clínica del Laboratorio. 7.Ed. Editorial Medica Panamericana. 2006.515p.

Anexo 2

Preparación de amortiguadores de elución

Amortiguador fosfato salino:Tween (PBS-T)			
Solución A (3L)		Solución B (1.0 L)	
0.1 M Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	80.4 gr.	0.1M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	13.8 gr.
8.5% NaCl	255.0 gr.	8.5% NaCl	85.0 gr.
Agua destilada	3000 ml.	Agua destilada	1000 ml.
Adicionar la solución B a la solución A para dar un pH 7.2.			
Adicionar 5 ml de Tween 20 por cada litro de 10mM PBS, filtrar y almacenar a temperatura ambiente.			
Amortiguador de gelatina			
	0.01 M EDTA		1.86 gr.
	0.05M Buffer fosfato salino		50 ml.
	0.1% NaN ₃		5 ml
	0.1 % Gelatina		0.5 gr.
Aforar a 500 ml con agua destilada.			
Amortiguador de seroalbúmina bovina			
	0.05M Amortiguador fosfato salino		50 ml.
	0.1% NaN ₃		5 ml. al 10%
	0.01%EDTA		0.05 gr.
	0.9% NaCl		4.5 gr.
	1% seroalbúmina bovina		5gr.
	Tween 20		1.25 ml al 10%
Aforar a 500 ml con agua destilada.			
Amortiguador de Leche descremada			
	Amortiguador fosfato salino-0.05% Tween		500 ml.
	Tween 20		1.25 ml.
	Leche descremada		25 gr.
Mezclar por una hora.			

Tomado de: Therrell B. Laboratory Methods for Neonatal Screening. American Public Health Association, Washington, DC: 2005, 193-196p.

Anexo 3

Procedimiento operativo estándar (POE) de la adaptación del ensayo inmunoenzimático para detección de toxoplasmosis neonatal

	<p style="text-align: center;"><u>Detección de anticuerpos IgM anti-Toxoplasma gondii para tamizaje neonatal</u></p>	<p style="text-align: center;">Código PENDIENTE</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Versión 01</p>
<p>I. Propósito: Establecer el procedimiento estándar para la detección de anticuerpos igM anti-Toxoplasma gondii para tamizaje neonatal.</p> <p>II. Alcance: Este procedimiento es aplicable para la utilización de muestras de sangre seca en papel filtro para la detección de anticuerpos igM anti-Toxoplasma gondii para tamizaje neonatal utilizando ensayos inmunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA) que trabajen con muestras serológicas. Esto permite que cualquier laboratorio que cuente con un equipo ELISA pueda montar esta metodología.</p> <p>III. CONTENIDO:</p> <ul style="list-style-type: none">A. GeneralidadesB. Toma de muestraC. Principio del métodoD. InterferentesE. PrecaucionesF. Equipos y materialesG. ProcedimientoH. Procedimiento		

A. Generalidades:

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes “específicos”. Y tienen aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo en saliva y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar.

El tamizaje neonatal se define como el procedimiento que se realiza para detectar en aquellos recién nacidos aparentemente sanos, patologías que con el tiempo puede producir daños graves e irreversibles o muerte prematura, con la finalidad de poder tratarla oportunamente, evitando o aminorando sus consecuencias.

En los últimos años se ha empleado muestras de sangre seca sobre papel filtro, la cual ofrece varias ventajas entre ellas está que no hace falta un adiestramiento especial para la toma de muestras, la cual se hace por punción del talón, del lóbulo de la oreja, o de cordón umbilical, no hay que centrifugar ni refrigerar las muestras, el transporte se facilita al no haber peligro de derrame del material biológico recolectado. Las muestras pueden enviarse por correo, la infectividad disminuye en las preparaciones de sangre seca en papel filtro respecto a las muestras líquidas y los riesgos de adquirir accidentalmente algún agente infeccioso presente en las muestras por ruptura de la cristalería son eliminados

B. Toma de muestra

Desinfección previa del área de punción, que puede ser talón del pie, del lóbulo de la oreja, o de cordón umbilical, en la cual la gota de deposita tarjetas con identificación del paciente, la cual cuenta con una parte de papel filtro Whatman™ “Schleicher & Schuell “ 903.

C. Principio del método:

La técnica de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático. Se basa en la detección antígeno o anticuerpo, inmovilizado sobre una fase sólida y mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima cuyo producto colorido, puede ser medido espectrofotométricamente.

D. Interferentes:

- Muestras que no tengan un diámetro adecuado (menor de 6 mm)
- Inadecuado almacenamiento de las muestras de sangre seca en papel filtro (temperaturas mayores de 35°C)
- Muestras de sangre seca de papel filtro que tengan mas de 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente.

E. Precauciones:

- A. Desinfecte sus áreas de trabajo antes de iniciar el análisis.
- B. Evite inexactitudes en la toma de los reactivos proporcionados en el kit, así como tomar las consideraciones que son indicadas en el inserto del kit.

F. Equipos y Materiales:

1. Materiales:

- Guantes de látex.
- Papel filtro "Schleicher & Schuell 903"
- Pipeta automática de volumen variable 10 - 100 µl y pipeta automática de volumen variable 200 - 1000 µl.
- Puntas de pipeta desechables para volúmenes de 10 - 100 µl y 200 - 1000 µl..
- Papel mayordomo.
- Algodón.
- Alcohol.
- Marcador indeleble negro.
- Perforador de hojas (agujeros de 3 y 6 milímetros)
- Tijeras.
- Cronómetro.
- Tubos cónicos de 40 mL.
- Agitador magnético.
- Tubos capilares con heparina.
- Sellador de tubos capilares.
- Pipetas de volumetricas (5, 10 y 25 mL)

- Pipetas Pasteur.
- Gradilla.

2. Equipos:

- Refrigeradora.
- Rotador.
- Incubadora.
- Potenciómetro.
- Lector de placas de ELISA.
- Centrífuga.
- Microcentrífuga.
- Vortex.
- Balanza analítica.

3. Reactivos:

- Kits para la detección cualitativa de IgM anti-*Toxoplasma gondii* en suero o plasma humano por inmunoensayo enzimático (CALBIOTECH INC[®] Toxo IgM)
- Amortiguador fosfato salino con Tween 20 (PBS-T), 10mM a pH 7.2.
- Amortiguador fosfato salino + seroalbúmina bovina 1%
- Solución salina isotónica (0.85%) (Anexo 2 para preparación).

G. Procedimiento para el análisis:

1. Se perfora un disco de diámetros 6 milímetros con los perforadores de papel filtro.
2. Se deposita el disco de papel filtro un pozo de reacción y se anota la distribución de las muestras a evaluar en la placa.
3. Se agrega 250 µl del diluyente del kit, y se incuba a 24 horas en obscuridad y en lugar seguro para evitar derrames.
4. Pasado 24 horas descartar el diluyente del kit, y con una aguja esteril tomar y descartar el disco de papel filtro.
5. Se agregaran pozos que servirán para colocar los controles positivos, punto de corte y negativo para validar la corrida.
6. Se distribuye 100µl de control negativo, control punto de corte, control positivo y se dejo en incubación por 20 minutos.

7. Se lava tres veces los pozos de la placa de reacción con 300µL de la solución de lavado (previamente preparada para el número de pozos evaluados). Se seco la placa dándole la vuelta sobre una hoja de papel absorbente.
8. Se distribuyen 100µl de la solución de trabajo de conjugado en cada pozo de reacción, se incuba por 20 minutos a temperatura ambiente.
9. Se remueve la solución de trabajo de conjugado, se realizaron 3 lavados con 300µl de solución de lavado diluida. Se seco la placa dándole la vuelta sobre una hoja de papel absorbente.
10. Se distribuye 100µl de la solución de trabajo sustrato en cada pozo de reacción, se incuba por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
11. Se añade 100µl de solución de parada manteniendo la misma secuencia y el mismo ritmo de distribución.
12. Se limpia cuidadosamente la parte inferior de las placas. Se procedió a hacer la lectura de la densidad óptica a 450/620 nm con un lector de placas en los 10 minutos siguientes de haber detenido la reacción.
13. Se comprueba la concordancia entre la lectura y el plan de distribución y de identificación de las placas y de las muestras.

H. Cálculos:

Se calcula la relación de la densidad óptica de control punto de corte y de la muestra con la siguiente forma:

1. Se calculó el valor de punto de corte del kit: multiplicar la densidad óptica del calibrador de punto de corte por el factor de calibración.
2. Se calculó el índice de anticuerpos de cada determinación dividiendo el valor de la densidad óptica de controles positivos y controles negativos.

La interpretación de resultados se deberá realizar de la siguiente manera:

1. Límite inferior del valor del punto de corte: Valores menores de 0.698 indica que no hay primoinfección por *T. gondii* (suero negativo).
2. Rango del valor del punto de corte: Valores que estén en el rango de 0.698-0.738

(valor de punto de corte de adaptación del método) Se deberá confirmar el resultado repitiendo el ensayo, de ser dudoso el resultado en la repetición citar al neonato a los 15 días de vida para su confirmación.

3. Límite superior del valor del punto de corte: Valores mayores de 0.738 indica infección por *T. gondii* (suero positivo o calibrador positivo); cuando el ensayo se aplique a muestras de neonatos deberá confirmarse el resultado repitiendo el ensayo, de ser confirmada la positividad, se cita al neonato y a la madre para confirmar resultados séricos antes de los 15 días de vida.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and Association of Public Health Laboratories. Newborn Screening Quality Assurance Program. 2005; 22: 2,5-10
2. Frómata A *et al.* Estudio comparativo de los tres papeles de filtro en los ensayos UMELISA para el tamizaje neonatal de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. Laboratorio de Tamizaje Neonatal. Rev Biomed Cub. 2002; 13:241-247.

V. ANEXOS:

No aplica

Elaboró	Revisó	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha
Valido desde:		

Adaptación y evaluación de un ensayo inmunoenzimático para detección de toxoplasmosis neonatal

Díaz M¹ y Lange K¹.

¹Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Resumen

La toxoplasmosis es una zoonosis frecuente, que pocas veces produce síntomas, puede transmitirse congénitamente por infección aguda materna en el curso del embarazo. Para evaluar la frecuencia de la toxoplasmosis congénita, la adaptación de ensayos serológicos puede constituir una herramienta importante. En este estudio se establecieron los parámetros técnicos para adaptar un método serico inmunoenzimático (ELISA) comercial a la detección de anticuerpos IgM anti- *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre completa recolectada en papel filtro con características similares a la sangre neonatal (hematocrito de 55%), técnica estándar utilizada en los programas de tamizaje neonatal. Se utilizó la metodología ensayo y error para obtener las condiciones óptimas para la adaptación del método, en la cual se realizaron 5 repeticiones de cada variable (tiempo de incubación, diámetro papel filtro y diluyentes de elución). Se estableció como mejor combinación; diluyente de elución del kit, diámetro de 6 mm de la muestra de papel filtro y 24 horas de elución. En el caso de las muestras positivas el valor p fue de 0.0107 y para las muestras negativas el valor p fue de 0.0010.

1. Introducción

La toxoplasmosis es una zoonosis frecuente, que pocas veces produce síntomas. Cuando una gestante sufre una infección aguda por *Toxoplasma gondii* puede trasmitirla al feto. Si el feto se afecta, la enfermedad puede ser tan grave que ocasione la muerte o graves alteraciones como la ceguera en la vida postnatal (Botero, D y Restrepo, M, 2006).

La presencia de anticuerpos IgM antitoxoplásmicos en el recién nacido es el signo más específico de la infección congénita porque el mismo neonato produce estos anticuerpos (ya que los anticuerpos maternos no cruzan la barrera placentaria), por lo cual los programas de tamizaje neonatal juegan un papel fundamental en la detección temprana de la infección (Botero & Restrepo 2006, p. 506; Dubey,

2000 p.127; Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories, 2005).

Para poder adaptar un método sérico inmunoenzimático (ELISA) a uno que utilice como matriz sangre entera recolectada en papel filtro, es necesaria la evaluación previa de esta adaptación, para comprobar si ésta es capaz de obtener resultados confiables y reproducibles. Por lo cual en este estudio, se establecieron los parámetros técnicos para adaptar un método (ELISA) comercial a la detección de anticuerpos IgM anti *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro, técnica estándar utilizada en los programas de tamizaje neonatal (Food and Drug Administration, 2001; Thompson & Ellison 2002).

2. Materiales y métodos

2.1 Preparación de muestras y controles

Se prepararon muestras de sangre en el laboratorio, que tuvieran las características de muestras neonatales (55% de hematocrito) agregándole suero positivo para anticuerpos IgM anti-*T. gondii*. Para la preparación de los controles, primero se lavaron 20 mL de sangre O Rh+ con 20 mL de solución salina centrifugándolos por 5 minutos a 5000 revoluciones, descartando el sobrenadante, se repitió el procedimiento hasta alcanzar un hematocrito de $\geq 90\%$ y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para preparar los controles internos de sangre completa en papel filtro, se calculó y se mezcló el volumen necesario de suero (positivo para anticuerpos IgM anti-*T. gondii* en el caso de calibrador positivo y suero negativos para calibradores negativos) a los eritrocitos lavados para llegar a un hematocrito de 55%, posteriormente se colocaron 50 µl de cada control sobre papel filtro Schleicher & Schuell 903 ®(S&S 903®) y se secó a temperatura ambiente por 24 horas en oscuridad, posteriormente se perforaron discos de 3mm y de 6mm para el diámetro de los calibradores (Camargo Neto, Rubin, Schulte, & Giugliani, 2004).

2.2 Evaluación de variables

Se evaluó un método ELISA sérico comercial (Calbiotech Inc[®] Toxo IgM) para el tamizaje neonatal de la infección por *T. gondii* utilizando los calibradores elaborados en laboratorio, de cada calibrador se analizaron las variables diámetros de muestra (3 y 6 mm, que equivale a 125 µl y 250 µl de muestra respectivamente), tiempos de elución (18 y 24 horas) y diluyentes de elución (amortiguador fosfato salino con Tween 20 10mM, amortiguador fosfato salino + seroalbúmina bovina 1% y el diluyente

incluido en el kit). Utilizando la metodología de ensayo y error, se realizaron 5 repeticiones de cada posible combinación de variables (tiempo de incubación, diámetro papel filtro, amortiguadores de elución). Se evaluó por medio de la prueba de hipótesis binomial la mejor combinación realizando 10 repeticiones para determinar si los resultados de la adaptación son estadísticamente significativos. Por último y como parte de una evaluación externa, el método adaptado se evaluó con muestras provenientes del programa de control de calidad externo para tamizaje neonatal de toxoplasmosis congénita de los Centros de Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), las cuales fueron evaluadas como muestras desconocidas.

3. Resultados

En el presente estudio se establecieron parámetros técnicos para adaptar un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgM anti-*T. gondii* séricos a muestras de sangre completa recolectada en papel filtro para aplicar tamizaje neonatal.

En la tabla 1 se muestra la evaluación de los diámetros de muestra, tiempos de elución y diluyentes de elución (amortiguador fosfato salino con Tween 20 10mM, amortiguador fosfato salino + seroalbúmina bovina 1% y el diluyente incluido en el kit). Al combinar el diluyente del kit con 6 mm de diámetro y 24 horas de tiempo de elución mostraron resultados con el 100% de acierto con respecto a las muestras del control positivo y control.

Se observó que dos combinaciones; diluyente del kit, diámetro de 6 mm de muestra de papel filtro y los tiempos de incubación de 18 y 24 horas, presentaron los mejores resultados, para ambos casos el número de aciertos fue del 100% ($p=0.001$), tanto para los casos de los controles positivos y negativos. Para poder establecer que tiempo de incubación presenta los valores más cercanos al valor sérico de referencia; se compararon los valores de las muestras séricas en papel filtro.

Para evaluar el tiempo de elución que presentara un valor más cercano al valor de referencia sérico, se determinó su relación entre los controles positivos y negativos, en el cual se obtuvo mejores índices al eluir por 24 horas.

Tabla 1. Resultados comparativos de las distintas combinaciones según números de aciertos para la adaptación del método con muestras de papel filtro

Diámetro	Eluyente	Resultados adaptación 18 horas		Resultados adaptación 24 horas	
		Positivo _{n=5}	Negativo _{n=5}	Positivo _{n=5}	Negativo _{n=5}
3 mm	AFS	0	10	0	10
	SAB	0	10	0	10
	Kit	2	8	3	7
6 mm	AFS	0	10	0	10
	SAB	2	8	0	10
	Kit	5	5	5	5

Fuente: Datos experimentales obtenidos en laboratorio
 AFS: amortiguador fosfato salino 10 mM pH 7.2 + Tween 20, SAB: seroalbúmina bovina 1%, Kit: Diluyente del kit.

Tabla 2. Relación de índice de anticuerpos con respecto al tiempo de elución y valor de referencia con muestras positivas para anticuerpos anti-*T. gondii*

Numero de repetición	Índice de anticuerpos		Valor de referencia
	18 horas	24 horas	
1	2.28	3.02	3.27
2	2.21	2.96	3.13
3	3.08	1.76	1.46
4	3.53	2.01	1.76
5	6.32	3.60	3.26

Fuente: Datos experimentales obtenidos en laboratorio

En base a estos resultados obtenidos se aplicó la prueba de hipótesis binomial, en la tabla 3 se puede observar los resultados en los cual se parte con 10 muestras de papel filtro positivas y 10 muestras de papel filtro negativas, para la evaluación en condiciones ideales establecidas; encontrándose que, la técnica en evaluación obtuvo 9 verdaderos positivos y 1 falso negativo, así como 10 verdaderos negativos y ningún falso positivo. En base a esto se determinó la concordancia del método a adaptar por medio del índice *kappa*, obteniéndose un valor de 0.9 que indica una relación óptima.

Para evidenciar si el método es estadísticamente significativo se evaluó el valor p de cada control. En el caso de las muestras positivas el valor p fue de 0.0107 y para las muestras negativas el valor p fue de 0.0010, para ambos caso el valor p fue menor de 0.05 lo cual establece que en ambos valores son estadísticamente significativos (Gordis, 2003).

Tabla 3. Índice kappa y valor P de la adaptación comparándola con los valores de referencia de anticuerpos con respecto al tiempo de elución y valor de referencia

Valores adaptación	Séricos			Valor p	kappa
	Positivos	Negativos	Total		
Positivos	9	1	10	0.0107	0.9
Negativos	0	10	10	0.0010	
Total	11	9	20		

Concordancia (Índice kappa): 0.9 = optimo
 Fuerza de concordancia: <20: pobre; 0.21-40: Debil; 0.41-0.60: Moderada; 0.61-0.80: Buena; 0.81-1.00: Optima

Posteriormente para determinar el punto de corte de la adaptación del método se utilizó el promedio del valor de 10 repeticiones de muestras negativas +/- 2 desviaciones estándar. Siendo el promedio de 0.738, el límite superior de 0.963 y el límite inferior de 0.698

Por último y como parte de una evaluación externa, el método adaptado se evaluó con muestras provenientes del programa de control de calidad externo para tamizaje neonatal de toxoplasmosis congénita de los CDC, las cuales fueron evaluadas como muestras desconocidas. Las 10 muestras, 3 de ellas con un resultado positivo para anticuerpos IgM contra *T.gondi* y 7 con resultado negativo, dieron el mismo resultado cualitativo al momento de la evaluar la adaptación del método.

4. Discusión

Los programas de tamiz neonatal detectan la existencia de una enfermedad o deficiencia congénita antes de que ésta se manifieste, para instalar o iniciar el tratamiento adecuado que evite o disminuya sus consecuencias. Es importante resaltar que el tamizaje no es un procedimiento diagnóstico, ya que los sujetos deben someterse a una prueba diagnóstica confirmatoria (Barba, E, 2004).

La utilización de las distintas soluciones como eluyentes, permitieron la extracción de los anticuerpos anti- *T. gondii* IgM. El amortiguador fosfato salino y la seroalbúmina no presentaron buena respuesta de extracción de anticuerpos, en ninguno de los dos casos de diámetro de papel filtro ni en los dos distintos tiempos de incubación. En ambos casos, todos los calibradores positivos dieron un índice de anticuerpos debajo del punto de corte, en comparación con los valores obtenidos en suero (Parker, P., & Cubbit, W. 1999).

El bajo índice de anticuerpos obtenidos en muestras eluidas con el amortiguador fosfato salino y la seroalbúmina bovina pudo deberse a que si bien estos agentes de elución actúan como bloqueadores de proteínas, no son específicos para permitir el paso de las inmunoglobulinas IgM sobre otras proteínas encontradas en la muestra de sangre seca en papel filtro (Parker, P., & Cubbit, W. 1999). Un agente amortiguador que en este caso también actuaba como bloqueador debía unirse a todos los sitios posibles de interacción no específica, sin embargo los resultados obtenidos demostraron que debido a su poca especificidad no fue posible la extracción adecuada de los anticuerpos para obtener un índice que diera respuesta adecuada en los calibradores positivos (Gibbs, J. 2007 p.3-6).

El tercer eluyente utilizado, el diluyente suministrado en el kit, obtuvo los mejores resultados, tanto cualitativamente (todos los calibradores tuvieron concordancia con los valores obtenidos en suero) como cuantitativamente (los valores de índice de anticuerpos fueron muy similares al compararse con los obtenidos en suero). La capacidad del diluyente del kit demuestra que no solo es capaz de ser selectivo para las inmunoglobulinas IgM en suero, sino que también en muestra de sangre en papel filtro, con la variación de un tiempo de incubación de 24 horas (Małgorzata, P., Petersen, E. & Szczapa, J. 2001; Rodríguez, L., Ribas Antúnez, M., Roque Quintero, A., Aragón Rodríguez, U., Martínez, R., & Díaz Mendiando, B. 1998).

La elección adecuada de un agente bloqueador para este tipo de muestras depende de su capacidad de poder bloquear otro tipo de proteínas que actúan como interferentes y dejar pasar a los anticuerpo

como por ejemplo, en aplicaciones en las que se utiliza la fosfatasa alcalina como conjugado (Gibbs, J. 2007 p.3-6).

Los tiempos de incubación evaluados (18 y 24 horas) demostraron que el diluyente del kit presentó una mayor similitud de resultados en papel filtro con los valores en suero, en ambos casos las muestras positivas séricas dieron también un resultado positivo en la adaptación del método, sin embargo con incubación de 24 horas los resultados fueron más cercanos a los valores séricos por lo cual se pueden obtener mejores índices de concordancia (Małgorzata, P., Petersen, E. & Szczapa, J. 2001).

Al momento de la evaluación del método con la mejor condición, es importante mencionar que si bien, de las 10 muestras positivas evaluadas, 9 dieron un resultado positivo, este único fracaso para poder detectar la cantidad de anticuerpos se atribuye a un error técnico, ya que ni en la evaluación de condiciones, ni en la posterior evaluación con controles externos de los CDC, mostró nuevamente un error de lectura.

Si bien todas las muestras y variables de este estudio fueron condicionadas en laboratorio, se evaluó posteriormente muestras externas provenientes del programa de control de calidad para tamizaje neonatal de toxoplasmosis de los CDC con dicha adaptación, esto para reafirmar los resultados obtenidos en la evaluación. Las muestras del CDC dieron los resultados esperados, esto se realizó con la mejor combinación de variables (24 horas de incubación, 6 mm de muestra y diluyente del kit), lo cual demuestra que la adaptación presenta resultados satisfactorios para la detección de anticuerpos IgM anti- *T. gondii*.

Al ser una adaptación para tamizaje neonatal, es importante determinar valores de punto de corte, si bien no son iguales a los suministrados por el kit, el rango obtenido en la adaptación evita que al momento de evaluar muestras, pudieran haber falsos positivos, ya que el rango determinado (0.698-0.738) es menor que el suministrado por el kit (0.9). Es de importancia resaltar que al momento de aplicar esta metodología en un estudio piloto, estos deben de adaptar el punto de corte, ya que esto permite una mejor distribución de datos negativos y así poder obtener un rango más preciso de corte (Rodríguez, *et al.* 1998).

Para la utilización de esta metodología en programa de tamizaje, es de importancia hacer un estudio piloto previo, en un área con alta prevalencia de toxoplasmosis neonatal, así como acondicionarla a

otro tipo de enfermedades subclínicas, para poder brindar un panel más extenso de diagnóstico para confirmar los casos serológicos en neonatos.

5. Referencias

- Barba, E. (2004) Tamiz neonatal: Una estrategia en la medicina preventiva. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51, 130-144.
- Botero, D., Restrepo, M. (2006). *Parasitosis humanas*. Colombia: Editorial Corporación para Investigación Biológicas. 506.
- Camargo Neto, E., Rubin, R., Schulte, J., & Giugliani, R. (2004). Newborn Screening for Congenital Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (6), 1070-1073.
- Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories (2005). *Newborn Screening Quality Assurance Program*, 22 (2), 5-10.
- Dubey, J. (2000). Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *British Medical Journal*, 321 (8) 127-128.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for industry bioanalytical, Methods, validation for human studies*. US Department of health and human services. Washington.
- Gibbs, J. (2007). *Effective Blocking Procedures*, Florida, Corning, 3, 3-6.
- Guzmán, M. & Bravo, J. (1982) Normalización de la toma de muestra de sangre en papel filtro para la serología del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 17, 114-118.
- Gordis, L. (2003) *Epidemiología*. 3ra ed. España: Editorial Elsevier, 543.
- Małgorzata, P., Petersen, E. & Szczapa, J. (2001) Prevalence of Congenital *Toxoplasma gondii* Infection among Newborns from the Poznan' Region of Poland: Validation of a New Combined

Enzyme Immunoassay for *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin A and Immunoglobulin M Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1912-1916.

Parker, P. & Cubbit, W. (1999). The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *Journal Clinical Pathology*, 52 (9), 633-639.

Rodríguez, L., Ribas Antúnez, M., Roque Quintero, A., Aragón Rodríguez, U., Martínez, R., & Díaz Mendiondo, B. (1998). Toma de muestra en papel filtro para la detección de anticuerpos IgM antiviral de la hepatitis A. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 50 (1), 42-47.

Thompson, M. & Ellison S. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 835-855.

Licda. Karla Lange
Asesora

Manuel Díaz
Tesista