

Validación de un sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii* en búfalos (*Bubalus bubalis*)

Este artículo (n.º 25092018-00128-ES) ha sido revisado por expertos, aceptado y sometido a una revisión lingüística aprobada por los autores. Todavía no se ha finalizado el diseño para la impresión. Será publicado en diciembre de 2018, en el volumen 37 (3) de la *Revista científica y técnica*.

Y. Armas Valdés ⁽¹⁾, D. Obregón Álvarez ⁽¹⁾, R. Grandía Guzmán ⁽²⁾, A. Mitat Valdés ⁽¹⁾, E. Roque López ⁽¹⁾, M. Pérez Ruano ^{(1)*} & A.A. Entrena García ⁽²⁾

(1) Universidad Agraria de La Habana, Autopista Nacional Km 23 ½, Apartado 18, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

(2) Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Finca Tirabeque, Bejucal, Mayabeque, Cuba

*Autor encargado de la correspondencia: yarmas@unah.edu.cu

Resumen

La toxoplasmosis es una de las zoonosis más difundidas en el mundo debido a que existe una amplia variedad de hospedadores de *Toxoplasma gondii*, entre los que se encuentran varias de las especies de animales domésticos. En Cuba, la especie bufalina se produce de manera sostenida con buena adaptabilidad y resistencia a las enfermedades, aunque se ha identificado como reservorio de diversos agentes etiológicos. En varios países se ha informado que los búfalos son hospedadores intermediarios de *T. gondii* y se ha indicado la necesidad de realizar estudios epidemiológicos y de comprobar la posible presencia de dicha parasitosis en esta especie. Este trabajo se realizó para validar un sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo (ELISA/i) para el diagnóstico de infección por *T. gondii* en búfalos (*Bubalus bubalis*). Para ello, se evaluó su rendimiento respecto a una prueba de aglutinación por látex. Frente a sueros de

búfalo, el sistema inmunoenzimático demostró tener una sensibilidad del 100%, una especificidad del 99,5% y una concordancia de 0,99, considerada muy buena, respecto al método de diagnóstico de referencia. Se concluye que el ELISA/i permite el diagnóstico serológico de *T. gondii* en búfalos con un excelente rendimiento diagnóstico.

Palabras clave

Aglutinación por látex – Búfalo – ELISA/i – Sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo – *Toxoplasma gondii*.

Introducción

La toxoplasmosis es una antropozoonosis de gran importancia debido a su impacto en la salud humana y en la sanidad animal. Las investigaciones epidemiológicas dirigidas al campo de las ciencias veterinarias se han llevado a cabo sobre todo en los últimos 60 años, en los que se ha incursionado en el desarrollo de sistemas de diagnóstico, fundamentalmente de pruebas de reacción intradérmica y técnicas serológicas, como la fijación del complemento y el sistema inmunoenzimático (ELISA) (1).

Para la introducción de cualquier técnica en la red diagnóstica se requiere establecer unos sistemas de garantía de calidad (GC) y de control de calidad (CC) que aseguren que el sistema está funcionando adecuadamente y que confirmen la calidad de los datos (2).

La validación de las pruebas es un paso fundamental para garantizar que los resultados de las mismas reflejan el estado real de las muestras; por lo tanto, es el proceso de evaluación de una prueba de diagnóstico el que determina su idoneidad para una finalidad concreta. Para predecir la eficacia de una prueba de diagnóstico, es necesario seguir una metodología de validación con el fin de documentar los resultados analíticos que se esperan de la prueba en cuestión (2).

Por otra parte, hay autores (3) que describen la validación de las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas como una serie

de procesos relacionados entre sí y de carácter acumulativo, debidamente documentados y controlados, cuyos resultados se mantienen dentro de un intervalo estadísticamente definido; estos procesos consisten en la estandarización, la optimización y la evaluación del rendimiento.

En Cuba, el diagnóstico de esta enfermedad se realiza fundamentalmente mediante la fijación del complemento, pero en los últimos años se ha desarrollado como método alternativo el sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo (ELISA/i), el cual tiene ventajas desde el punto de vista de la sensibilidad y la especificidad de la técnica, así como desde el punto de vista económico.

Es por ello que como objetivo de este trabajo nos proponemos validar un ELISA/i para el diagnóstico de infección por *T. gondii* en búfalos (*Bubalus bubalis*) de la región occidental de Cuba.

Materiales y métodos

Principio y protocolo del sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

Para el diseño del sistema ELISA/i, se partió del principio de la inhibición de un solo anticuerpo. La técnica se inicia con la incubación del suero problema, que puede contener anticuerpos de baja afinidad o en bajas concentraciones, con el propósito de priorizar la unión a la fase sólida (recubierta con el antígeno soluble de la cepa RH de *T. gondii*); a continuación, se agrega el anticuerpo anti-*Toxoplasma* conjugado a peroxidasa, de la firma comercial SIGMA, un biorreactivo que cumplió de forma simultánea la función de conjugado enzimático y de anticuerpo de detección; por último, el antígeno es revelado con el uso de 10 mg del complejo tampón-sustrato cromógeno ortofenilendiamina (OPD).

La interpretación de los resultados del ensayo se basó en la presencia o ausencia de color; así, la intensidad del color indicó la medida en

que los anticuerpos de la muestra inhibieron la unión del conjugado anti-*Toxoplasma* al antígeno inmovilizado en la placa:

- Reacción negativa: caracterizada por un color intenso, que indica que el conjugado anti-*Toxoplasma* se ha unido al antígeno debido a la ausencia de anticuerpos específicos en la muestra.
- Reacción positiva: caracterizada por la ausencia de color, que indica que la unión del conjugado anti-*Toxoplasma* al antígeno ha sido inhibida por los anticuerpos presentes en la muestra.

La prueba fue desarrollado por en el Laboratorio de Parasitología del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. La secuencia de operaciones que componen esta prueba se estableció según lo descrito por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2) aplicando los siguientes pasos con un volumen total de trabajo de 100 µl por pocillo:

- i) Recubrir las placas de ELISA con 100 µl por pocillo d'antígeno, *T. gondii* cepa RH, a razón de 6 µg/ml, en tampón de revestimiento e incubar durante 16 h a 4°C.
- ii) Tres lavados con solución salina tamponada con fosfato que contenga Tween 20 al 0,05% a pH 7,2 ± 0,2 (PBST), a razón de 200 µl por pocillo.
- iii) Añadir la solución de bloqueo y preservación de la fase sólida sensibilizada (PBS con albúmina sérica bovina – BSA- al 1%, tiomersal al 0,01% y glucosa al 1%, pH 7,2 ± 0,2) a razón de 200 µl por pocillo, e incubar durante 1 h a temperatura de laboratorio (24°C).
- iv) Añadir los sueros control diluidos a 1:40 en PBST con leche desnatada (PBST/L) al 1%, a razón de 100 µl por pocillo, e incubar durante 30 min a 37°C.
- v) Cuatro lavados con PBST a razón de 200 µl por pocillo.

vi) Añadir el conjugado de inmunoglobulina G (IgG) de conejo anti-*Toxoplasma* con peroxidasa diluido a 1/1000 en PBST/L al 1%, a razón de 100 µl por pocillo, e incubar durante 30 min a 37°C.

vii) Cuatro lavados con PBST a razón de 200 µl por pocillo.

viii) Añadir el complejo tampón – sustrato cromógeno (OPD), a razón de 100 µl por pocillo.

ix) Detener la reacción con la solución de parada (ácido sulfúrico (pureza analítica) 2,5 N), a razón de 100 µl por pocillo, a los 15 min.

x) Lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.

Interpretación

El factor de inhibición (FI) se describió como el porcentaje en el que los anticuerpos presentes en el suero problema fueron capaces de inhibir la unión del conjugado. La determinación del FI se calculó con la siguiente fórmula:

$$FI = (DO \text{ de la muestra} / DO \text{ del C (-)}) \times 100$$

Donde DO = densidad óptica y C (-) = control negativo

– Toda muestra con un FI igual o inferior al 15% se consideró negativa.

– Toda muestra con un FI superior al 15% e inferior al 20% se consideró sospechosa.

– Toda muestra con un FI igual o superior al 20% se consideró positiva.

Sistema de referencia empleado en la evaluación del rendimiento diagnóstico del sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

Como sistema de referencia para validar los resultados del ELISA/i se utilizó un estuche comercial de aglutinación por látex (Mascia Brunelli SpA). El protocolo de pruebas era la siguiente:

- i) Extracción del frigorífico de las muestras de suero y de los controles (positivo y negativo) que se utilizarán en el sistema ELISA/i, para que alcancen la temperatura ambiente.
- ii) Aplicación de 40 µl de los sueros (muestras y controles) sin diluir en la placa de fondo negro de 6 pocillos.
- iii) Aplicación en el pocillo cercano al suero de 20 µl de la solución de látex sensibilizada con el antígeno soluble purificado de *T. gondii* sin diluir, previamente homogenizada.
- iv) Homogenización total de los dos reaccionantes con la ayuda de un aplicador plástico y agitación de la placa de fondo negro durante 3 min de forma suave y continua.
- v) Clasificación de las muestras.

Interpretación

Se consideraron positivas las muestras en las que se evidenció la presencia de grumos en forma de velo, para lo cual se tomó como referencia el control positivo siguiendo las recomendaciones del fabricante. La existencia de una aglutinación marcada en las muestras analizadas indicó concentraciones de anticuerpos específicos anti-*T. gondii* superiores a 7,5 UI/ml. Se consideraron negativas las muestras en las que no se evidenció aglutinación, tomando como referencia el control negativo.

Conformación del panel de referencia

Para la determinación del tamaño mínimo de muestra que se debe incluir en el panel de referencia, se adoptó la fórmula propuesta por Gardner para la validación de los ELISA.

$$N = \frac{Z^2 P(1-P)}{e^2}$$

Donde:

N: Tamaño de la muestra

P: Sensibilidad analítica

e: Error mínimo permisible

Z: Intervalo de confianza

Se consideró que la sensibilidad analítica del ensayo fue del 99% (3), y para la estimación se aplicó un nivel de confianza del 95%, con una probabilidad de error del 5%.

Se conformó el panel de referencia con 400 sueros de búfalo procedentes de diferentes explotaciones de producción bufalina de diferentes categorías, situadas en la región occidental de Cuba.

Se realizó un estudio transversal por conglomerados; la mayoría de las explotaciones estudiadas pertenecían al sistema de crianza controlada y ninguna se encontraba próxima a asentamientos poblacionales, aunque sí a otros tipos de explotaciones ganaderas, y en todos los casos existía al menos una vivienda cercana.

Obtención de las muestras

La sangre se extrajo por punción de la vena yugular utilizando agujas hipodérmicas y el sistema de extracción con tubos de vacío. Los frascos colectores (GPlast) tenían una capacidad de 10 ml. La sangre fue centrifugada a 1200 rpm durante 5 min para separar el suero, el cual se depositó en viales de 0,5 ml. Las muestras fueron identificadas y conservadas a -20°C hasta el momento del análisis.

Evaluación del rendimiento del sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

Para la evaluación del rendimiento se tomaron en consideración los parámetros establecidos en Cuba (4).

Estudios de precisión (repetibilidad y precisión intermedia)

Para comprobar la repetibilidad y la precisión intermedia del ELISA/i, se realizaron cuatro ensayos utilizando en cada uno una réplica de cada suero control (negativo y positivo, de bajo y alto título,

respectivamente), y se determinó el coeficiente de variación (CV) de los resultados obtenidos para establecer la comparación entre estos.

Estudios de exactitud y precisión

Para los estudios de precisión y exactitud, se evaluó la dispersión de los resultados, es decir, el grado en que los datos obtenidos en 25 ensayos realizados con los sueros controles se alejaban de las medias; dicha dispersión se representó mediante gráficos de control (gráfico de la media y gráfico del recorrido), y como límite se fijó un rango de \pm dos desviaciones estándar tomando como referencia la media general de todos los ensayos (1).

Para determinar estos parámetros, se utilizaron los controles negativo y positivo (de bajo y alto título, respectivamente), los cuales se generaron a partir de la unión o mezcla de seis sueros hasta obtener un volumen final de 10 ml; se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y aglutinación por látex para determinar la presencia de anticuerpo. Los sueros control se identificaron de la siguiente forma:

- El control negativo: C (-)
- El control positivo de título bajo: C (+) IFI 1/32, Látex 1/16-1/32
- El control positivo de título alto: C (++) IFI 1/128, Látex 1/64-1/128

Estos sueros se procesaron en 25 ensayos consecutivos con cinco réplicas por ensayo, generando gráficos de control de la media y del recorrido (variabilidad). Los ensayos se realizaron en varios días por parte del mismo operador.

Estudio de la concordancia

Para evaluar el rendimiento de la prueba, se realizó un análisis de la concordancia respecto a la prueba de aglutinación por látex.

Se determinó la sensibilidad diagnóstica (relativa), la especificidad diagnóstica (relativa), los valores predictivos positivo y negativo, la eficacia y el índice Kappa, según lo recomendado (2, 3, 4, 5). Para la

organización de los resultados se empleó una tabla de contingencia (véase el Cuadro I).

El cálculo de los parámetros evaluados se realizó según lo descrito por Ochoa (5) con las fórmulas siguientes:

- Sensibilidad relativa (S) = $[a / (a + c)] \times 100$.
- Especificidad relativa (E) = $[d / (d + b)] \times 100$.
- Valor predictivo positivo (VPP) = $[a / (a + b)] \times 100$.
- Valor predictivo negativo (VPN) = $[d / (c + d)] \times 100$.
- Eficacia (Ef) = $[(a + d) / (a + b + c + d)] \times 100$.

El nivel de concordancia entre los resultados del ELISA/i y los del método de referencia se determinó mediante el índice Kappa (K), que se calcula con la siguiente fórmula (5):

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

Donde:

$$p_o = (a + d) / n \quad p_e = (P + N) / n \quad n = a + b + c + d$$

Concordancia entre resultados positivos:

$$P = [(a + b) / n] \times [(a + c) / n] \times n$$

Concordancia entre resultados negativos:

$$N = (c + d) - ((a + c) - P)$$

Los resultados que aportó el índice de concordancia Kappa se clasificaron según la literatura de referencia (5), como se indica en el Cuadro II.

Procesamiento estadístico de los resultados

Se empleó el paquete estadístico MINITAB® 18 (6) para procesar los datos generados por el experimento, con un 95% de confianza en la interpretación de los resultados.

Mediante el método de Kolmogórov-Smirnov (7) se determinó si los resultados presentaban una distribución normal, y con la prueba de Levene (7) se verificó si cumplían con la homogeneidad de varianza. En los estudios de precisión, se determinó la media, la desviación estándar y el CV intra e inter-ensayos de los controles, y se asumió como límite de aceptación un CV del 10% según lo recomendado (3, 5).

En los estudios de exactitud y precisión, se procesaron los resultados de los 25 ensayos para generar gráficos de control de la media y del recorrido (variabilidad). Como criterio para considerar que el sistema era preciso, se estableció que los valores obtenidos con los distintos ensayos debían permanecer dentro de un intervalo de \pm dos desviaciones estándares (DE) respecto a la media general de los resultados de todos los ensayos (8).

Resultados y discusión

Los cuatro ensayos realizados (Cuadros III y IV) evidenciaron la estabilidad de la media, la desviación estándar y el CV de los sueros control.

El CV (Cuadro IV) demostró una variabilidad entre réplicas en los estudios intra e inter-ensayos inferior al 10%, lo cual indica que las condiciones seleccionadas para el ELISA/i garantizaron resultados confiables en cuanto a repetitividad y precisión intermedia, lo que coincide con los resultados obtenidos por otros (3, 5, 9).

En los estudios de exactitud y precisión, los resultados del análisis estadístico confirmaron que los datos generados siguen una distribución normal, por lo que resultó adecuado confeccionar los gráficos de control para evaluar la dispersión de los resultados a través

de las desviaciones estándar, según los procedimientos establecidos (1, 8).

La Figura 1 ilustra los resultados del control interno de la calidad mediante los gráficos de control, los valores medios y la variabilidad para cada suero control. Además, en cada uno de los gráficos se señalaron los límites de hasta \pm tres desviaciones estándares (límites estándares, o SL) con líneas rojas.

El análisis de los gráficos de control demostró que la variabilidad de los resultados obtenidos en las réplicas de los ensayos con los controles negativo y positivo se mantuvieron dentro de los límites fijados en el experimento (± 2 desviaciones estándar), resultados que coinciden con los modelos propuestos para sistemas ELISA (3, 5), por lo que se considera que el sistema es capaz de generar resultados exactos y precisos.

Internacionalmente se han reconocido diversos métodos serológicos para el diagnóstico de *T. gondii*, entre ellos, la prueba de Sabin-Feldman o *Dye-test* (sistema de referencia), pero dado que esta presenta como inconveniente el uso de parásitos vivos, su empleo está limitado a laboratorios especializados (10), por lo que se han recomendado otros métodos, como la aglutinación por látex, caracterizada por ser práctica, sensible, de fácil ejecución, de bajo costo y capaz de detectar anticuerpos tanto del tipo IgG como del tipo IgM, motivo por el que resulta útil sobre todo en monitoreos epidemiológicos (11); por todas estas ventajas, ha sido mundialmente empleada para diagnosticar esta enfermedad en diferentes especies de animales (12, 13).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se decidió considerar como método de referencia un estuche comercial de aglutinación por látex que da resultados confiables respecto a la inmunofluorescencia indirecta según la evaluación llevada a cabo en el Laboratorio de Referencia Nacional para la Toxoplasmosis del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK), y que se emplea en la red del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) y en especies de experimentación (1).

Al observar la tabla de contingencia con los resultados generados tras el procesamiento de las 400 muestras analizadas mediante ELISA/i y mediante la prueba de aglutinación por látex, se comprueba que solo se obtuvo una muestra discordante (1 falso positivo), como se indica en el Cuadro V.

En el Cuadro VI se exponen los resultados de la evaluación del rendimiento del sistema ELISA/i al trabajar con los 400 sueros de búfalo y con el sistema de aglutinación por látex como método de referencia.

Los resultados de sensibilidad y especificidad diagnósticas alcanzados por el ELISA/i validan la eficiencia de esta técnica para el diagnóstico de *T. gondii* en diferentes especies de animales. Estos resultados se corresponden con los encontrados por Entrena (1), que evaluó el rendimiento analítico de esta técnica en condiciones similares frente a sueros de diferentes primates no humanos, de perro, de conejo y de oveja, y determinó que la sensibilidad era del 99,3% y la especificidad, del 99,6%.

Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Morris y Kelly (14), quienes emplearon una prueba de IFI, un método con una sensibilidad y una especificidad equivalentes a las del *Dye-Test* (método de referencia), que son del 99% y del 100%, respectivamente; por otra parte, fueron superiores a los que obtuvieron Lourenço y col. (15) con una inmunoelectrotransferencia para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita, que consistieron en una sensibilidad del 73,5% y una especificidad del 97,4%, y también superiores a los de Dubey y col. (16) con el empleo de la técnica de microaglutinación, que obtuvieron una sensibilidad del 58,3% y una especificidad del 96,1%.

Los valores predictivos se modifican drásticamente y la sensibilidad y la especificidad permanecen invariables; los valores predictivos obtenidos con el ELISA/i, tanto positivo como negativo, que fueron del 99,5% y del 100%, respectivamente, son superiores a los recomendados por Jacobson (3), quien propone que cuando la

prevalencia disminuye, el valor predictivo negativo aumenta y el valor predictivo positivo disminuye.

La eficacia es la proporción de los casos positivos y negativos correctamente diagnosticados (3, 5). El ELISA/i diagnosticó correctamente el 99,8% de los casos positivos y negativos, resultado que respalda la utilidad de este sistema para el diagnóstico de *T. gondii* en búfalos. Este resultado se acerca a la eficacia óptima de una prueba, ya que solo hubo un falso negativo, y la eficacia óptima se alcanza cuando el 100% de los casos es diagnosticado correctamente (5).

Al analizar el índice Kappa, se pudo comprobar la existencia de un alto grado de concordancia (0,99) con el método de diagnóstico de referencia (Cuadro VI), y se consideró muy bueno según Ochoa, siendo similar al 0,98 encontrado por Entrena (1).

En sentido general, los resultados alcanzados coinciden con los de Dubey (10), que recomienda el uso del ELISA en el diagnóstico de *T. gondii* en bóvidos por su alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, e igualmente coinciden con los obtenidos por Entrena (1), quien evaluó el rendimiento diagnóstico de este sistema con paneles de sueros de cuatro especies diferentes (primates no humanos, oveja, conejo y perro).

De los 400 sueros de búfalo incluidos en el estudio de validación, 221 de ellos contenían anticuerpos anti-*Toxoplasma* según el ELISA/i empleado, lo cual constituye una seroprevalencia del 55,3%. Estos resultados fueron confirmados por la prueba de aglutinación por látex aplicada a las mismas muestras durante la validación del ELISA/i, cuyos resultados concordaron en el 99,8% de los casos con los del ELISA/i.

Este es el primer hallazgo relativo a la seroprevalencia de *T. gondii* en la especie bufalina en Cuba, el cual se corresponde con la situación de diversos países donde se ha descrito la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma* en búfalos, como es el caso de la India, China, Italia y Brasil.

Conclusiones

Este trabajo validó el sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo (ELISA/i) para el diagnóstico de infección por *T. gondii*, por lo que constituye una herramienta eficaz para el diagnóstico de anticuerpos frente a *T. gondii* en búfalos.

El ELISA/i demostró un excelente rendimiento diagnóstico frente a los sueros de búfalo analizados.

Bibliografía

1. Entrena A.A. (2011). – Desarrollo de un sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo, para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii* en diferentes especies. Tesis de Doctoral. Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba, 147 págs. Disponible en: www.researchgate.net/publication/324923253_Desarrollo_de_un_sistema_inmunoenzimatico_de_inhibicion_de_un_anticuerpo_para_el_diagnostico_de_Toxoplasma_gondii_en_diferentes_especies (fecha de consulta: 3 de mayo de 2018).

2. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2017). – Toxoplasmosis. *En* Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, Capítulo 2.9.9. OIE, París, Francia, 13 págs. Disponible en: www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.09_Toxoplasmosis.pdf (fecha de consulta: 11 de octubre de 2017).

3. Jacobson R.H. (1998). – Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *En* Laboratorios veterinarios para las enfermedades infecciosas (J.E. Pearson, edit.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **17** (2), 507–526. doi:10.20506/rst.17.2.1119.

4. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) (2007). – Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. Regulación No. 47-2007. Ministerio de Salud Pública, Ciudad de La Habana, Cuba, 36 págs.

Disponible en:
http://old.cecmed.cu/Docs/RegFarm/DRA/Diag/Reg/Reg_47-07.pdf
(fecha de consulta: 11 de octubre de 2017).

5. Ochoa R.F. (2008). – Bases metodológicas para la evaluación en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Ediciones Instituto Finlay, Ciudad de la Habana, Cuba, 82 págs. Disponible en:
www.researchgate.net/publication/268059991_bases_metodologicas_para_la_evaluacion_de_anticuerpos_en_ensayos_clinicos_de_vacunas_mediante_tecnicas_inmunoenzimaticas (fecha de consulta: 11 de octubre de 2017).

6. Minitab (2017). – Minitab for Windows. Statistical Programme [CD-ROM], Versión 18. State College, Pennsylvania.

7. Grandía Guzmán R., Entrena García A.A., Cruz Hernández J., Ginorio Gavito D., Domenech Cañete I., Alfonso Morales A., Perdomo Redondo L., Chi Ramírez L. & Burón Rodríguez M. (2013). – Validación de un sistema inmunoenzimático de inhibición para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii* en *Felis catus*. *Rev. Electrón. Vet.*, **14** (7), 12 págs. Disponible en:
www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070713/071311.pdf (fecha de consulta: 11 de octubre de 2017).

8. International Organization for Standardization (ISO) (2013). – ISO 7870-2:2013. Control charts – Part 2: Shewhart control charts, 1st Ed. ISO, Geneva, 44 págs. Disponible en:
www.iso.org/standard/40174.html (fecha de consulta: 11 de octubre de 2017).

9. Fischer H.-G., Stachelhaus S., Sahn M., Meyer H.E. & Reichmann G. (1998). – GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Molec. BioChem. Parasitol.*, **91** (2), 251–262. doi:10.1016/S0166-6851(97)00227-2.

10. Dubey J.P. (2009). – Toxoplasmosis of animals and

humans, 2nd Ed., CRC Press, Beltsville, MD, Estados Unidos de América, 95–117.

11. Ramzan M., Akhtar M., Muhammad F., Hussain I., Hiszczyńska-Sawicka E., Haq A.U., Mahmood M.S. & Hafeez M.A. (2009). – Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Rahim Yar Khan (Punjab), Pakistan. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, **41** (7), 1225–1229. doi:10.1007/s11250-009-9304-0.

12. Sharif M., Gholami Sh., Ziaei H., Daryani A., Laktarashi B., Ziapour S.P., Rafiei A. & Vahedi M. (2007). – Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. *Vet. J.*, **174** (2), 422–424. doi:10.1016/j.tvjl.2006.07.004.

13. Yu X., Chen N., Hu D., Zhang W., Li X., Wang B., Kang L., Li X.D., Liu Q. & Tian K. (2009). – Detection of *Neospora caninum* from farm-bred young blue foxes (*Alopex lagopus*) in China. *J. Vet. Med. Sci.*, **71** (1), 113–115. doi:10.1292/jvms.71.113.

14. Morris J.T. & Kelly J.W. (1992). – Effective treatment of cerebral toxoplasmosis with doxycycline. *Am. J. Med.*, **93** (1), 107–108. doi:10.1016/0002-9343(92)90692-5.

15. Lourenço E.V., Pereira S.R., Faça V.M., Coelho-Castelo A.A.M., Mineo J.R., Roque-Barreira M.-C., Greene L.J. & Panunto-Castelo A. (2001). – *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology*, **11** (7), 541–547. doi:10.1093/glycob/11.7.541.

16. Dubey J.P., Kerber C.E. & Granstrom D.E. (1999). – Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **215** (7), 970–972. Disponible en: www.researchgate.net/publication/12788345_Serologic_prevalence_of_Sarcocystis_neurona_Toxoplasma_gondii_and_Neospora_caninum_in_horses_in_Brazil (fecha de consulta: 11 de octubre de 2017).

Cuadro I**Tabla de contingencia empleada en la selección del valor de corte y los estudios de evaluación del rendimiento**

| Sistema ELISA/i | Método de diagnóstico de referencia: aglutinación por látex | | Total |
|-----------------|---|-----------|---------------|
| | Positivos | Negativos | |
| Positivos | VP (a) | FP (b) | a + b |
| Negativos | FN (c) | VN (d) | c + d |
| Total | a + c | b + d | a + b + c + d |

Donde:

VP (a) = Verdaderos positivos o positivos correctamente detectados.

FP (b) = Falsos positivos.

FN (c) = Falsos negativos.

VN (d) = Verdaderos negativos o negativos correctamente detectados.

ELISA/i: sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

Cuadro II**Grado de concordancia según el índice Kappa**

| Concordancia entre los resultados obtenidos con dos pruebas distintas | Valor del índice Kappa |
|---|------------------------|
| Deficiente | < 0,20 |
| Regular | 0,21 – 0,40 |
| Moderada | 0,41 – 0,60 |
| Buena | 0,61 – 0,80 |
| Muy buena | 0,81 – 1,00 |

Cuadro III

Comportamiento de las medias y de las desviaciones estándar de los resultados obtenidos al utilizar controles en el sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

| Controles | Ensayo 1 | | Ensayo 2 | | Ensayo 3 | | Ensayo 4 | |
|-----------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | Media | DE | Media | DE | Media | DE | Media | DE |
| C (-) | 0,546 | 0,0099 | 0,489 | 0,0085 | 0,544 | 0,0035 | 0,575 | 0,0184 |
| C (+) | 0,196 | 0,0113 | 0,186 | 0,0092 | 0,169 | 0,0078 | 0,233 | 0,0113 |
| C (++) | 0,185 | 0,0106 | 0,190 | 0,0106 | 0,164 | 0,0035 | 0,218 | 0,0184 |

C (-) control negativo

C (+) control positivo

C (++) control positivo de alta afinidad

DE: desviaciones estándar

Cuadro IV

Resultados de los estudios de precisión del sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

| Controles | Coeficientes de variación (%) | | | | |
|-----------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------------------|
| | Repetibilidad | | | | Precisión intermedia |
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Ensayo 4 | |
| C (-) | 1,8 | 1,7 | 0,7 | 3,2 | 5,6 |
| C (+) | 5,8 | 5,0 | 4,6 | 4,9 | 7,9 |
| C (++) | 5,7 | 5,6 | 2,2 | 8,4 | 7,9 |

C (-) control negativo

C (+) control positivo

C (++) control positivo de alta afinidad

Cuadro V

Tabla de contingencia 2 × 2 con los dos métodos: el sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo y la aglutinación por látex

| Sistema ELISA/i | Método de diagnóstico de referencia: aglutinación por látex | | Total |
|-----------------|--|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | |
| Positivos | 211 | 1 | 212 |
| Negativos | 0 | 188 | 188 |
| Total | 211 | 189 | 400 |

ELISA/i: sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

Cuadro VI

Resultados de la validación del sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo

| Parámetros | Valores |
|-------------------------------|---------|
| Sensibilidad (%) | 100 |
| Especificad (%) | 99,5 |
| Valor predictivo positivo (%) | 99,5 |
| Valor predictivo negativo (%) | 100 |
| Eficacia (%) | 99,8 |
| Índice Kappa | 0,99 |

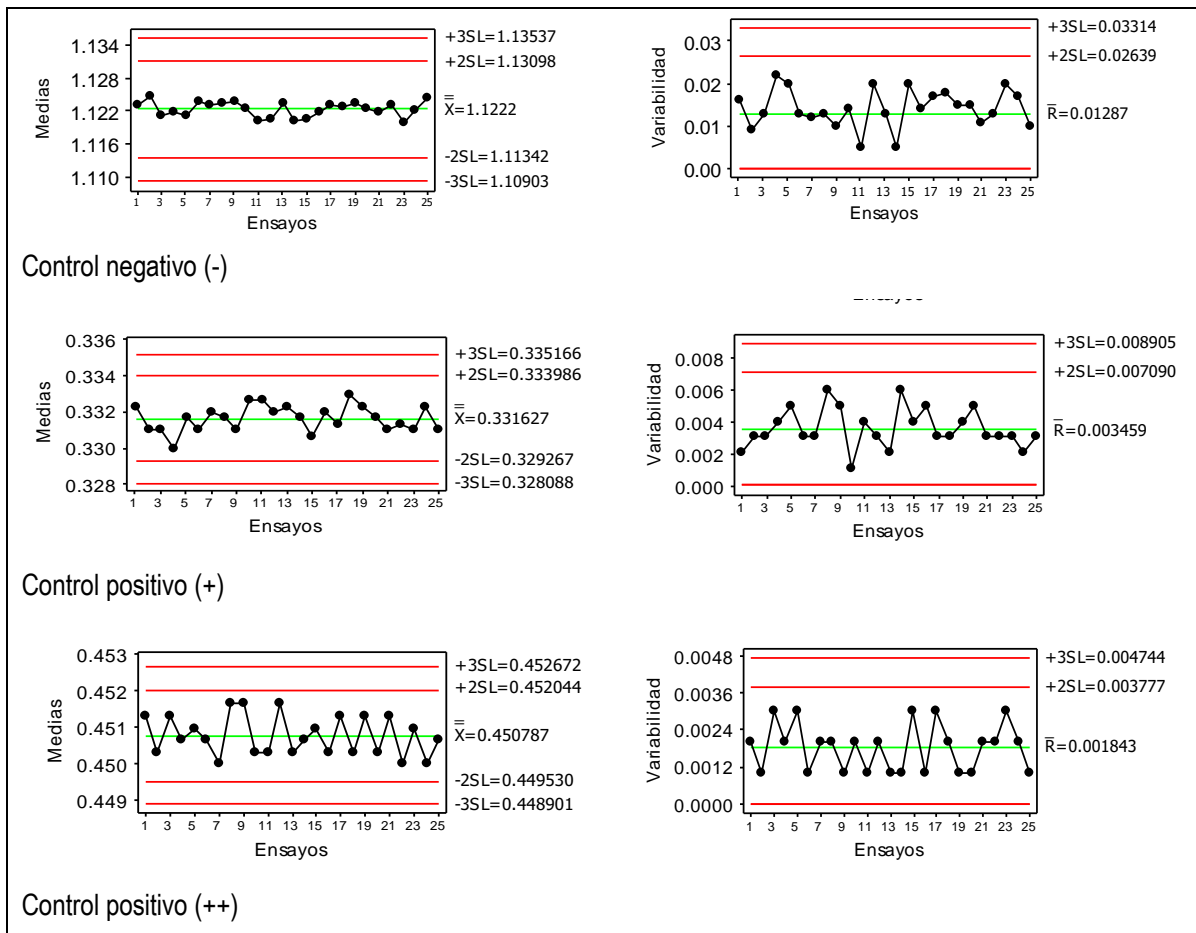


Fig. 1
Resultados de los estudios de exactitud y precisión

X: medias
 SL: limitaciones estándar (standard limitations)
 R: orden (rank)