

Patrón de inmunoblotting y niveles de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en suero y humor acuoso de pacientes con lesiones de toxoplasmosis ocular (Aqueous humor and serum immunoblotting profiles and anti-toxoplasma gondii antibodies in patients with toxoplasmosis-induced retinal lesions)

Morella Bouchard¹✉, Daisy León de Bracho², Nacarid Alfonso¹, Joselyn Rojas¹, María Isabel Gómez³, María Gladys Bottaro³

¹ Instituto de Inmunología Clínica. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

² Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

³ Servicio de Oftalmología. Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. Mérida. Venezuela

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 15 de Mayo de 2012. Aceptado: 02 de Octubre de 2012.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar en muestras de suero y humor acuoso los niveles de anticuerpos anti-toxoplasma a través del Coeficiente de Goldmann y Witmer (CGW) y el patrón de reconocimiento antigénico a través del inmunoblotting (IB), en pacientes con serología positiva con y sin lesiones de toxoplasmosis ocular. Se recogieron simultáneamente muestras de suero y humor acuoso de 26 pacientes: un grupo de casos que poseían lesiones retinales de toxoplasmosis ocular en fase activa e inactiva (n=17) y un grupo control que requería cirugía ocular por presencia de cataratas (n=9). La determinación de IgM e IgG específicas se realizó por ELISA de inmunocaptura e indirecto, respectivamente. Se utilizó la inmunodifusión radial para la cuantificación de la IgG total. El CGW resultó >2, indicativo de producción local de anticuerpos específicos en 12/17 de los casos, mientras que en los controles no se observó, esto evidenció una sensibilidad del 71% y una especificidad de 100%. En IB, la aparición de bandas diferentes en humor acuoso, indicativo de producción local de anticuerpos específicos se observaron en 11/17 de los casos y 1/9 de los controles, reflejando una sensibilidad de 65% y una especificidad de 89%. Al considerar las dos pruebas la sensibilidad se incrementó a un 73%, pero la especificidad disminuyó a 89%. En conclusión el IB es útil como prueba confirmatoria para diagnóstico de toxoplasmosis ocular, pero sólo como un complemento del coeficiente de GW especialmente en pacientes con lesiones atípicas donde el diagnóstico clínico es difícil.

Palabras clave

Toxoplasmosis ocular, coeficiente de Goldmann y Witmer, humor acuoso, anticuerpos, inmunoblotting

Abstract

The purpose of this study was to analyze the anti-*Toxoplasma gondii* antibodies levels in serum and aqueous humor samples in patients with ocular toxoplasmosis by using Goldman and Witmer Coefficient (GWC) and the parasite antigen recognition pattern by immunoblotting (IB) in positive serology patients with or without ocular toxoplasmosis lesions. Serum and aqueous humor samples were simultaneously collected from 26 patients: a group of patients with ocular toxoplasmosis retinal lesions in active and inactive phase (n=17) and a control group that required ocular surgery because of cataract (n=9). IgM and IgG level tests were determined by immunocapture and indirect ELISA respectively, Radial immunodiffusion and immunoblotting. Radial immunodiffusion was used for quantification of total IgG, CGW > 2 indicated the local specific antibodies production in 12/17 patients, whereas in the control group none was observed. The GWC showed 71% sensitivity and 100% specificity. By IB test, the detection of two bands in aqueous humor indicated a local specific antibodies production which were observed in 11/17 patients and 1/9 controls showing 65% sensibility and 89% specificity. By considering both tests the sensibility increased to 73% and the specificity decreased to 89%. In conclusion, the IB technique can be used as a complementary test to GWC, especially in patients with atypical lesions that lead to unclear clinical diagnosis

Keywords

Ocular toxoplasmosis, Goldmann and Witmer Coefficient, aqueous humor, antibodies, immunoblotting.

Introducción

La toxoplasmosis ocular es una de las principales manifestaciones clínicas de la infección humana por el parásito *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Es la causa más común de uveítis posterior, representando entre el 30 y el 50% de los casos (1). Es una enfermedad progresiva y recurrente caracterizada por una inflamación difusa en retina y coroides comúnmente diagnosticada como retinocoroiditis necrotizante. Sus efectos pueden variar desde leves hasta producir un deterioro severo de la agudeza visual si el parásito se aloja en el área macular (2). Al realizar el examen oftalmoscópico, las lesiones inicialmente se pueden observar como una mancha algodonosa sobreelevada de color blanco amarillento de límites imprecisos que deja lugar a cicatrices blancas. Luego de la cicatrización las lesiones palidecen, se atrofian y presentan un pigmento negro. Estas lesiones pueden ser solitarias, múltiples o satélites a una cicatriz retiniana pigmentada y ser consecuencia de una infección congénita o adquirida después del nacimiento (3-5).

El diagnóstico de la toxoplasmosis ocular se realiza clínicamente mediante la observación directa de las lesiones retinianas típicas y por la determinación de anticuerpos anti-*T.gondii* en el suero para demostrar el contacto con el parásito. La alta prevalencia de serología positiva en la población y la dificultad para determinar el momento de la colonización en el tejido ocular representa un obstáculo para establecer una correlación entre los resultados del laboratorio, las lesiones oculares y el tiempo de evolución de la infección. La serología negativa descarta que la inflamación intraocular sea causada por el parásito (6). En Venezuela, diversas publicaciones han demostrado la amplia difusión de esta infección reportando prevalencias que oscilan desde un 14% a un 88% (7- 13).

En los últimos años el análisis de fluidos intraoculares por técnicas de inmunoensayo (ELISA) o inmunotransferencia (immunoblotting), se ha utilizado como un importante marcador para el diagnóstico de toxoplasmosis ocular. Con este objetivo algunos autores determinan el Coeficiente de Goldmann y Witmer (GW), el cual compara la proporción de anticuerpos en el humor acuoso frente a los niveles séricos, para reflejar la producción local de los mismos.

En este estudio se comparó en muestras de suero y humor acuoso, los niveles de anticuerpos anti-toxoplasma a través del coeficiente de GW y el patrón de reconocimiento antigénico, a través del

immunoblotting (IB), en pacientes con serología positiva con y sin lesiones de toxoplasmosis ocular.

Materiales y Métodos

Población

Para realizar esta investigación de tipo descriptiva, correlacional y de corte transversal se estudiaron 26 pacientes que acudieron a la consulta del Servicio de Oftalmología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) entre enero de 2010 a julio de 2011, los cuales fueron divididos en dos grupos. Grupo casos: conformado por 17 pacientes con lesiones retinales típicas de toxoplasmosis ocular en fase activa e inactiva. Los pacientes en fase activa cursaban con síntomas como miodesopsias, visión borrosa o disminuida, escotoma central o paracentral en los casos de compromiso macular y el signo característico de la retinocoroiditis activa por toxoplasmosis que es un área blanco amarillenta en el sitio de la retinitis necrosante, con inflamación vítrea de moderada a intensa, lo que le confiere el aspecto típico de "faro en la niebla". Las lesiones inactivas se identificaron como cicatrices atróficas con un anillo de hiperpigmentación circundante. Grupo control: conformado por 9 pacientes con serología positiva para toxoplasmosis que requerían cirugía ocular por presentar alguna patología ocular no inflamatoria como cataratas.

Recolección de muestras

A cada uno de los pacientes se le recolectó, simultáneamente, muestras de suero y humor acuoso previo Consentimiento Informado, cumpliendo con las normas éticas del Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA ULA). Las muestras de suero fueron obtenidas mediante venopunción periférica, extrayéndose 3 ml de sangre completa en tubo sin anticoagulante, posteriormente centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos y conservadas a -20°C hasta su procesamiento. La extracción del humor acuoso se realizó en quirófano por paracentesis de la cámara anterior, tomándose entre 50 y 200 µl de fluido ocular, que se conservó a -20°C hasta su procesamiento.

Determinación de IgM e IgG anti-*T. gondii* en suero y humor acuoso

La IgM específica se determinó en las muestras de suero por ELISA de inmunocaptura (DiaSorin ®) según instrucciones del fabricante. Para la IgG específica se utilizó un ELISA indirecto, previamente estandarizado en el laboratorio del

Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de Los Andes (IDIC-ULA). Para la realización del ensayo se sensibilizaron placas de fondo plano (Costar®) con el antígeno de *T. gondii* diluido en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 a una concentración de 1,5 µg/pozo. Se realizaron diluciones seriadas de los sueros y controles en leche descremada 2% PBS-T partiendo de 1: 64 hasta 1: 4096, el humor acuoso se diluyó en 1:10, se colocó 100 µL en cada pozo y se incubaron las placas a 37°C por una hora. Luego de 5 lavados con PBS-T, se agregaron 100 µl del conjugado anti IgG humana-peroxidasa (Sigma®) a dilución 1:1000, procediéndose a incubar por 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados se agregaron 100 µl de sustrato TMB (Tetramethyl benzidine) incubándose a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos, para luego detener la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico (H₂ SO₄) 1N. La cantidad de color producto de la reacción enzimática se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 450/620 nm en un espectrofotómetro. Se consideró como valor de corte aquel obtenido del promedio de la DO de los controles negativos más tres desviaciones estándar. Los sueros con valores de corte mayores o iguales que las DO correspondientes a la dilución 1:64 fueron considerados positivos.

Cuantificación de IgG total en suero y humor acuoso

El análisis de la IgG total se realizó en placas de inmunodifusión radial marca LTA srl (Milano, Italia) según instrucciones del fabricante.

La producción local de anticuerpos específicos se estableció de acuerdo al coeficiente de Goldmann y Witmer (GW) mediante la fórmula:

$$\frac{\text{IgG antiToxoplasma en humor acuoso/IgG total en humor acuoso}}{\text{IgG antiToxoplasma en suero/IgG total en suero}}$$

Un valor > 2 fue considerado positivo (14).

Técnica de Immunoblotting (IB).

Con la finalidad de discriminar cualitativamente los marcadores antigénicos responsables de la respuesta de anticuerpos en suero y humor acuoso, se procedió a separar taquizoitos de *T. gondii* cepa A-6014, provenientes de ratones infectados pertenecientes al bioterio del IDIC-ULA, en gel de poliacrilamida al 10% y SDS en cámara BioRad a 100 mV junto con un estándar de peso molecular Gibco. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa poro 0,2 µm, con el equipo de electrotransferencia Hoefer por 2 horas a 4°C en

cuarto frío. El bloqueo de la membrana se realizó con TBS 1X y BSA (Bovine Serum Albumin) por 2 horas a temperatura ambiente, luego se cortaron tiras de nitrocelulosa de 4 mm de ancho que fueron incubadas con las muestras seleccionadas a una dilución de 1:20 en el caso del suero y 1:10 en el del humor acuoso, toda la noche a 4 °C. Se lavaron 3 veces con TBS 1X BSA por 5 min cada uno. A continuación se incubaron todas las tiras con el Ac de conejo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:500 en TBS 1X BSA por 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron 4 lavados con TBS 1X BSA por 5 min cada uno y 1 con TBS 1X. Finalmente se revelaron las tiras sumergiéndolas en una solución reveladora con HRP (Horseradish Peroxidase) hasta que las bandas se hicieron visibles, deteniendo la reacción al lavarlas con TBS por 10 min. Para el análisis de las bandas se utilizó el programa IMAGE J del National Institutes of Health -USA (15) con el plugin MolWt macro para Peso Molecular (16).

Se consideró indicativo de producción local de anticuerpos específicos cuando en el humor acuoso se observó una banda de especificidad diferente en relación con las bandas en el suero del mismo paciente la cual se identificó como Diferente (17).

Análisis estadístico

Para definir diferencias entre los grupos estudiados, se utilizó la prueba de x² y el coeficiente de contingencia. Se estableció un índice de confianza del 95%, considerándose toda probabilidad menor del 0,05 (p<0,05) como significativa.

Resultados

El grupo casos estuvo conformado por 10 (58,8%) pacientes femeninas y 7 (41,1%) masculinos, con edades comprendidas entre 11 y 62 años (\bar{X} 28,9; desviación estándar 14,3). El tiempo de evolución de la infección en los pacientes estudiados osciló entre 1 a 372 meses (\bar{X} 64,5; desviación estándar 106,3), descrito como el período transcurrido desde la primera consulta hasta el momento de la toma de muestra. Se observaron lesiones activas al fondo de ojo en 7/17 (41,1%), no se pudo discriminar si eran agudas o crónicas reactivadas. Se obtuvieron títulos de IgG específica de 1:256 en 3/17 (17,6%), 1:1024 en 3/17 (17,6%) y 1:4096 en 11/17 (64,7%). Se reportó como positiva para IgM sólo 1/17 muestras. Las características clínicas y los resultados de las muestras de suero, IB y coeficiente GW de los 17 pacientes con lesiones de toxoplasmosis ocular se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas y de laboratorio del grupo casos: pacientes con lesiones de toxoplasmosis ocular.

Pacientes	Edad	Sexo	TE meses	LA	Anticuerpos Anti Toxoplasma en suero		Relación entre anticuerpos antitoxoplasma en suero y humor acuoso	
					IgG Títulos	IgM	Bandas IB	Coefficiente GW >2
1	11	F	84	No	1:1024	Neg	SB	No
2	38	F	38	No	1:256	Neg	Diferente	Si
3	35	F	372	No	1:256	Neg	SB	Si
4	25	F	300	No	1:4096	Neg	SB	No
5	53	F	36	No	1:1024	Neg	Diferente	Si
6	24	M	10	Si	1:256	Neg	Diferente	Si
7	17	F	48	Si	1:4096	Neg	Diferente	Si
8	30	F	12	No	1:4096	Neg	SB	No
9	62	F	1	No	1:4096	Neg	Diferente	Si
10	19	M	1	Si	1:4096	Neg	SB	No
11	17	M	1	Si	1:4096	Neg	Diferente	Si
12	26	M	2	Si	1:4096	Neg	Diferente	Si
13	17	M	12	No	1:1024	Neg	Iguales	No
14	34	F	48	No	1:4096	Pos	Diferente	Si
15	18	F	36	Si	1:4096	Neg	Diferente	Si
16	18	M	84	No	1:4096	Neg	Diferente	Si
17	48	M	12	Si	1:4096	Neg	Diferente	Si

M masculino; F femenino; TE tiempo de evolución; LA lesión activa; Neg negativo; Pos positivo; IB Immunoblotting; SB Sin Banda

En el grupo control se incluyeron 7 (77,7%) pacientes femeninas y 2 (22,2%) masculinos, con edades comprendidas entre 62 y 75 años (\bar{X} 69,8; desviación estándar 5,3). Se registraron títulos de IgG específica de 1:256 2/9 (22,2%), 1:1024 3/9 (33,3%) y 1:4096 4/9 (44,4%), ninguno de los pacientes de este grupo presentó IgM positiva (datos no mostrados).

El coeficiente de GW resultó >2, indicativo de producción local de anticuerpos específicos, en 12/17 de pacientes con Toxoplasmosis ocular, en tanto que ninguna de las muestras del grupo control presentó este valor. La sensibilidad y especificidad del coeficiente fue de 71% y 100%, respectivamente. En el IB los anticuerpos fueron específicos para antígenos de diferentes pesos moleculares, sin embargo se visualizaron con mayor frecuencia entre los 30-40, 60-70 y 80-100 kDa, en concordancia con la especificidad antigénica del parásito¹⁷. La presencia de bandas diferentes en humor acuoso, indicativo de producción local de anticuerpos, se observaron en 11/17 de los casos y 1/9 de los controles, reflejando una sensibilidad de 65% y una especificidad de 89% (figura 1). Al considerar las dos pruebas la sensibilidad se

incrementó a un 73%, pero la especificidad disminuyó a 89%. No se encontró relación estadísticamente significativa entre el coeficiente o los resultados del IB y las variables tiempo de evolución y presencia de lesiones activas.

Discusión

La determinación de anticuerpos anti *T. gondii* sólo en el suero tiene una contribución limitada en el diagnóstico de toxoplasmosis ocular y cada día se considera con mayor interés al humor acuoso como muestra adicional para el diagnóstico de esta patología, particularmente en los casos en que las lesiones son similares a las que se producen en otras infecciones o presentan características atípicas (18). Recientemente se ha utilizado la PCR para detectar el ADN del parásito en humor acuoso, sin embargo sus resultados pueden estar limitados por la escasa cantidad de muestra que es posible obtener en algunas ocasiones o la baja carga parasitaria en la misma. La determinación de los anticuerpos

específicos en fluidos oculares continúa siendo un método más accesible y sensible (19).

En este estudio se determinó la presencia de

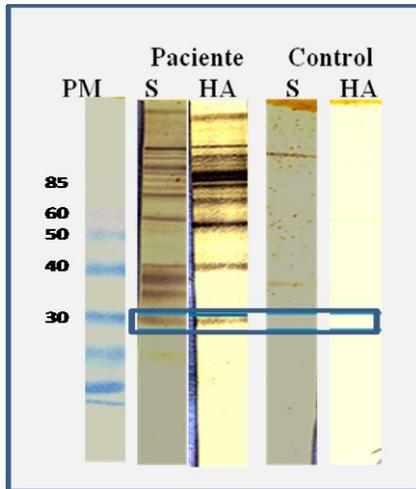


Figura 1. Ejemplo de patrón de inmunoblotting en S y HA. Las bandas que aparecen en HA pero no en suero son indicativas de producción local de anticuerpos. La banda en 30 kDa es característica de infección por toxoplasma. S suero ; HA Humor acuoso ; PM peso molecular

anticuerpos específicos y patrón de IB en suero y humor acuoso de pacientes con serología positiva, con y sin lesiones de toxoplasmosis ocular. El promedio de edad de los casos fue de 28,9 años (DE 14,3), mientras que en el grupo control fue de 69,8 años (DE 5.67), diferencia que fue estadísticamente significativa ($p > 0,005$). Las edades de los pacientes del grupo control fueron mayores debido a que se trataba de pacientes sometidos a cirugía de catarata. Pero a pesar de esto, esta variable no afectó el análisis de la producción de anticuerpos específicos locales ya que el grupo de casos presentaba lesiones de toxoplasmosis ocular frente a un grupo que no las tenía (control).

En el grupo de casos sólo 1 paciente resultó positivo para la IgM anti-toxoplasma. La presencia de IgM se asocia con infección aguda, sin embargo este resultado se encontró en un paciente con lesiones retinianas atróficas, de tipo crónico. Esto hace pensar que probablemente se trataba de una IgM persistente y está bien descrito la permanencia de esta inmunoglobulina hasta un año después de la infección, tratándose de resultados falsos positivos (20).

La obtención del humor acuoso, cuando es realizada por un oftalmólogo con experiencia, resulta relativamente rápida, sencilla, con poco riesgo para el paciente. En este trabajo, se analizaron muestras pareadas de suero y humor acuoso para la presencia

de anticuerpos específicos. El Coeficiente de GW reveló la producción local de IgG específica en 12/17 de los casos, con una sensibilidad del 71%, la cual se puede considerar elevada en comparación a lo reportado en otros estudios, con rangos que van desde 39 a 93% (18). Se ha descrito un incremento de la sensibilidad con el tiempo, siendo de gran importancia el lapso transcurrido entre el inicio de los síntomas y la paracentesis, ya que a mayor tiempo mayor producción de anticuerpos. De esta manera la diferencia en los reportes de sensibilidad encontradas en estos estudios puede ser explicada por el tiempo de evolución o por otra parte por la presencia de una uveítis típica o atípica (18). En un estudio anterior, para esta prueba, reportamos una sensibilidad de 78% y una especificidad de 100% (21)

La especificidad para el coeficiente de GW fue del 100%, lo cual se puede relacionar en este caso con la selección de pacientes con lesiones oculares típicas, ya fueran activas o crónicas, mientras que los controles no poseían ninguna patología inflamatoria ocular, asumiendo que la barrera hemato-ocular estaba indemne con mínima posibilidad de transudación pasiva de anticuerpos por lo que no se observó ningún falso positivo (22).

En el caso del IB encontramos una disminución de la sensibilidad y la especificidad en relación al coeficiente de GW, probablemente debido a que por la cronicidad de las lesiones los niveles de producción local de anticuerpos eran bajos y que por tratarse de una prueba cualitativa la intensidad de las bandas en ocasiones no permitió visualizar un resultado positivo. Recientemente el IB se está utilizando como herramienta para el diagnóstico de toxoplasmosis aguda (23) y congénita (24-25), debido a su alta capacidad discriminadora de especificidad antigénica, lo que permite diferenciar anticuerpos de la madre de anticuerpos producidos por el neonato.

Ni el coeficiente GW ni el IB fueron útiles para discriminar en las lesiones activas cual era aguda o crónica reagudizada.

Usando como herramienta ambos métodos diagnósticos se aumentó la sensibilidad a un 73%, resultados muy similares a los obtenidos por Garweg et al (17) en su estudio. Sin embargo la especificidad disminuyó al adicionar la inmunotransferencia como prueba complementaria

En 2011, Garweg y Groot-Mijnes et al (26) presentan un algoritmo para el diagnóstico de toxoplasmosis ocular con lesiones típicas y atípicas. Ellos recomiendan el uso del coeficiente de GW como prueba confirmatoria, pero si la producción local no es detectada por esta prueba entonces sugieren utilizar el

IB y la PCR, de esta manera la confirmación se puede alcanzar en el 85% de los casos

En conclusión, el IB es útil como prueba confirmatoria para diagnóstico de toxoplasmosis ocular, pero se debe utilizar sólo como un complemento del coeficiente de GW, debido a su mayor costo y dificultad técnica.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento procedente del CDCHTA por el proyecto - M-862-06-07-B

Referencias

- Dodds EM. Ocular oxoplasmosis. Arch Soc Esp Oftalmol. 2003; 78: 531-41. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Hernández M. Toxoplasmosis ocular: un breve repaso. Rev Oftalmol Venez. 2003; 59: 38-43. [\[Google Scholar\]](#)
- Nussenblatt RB, Belfort R Jr. Ocular toxoplasmosis: an old disease revisited JAMA 1994; 271: 304-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 1996; 23: 277-82 [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Labalette P, Delhaes L, Margaron F, Fortier B, Rouland JF. Ocular toxoplasmosis after the fifth decade. Am J Ophthalmol. 2002; 133: 506-15 [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier Jr MN, Belfort Jr R. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104: 345-50. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- De la Rosa M, Bolivar J, Perez HA. *Toxoplasma gondii* infection in Amerindians of Venezuelan Amazon. Medicina (B Aires). 1999; 59:759-62. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Urdaneta H, Ramírez A, Muñoz J. Toxoplasmosis: Evaluación seroepidemiológica realizada en Trujillo, Venezuela. Bol Dir Malarial Saneam Ambient 1990; 30: 39- 47. [\[Google Scholar\]](#)
- Diaz-Suarez O, Parra AM, Araujo-Fernandez M. Seroepidemiology of toxoplasmosis in a marginal community of the Municipality of Maracaibo, Zulia State, Venezuela. Invest Clin. 2001; 42: 107-21. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Triolo-Mieses M and Traviezo-Valles L. Sero prevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en gestantes del municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela. Kasmera. 2006; 34: 07-13 [\[Google Scholar\]](#)
- Martínez Méndez D, Martínez Leal E, Oberto L y Navas P. Sero prevalencia de la toxoplasmosis en mujeres que asistieron al Hospital "Dr. Rafael Gallardo". Coro, estado Falcón. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2009; 29:49-51. [\[Google Scholar\]](#)
- Diaz-Suárez O, Estevez J. Seroepidemiology of toxoplasmosis in women of childbearing age from a marginal community of Maracaibo, Venezuela. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009; 51: 13-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Alarcón de Noya B, Romero J, Sánchez E, Jesús L, Salinas R, Ortiz L Pacheco M, Díaz-Bello Z, Mauriello L, Soto M, Díaz MP, López-Mora JA. Despistaje de toxoplasmosis y enfermedad de Chagas en la Consulta Prenatal del Hospital Universitario de Caracas. Rev Obstet Ginecol Venez. 2010; 70:75-81. [\[Google Scholar\]](#)
- Goldmann H, Witmer R. Antikörper im Kammerwasser. Ophthalmologica. 1954; 127:323-30.
- Rasband W, Image J. U. S. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/> 1997-2011.
- Instruction Manual Semi Dry Blotter PEGASUS. Disponible en: <http://www.phase-hl.com/imagej.htm>
- Garweg JG, Garweg SD, Flueckiger F, Jacquier P, Boehnke M. Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4593-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Talabani H, Asseraf M, Year H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, Brézin AP, Dupouy-Camet J. Contributions of Immunoblotting, Real-Time PCR, and the Goldmann-Witmer Coefficient to Diagnosis of Atypical Toxoplasmic Retinochoroiditis. J Clin Microbiol. 2009; 47: 2131-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Mazier D, and Paris L. Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2008; 46: 1965-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Tanyuksel M, Guney C, Araz E, Saracli MA and Doganci L. Performance of the Immunoglobulin G Avidity and Enzyme Immunoassay IgG/IgM Screening Tests for Differentiation of the Clinical Spectrum of Toxoplasmosis. J Microbiol. 2004; 42: 211-15. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Bouchard M, León de B D, Alfonso N, Bottaro MGs. Anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en suero y humor acuoso de pacientes con lesiones retinales de toxoplasmosis ocular. MedULA. 2011; 20: 36-41.
- Villard O, Filisetti D, Roch-Deries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3537-41. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Jost C, Touafek F, Fekkar A, Courtin R, Ribeiro M, Mazier D, Paris L. Utility of Immunoblotting for Early Diagnosis of Toxoplasmosis Seroconversion in Pregnant Women. Clin Vaccine Immunol. 2011; 18: 1908-1912. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Machado AS, Andrade GM, Januário JN, Fernandes MD, Carneiro AC, Carneiro M, Carellos EV, Romanelli RM, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RW. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105: 757-61. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Magi B, Migliorin L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. New Microbiol. 2011; 34: 93-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Garweg JG, de Groot-Mijnes JD, Montoya JG. Diagnostic Approach to Ocular Toxoplasmosis. Ocul Immunol Inflamm. 2011; 19: 255-61. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Como citar éste artículo: Bouchard M León de Bracho D, Alfonso N, Rojas J, Gómez MI, Bottaro MG, Patrón de immunoblotting y niveles de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en suero y humor acuoso de pacientes con lesiones de toxoplasmosis ocular. *Avan Biomed* 2013; 2: 10-5