

56  
74

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN**

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgM  
CONTRA TOXOPLASMA GONDII EN SUERO  
DE PACIENTES CON ABORTO INVOLUNTA-  
RIO POR LAS TECNICAS DE ELISA (ENZIME-  
LINKED INMUNOSORBENTASSAY) E IFI (IN-  
MUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA).**

**T E S I S**

**Que Para Obtener el Título de:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a**

**MARIA DE LOURDES SALDAÑA PAZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen .....	2
Introducción.....	3
1.- Generalidades del <u>Toxoplasma gondii</u> .....	3
1.1 Historia .....	3
1.2 Morfología .....	3
1.3 Ciclo biológico.....	4
1.4 Epidemiología .....	6
1.5 Patogenia y Sintomatología .....	7
1.6 Inmunología .....	8
1.7 Tratamiento .....	10
2.- Diagnóstico .....	11
2.1 Demostración directa e indirecta del parásito.....	11
2.2 Inmunodiagnóstico .....	12
2.2.1 Reacción de Sabin y Feldman .....	12
2.2.2 Prueba de Fijación del complemento.....	12
2.2.3 Prueba de Hemoaglutinación Pasiva.....	13
2.2.4 Prueba de Aglutinación Directa .....	13
2.2.5 Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta.....	13
2.2.6 ELISA .....	14
Objetivos .....	21
Planteamiento del problema .....	22
Hipótesis .....	23
Características del trabajo de investigación .....	24

Actividades para la recolección de datos.....	25
Delimitación del universo (factores de inclusión y no inclusión).....	25
Características de la muestra .....	25
Técnicas .....	26
Análisis estadístico .....	34
Resultados .....	36
Análisis de resultados .....	58
Conclusiones .....	61
Bibliografía .....	63

## ABREVIATURAS

<b>ELISA....</b>	<b>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</b>
<b>IPI.....</b>	<b>Imunofluorescencia Indirecta</b>
<b>ANA.....</b>	<b>Anticuerpos antinúcleo</b>
<b>DNA.....</b>	<b>Acido Desoxirribonucleico</b>
<b>RNA.....</b>	<b>Acido Ribonucleico</b>
<b>BH.....</b>	<b>Biometria Hemática</b>
<b>FR.....</b>	<b>Factor Reumatoide</b>
<b>Ac.....</b>	<b>Anticuerpo</b>
<b>Ag.....</b>	<b>Antígeno</b>
<b>UI.....</b>	<b>Unidades Internacionales</b>
<b>D.O.....</b>	<b>Densidad óptica</b>
<b>μcl.....</b>	<b>microlitros</b>
<b>ml.....</b>	<b>mililitros</b>
<b>dl.....</b>	<b>decilitro</b>
<b>hr.....</b>	<b>hora</b>
<b>min.....</b>	<b>minuto</b>
<b>seg.....</b>	<b>segundo</b>
<b>nm.....</b>	<b>nanometro</b>
<b>mm.....</b>	<b>milímetro</b>
<b>g.....</b>	<b>grano</b>

**RESUMEN**

Para demostrar cual técnica serológica para la determinación de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii es más recomendable se hizo un estudio en una muestra de 50 mujeres que presentaron aborto involuntario y fueron atendidas en el Hospital General de México de la Secretaria de Salud.

Las reacciones empleadas fueron ELISA e IPI. Además se determinó el PR y los ANA ya que éstos producen falsos positivos en la determinación de Ac IgM contra T. gondii por ambas técnicas. Se determinó la frecuencia de T. gondii por ser éste una causa frecuente de aborto.

Los resultados obtenidos indican que la técnica de ELISA fue más específica pero menos sensible que IPI. No se presentaron falsos positivos en la técnica de ELISA, en cambio en la técnica de IPI si se presentaron, de los cuales un gran número posiblemente fueron debidos al PR. La frecuencia de T. gondii en la muestra estudiada fue alta.

Se recomienda la técnica de ELISA por ser más específica y por no dar resultados falsos positivos, aunque se emplee más tiempo en montarla y el equipo inicial que requiere sea muy costoso.

Se recomienda ampliamente el diagnóstico de la toxoplasmosis por ser causa frecuente de aborto, y en particular que se realice un control en aquellas mujeres que sean seronegativas al inicio del embarazo.

## INTRODUCCION

### 1.- GENERALIDADES DEL Toxoplasma gondii

1.1 HISTORIA. El toxoplasma gondii es un esporozoario del grupo de los coccidios y fue descubierto por Nicolle y Manceaux en 1908 en gondis, unos roedores que se mantenían en el Instituto Pasteur de Túnez y que murieron de una enfermedad adquirida aparentemente en el laboratorio (11, 21). Durante casi 30 años, el parásito fue poco conocido, oscuro, sin mayor importancia, sabiéndose sólo que podía producir enfermedad en animales de laboratorio y que había sido descrito en una serie más de animales. No fue sino hasta 1937 en que se prestó atención a la parasitosis desde el punto de vista de interés humano gracias a los hallazgos de Wolf y Cowen quienes comprueban definitivamente la toxoplasmosis humana al aislar el parásito del cerebro de un niño de 31 días que presentaba convulsiones, hidrocefalia, calcificaciones cerebrales y retinocoroiditis (10).

1.2 MORFOLOGIA. El T. gondii es un organismo delicado, ovoide, piriforme o semilunar de 4 a 6 micras de longitud por 2 a 3 micras de ancho, con uno o ambos extremos puntiagudos o redondeados. En las preparaciones con Giemsa o Wright, el citoplasma aparece de color azul con una masa roja y redondeada de cromatina, que es el núcleo. Este se encuentra situado más cerca de uno de los extremos, y en el opuesto hay una masa pequeña teñida de rojo, que es el cuerpo paranuclear. En las preparaciones fijadas en húmedo y teñidas con hematoxilina se observa que el núcleo tiene una membrana y un cariosoma central. El T. gondii aparece en las preparaciones en fresco como un cuerpo hialino, y se presenta aislado o en pares en el exudado peritoneal de los animales inoculados. Por su morfología se asemeja algo a las leishmanias, pero no tiene cinetoplasto y nunca se le han observado formas flageladas.

Las fotografías del parásito visto al microscopio electrónico revelan una membrana y un conglomerado de material in tensamente teñido. Este parásito es intracelular necesario en su forma de trofozoito. Existe un solo serotipo y una so la especie. Sobrevive entre los 20 y 55 °C, se conserva a - 4 °C cerca de un mes (1, 7, 11, 21).

1.3 CICLO BIOLÓGICO. Este parásito se reproduce por fisión binaria longitudinal; primero se divide el núcleo y después - lo hace el citoplasma (8). El ciclo biológico está dividido en dos fases: una enteroepitelial la cual solo ocurre en gatos y felinos y la fase extraintestinal la cual ocurre en los hog pederos intermediarios. Las diferentes etapas de reproduc ción del T. gondii se agrupan en 5 categorías; tres ocurren - en la fase enteroepitelial con sus tipos morfológicos A, B, C, D y E (multiplicación asexual, fase gametogónica, multiplica ción sexual, fase de oociste). La cuarta y quinta fase se dan en el ciclo extraintestinal en las células de los hospeda dores intermediarios: la fase constituida por el grupo presen te en infestaciones agudas, llamada taquizoito y la fase quí tica presente en infecciones crónicas, llamada bradizoito (8, 26), (Fig. 1).

Fase Enteroepitelial: el comienzo de ésta fase de multi plicación se detecta por la aparición de microorganismos tipo A, de las 12 a las 18 hr después de la infección; éste tipo - se divide por endodiogenia. El microorganismo tipo B apare ce entre las 12 y 54 hr post infección. El tipo C se presen ta de 24 a 54 hr después de la infección y se divide por es quizogonia. El tipo D se presenta entre las 32 hr y los 15 días después de la infección, estos se dividen por endodioge nia, esquizogonia y por simple separación del merozoito de - la masa nuclear. El tipo E se presenta entre los 3 y 15 -- días post infección, se reproduce por esquizogonia.

Los gametos son encontrados en todo el intestino, princi palmente en el ileón de los 3 a 15 días después de la infec ción. La formación del oociste sucede en las células epite liales del intestino delgado, saliendo posteriormente y alo --



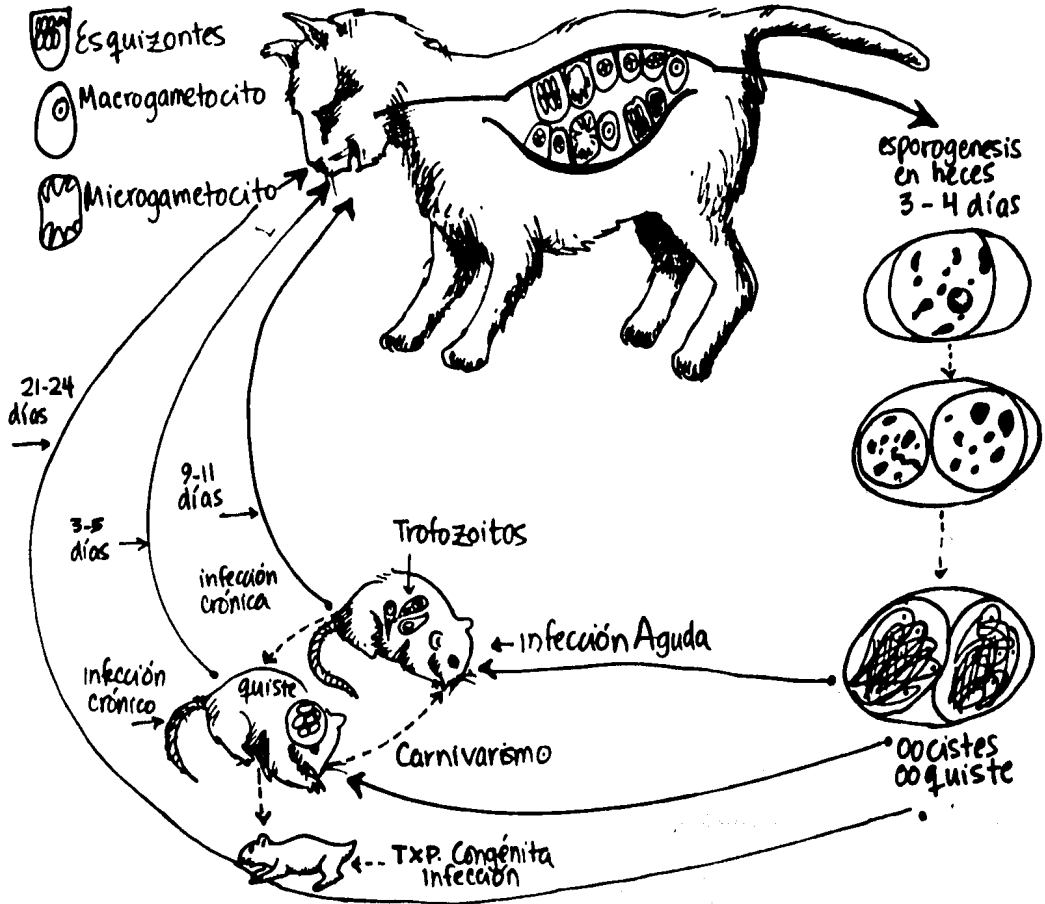


FIGURA No. 1. CICLO BIOLÓGICO DEL Toxoplasma gondii (21).

andose en las heces. En éste caso el periodo de prepatencia es de 3 a 5 días y el máximo de la producción de oocistos ocurre entre los 5 y 8 días. El periodo de patencia es de 7 a 20 días. El número de oocistos eliminados en heces llega a ser de 20 millones por día durante 20 días (8, 26).

Fase Extraintestinal: cuando el hospedador intermediario o definitivo ingiere cualquiera de las tres formas del parásito las formas libres de taquizoitos comienzan a replicarse en la lamina intestinal, atravezandola para llegar a sangre y linfa e invadir macrófagos, linfocitos y granulocitos. Los parásitos contenidos en estas células viajan por circulación portal hasta llegar a hígado, pulmón y ganglios linfáticos esto ocurre entre 3 y 7 días. La localización de bradizoitos enquistados comienza entre la primera y segunda semana y en correlación con los mecanismos inmunológicos del hospedador (26).

1.4 EPIDEMIOLOGIA. Hay dos maneras mediante las cuales el hombre puede adquirir la toxoplasmosis: de fuentes externas y la forma congénita (11). Dentro de las fuentes externas tenemos los siguientes tipos: a) por ingestión de oocistos, que se encuentran diseminados en los sitios donde los gatos defecan o por ingestión o contaminación a partir de hospedadores de transporte; b) por ingestión de quistes contenidos en carnes que se comen crudas o semicrudas, sobre todo la de cerdo y res en nuestro medio. Dentro de la forma congénita es a través de la placenta especialmente cuando la mujer sufre una primoinfección durante la gestación, en éste caso se pueden producir abortos (caso bastante frecuente) o bien malformaciones del feto, las cuales van a cursar sin síntomas en el momento del nacimiento, pudiendo manifestarse semanas o meses después (11). Los factores que intervienen para su transmisión son: inmunocompetencia de la madre, virulencia e inactividad de la cepa o capacidad de evasividad de la misma, integridad de la placenta y la relación entre el tiempo de infección materna y el paso transplacentario de anticuerpos maternos al feto (14).

La infección por T. gondii que adquiere la madre en el curso del embarazo, solo es sintomática en el 10 - 20% de los casos, pero todos los casos de mujeres embarazadas que adquieren esta parasitosis tienen el mismo riesgo de afección al feto ( 4 ).

Se puede establecer que la toxoplasmosis es una enfermedad de amplia distribución geográfica, uniformemente repartida por todo el planeta, dependiendo esta distribución de varios factores, entre los que se pueden incluir: los climáticos, socioeconómicos, contacto con animales domésticos, en especial el gato (huésped definitivo del ciclo biológico del parásito), costumbres alimentarias en relación al consumo de carne, etc. ( 2 ).

La prevalencia de la infección aumenta con la edad, pudiendo decirse que en los grupos de mayor edad la gran mayoría de la población alberga al parásito (11). Estudios realizados en México demuestran lo anterior ya que se encontró que en una población cuyas edades están de 0 - 4 años el 35% presentó toxoplasmosis; de 10 a 19 años el 45.2% y de 30 a 39 años el 58% la presentó (21).

**1.5 PATOGENIA Y SINTOMATOLOGIA.** Aunque no es muy clara la vía de entrada del T. gondii en el hombre, observaciones experimentales sugieren que puede ser por vía nasal, oral, vaginal y conjuntival. Una vez que el parásito tiene acceso a los tejidos a través de la vía sanguínea, puede ser localizado en los ganglios linfáticos, cerebro, pulmones y otros órganos. Este parásito tiene especial afinidad por el sistema reticuloendotelial y por el endotelio de los vasos, y se multiplica en las células de éstos tejidos. Tiene tendencia a producir exudado seroso en las cavidades orgánicas, necrosis en las zonas invadidas y pequeños focos de consolidación y granulomatosis, con calcificación de las lesiones cerebrales. Entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad está: linfadenopatía, exantema, exantema parecido al del tifus, meningoencefalitis y coriorretinitis.

En el tipo congénito, las lesiones suelen ser graves y - la calcificación cerebral, la coriorretinitis, la hidrocefalia o microcefalia y los trastornos psicomotores son comunes (7).

La sintomatología de la infección por T. gondii depende del asiento anatómico de los parásitos en el cuerpo y del grado del daño hístico producido por los mismos. En la fase -- aguda se reconocen los siguientes cuatro tipos de síntomas: a) síndrome parecido al del tifus; b) forma cerebroespinal -- con fiebre, delirio y convulsiones; c) linfadenitis febril si mulando fiebre glandular; y d) crecimiento de los ganglios -- linfáticos sin fiebre, o bien sin síntomas. Los tipos c y d son los que se encuentran con mayor frecuencia (7).

1.6 **INMUNOLOGIA.** El T. gondii es un parásito intracelular y son los conoides, organelos del parásito, los encargados -- del mecanismo de invasión a las células del huesped. La entrada del parásito provoca una respuesta inmune del hospeda-- dor tanto del tipo humoral como celular, siendo ésta última - la de mayor importancia. El primer contacto de T. gondii -- con el organismo es a nivel de macrófagos. Estos son infectados y sufren en su interior la replicación del parásito; en respuesta a ésta primera invasión, el sistema inmune dispara mecanismos para la eliminación del parásito ( 9 ).

El mecanismo de inmunidad celular se inicia cuando los - linfocitos T son específicamente sensibilizados por contacto con el T. gondii, a esto se le denomina fase aferente. Este contacto ocurre en el sitio de infección o en los nódulos linfáticos del área periférica donde el parásito se ha instalado ( 9 ).

Aproximadamente dos días después de que han sido sensibi lizados, los linfocitos T presentan transformación blastoide. Esta transformación implica aumento del tamaño celular, sinte sis de DNA, RNA y proteínas, el material nuclear cambia de he terocromatina a eucromatina y eventualmente la célula sufre - divisiones múltiples ( 15 ).

Una vez que están los linfocitos sensibilizados, empiezan a liberar mediadores, proceso denominado fase eferente; otra opción es que se formen células de memoria, éstas circulan en sangre y nódulos linfáticos y su función es de responder específicamente al antígeno con el que estuvieron previamente en contacto y son responsables de la rápida respuesta que se presenta cuando el organismo se expone nuevamente al parásito. - Después de la reexposición al agente infeccioso, los linfocitos T sensibilizados producirán diferentes sustancias solubles llamadas linfocinas. Una de esas linfocinas (MIF, inhibe la migración y activa a los macrófagos) va a activar a los macrófagos, éstos macrófagos activados difieren de los normales en su gran capacidad de inhibir o matar al parásito. -- Una vez activado el macrófago se presenta la fagocitosis que se acompaña de un estallido respiratorio que genera la activación de una oxidasa que reduce el oxígeno molecular hasta superóxido y peróxido de hidrógeno, éstos junto con iones haluros y catalasa causan la muerte del parásito; siendo digeridos por las enzimas lisosomales y liberados del macrófago por exocitosis (23).

El mecanismo mediado por anticuerpos se presenta cuando el linfocito T sensibilizado participa en el proceso de síntesis de anticuerpos. Las inmunoglobulinas son de tipo M y G y cumplen con la función de eliminar al parásito, ya sea colaborando con el macrófago o a través del sistema del complemento (15).

Como ocurre con la mayoría de los antígenos parasitarios los primeros anticuerpos resultantes de la activación de la inmunidad son del tipo IgM indicando su presencia la fase aguda de la enfermedad. Posteriormente la aparición de la IgG establece la fase crónica. Los primeros anticuerpos se manifiestan a partir de la primera semana, alcanzando la máxima concentración aproximadamente al mes; los segundos se elevan aproximadamente al doceavo día y llegan a su máximo alrededor de los dos o tres meses. La adquisición de resistencia después de la infección está correlacionada con la aparición de

linfocitos sensibilizados específicamente, macrófagos activados y anticuerpos ( 9, 15 ).

El principal mecanismo de inmuno-evasión del T. gondii es su carácter intracelular ya que puede resistir el mecanismo de muerte dado que infecta a células fagocíticas permitiendo así la replicación del parásito. Además debido a la importancia del macrófago en el proceso de inhibición y muerte del parásito, el T. gondii ha generado otra forma de evasión contra la respuesta inmune que es liberando sulfátidos que -- inhiben la fusión lisosoma-fagosoma, favoreciendo así su supervivencia. Otra forma de evasión es la que presenta cuando se activa el sistema inmune del hospedador, entonces el parásito adopta la forma de quiste y se recluye en el sistema reticuloendotelial, estableciendo un equilibrio entre el parásito y el hospedador (15 ). Sin embargo, hay procesos patológicos que rompen este equilibrio, resultando a favor del parásito, el cual se desenquista y se reagudiza el proceso (23). Enfermedades como: Síndrome de Di George, Síndrome de Nezelhof y Síndrome de Aldrich Wiskott; son de origen congénito y afectan a la inmunidad mediada por células. Los linfocitos de estos pacientes no sufren transformación cuando son expuestos a mitógenos o antígenos; la producción de linfocinas, como MIF es casi nula. Hay otro tipo de enfermedades como: -- Síndrome de Hodgkin y otros linfomas que presentan alteraciones similares a las anteriores, que pueden conducir a un aumento en la incidencia de infecciones por T. gondii (15, 23).

**1.7 TRATAMIENTO.** Aunque las sulfamidas han resultado curativas en la toxoplasmosis experimental del ratón, no hay toxoplasmicida de absoluta eficacia para el hombre. La pirimetamina, con sulfamidas triples, parece que se han empleado con éxito en casos individuales. Con el siguiente régimen se -- han obtenido buenos resultados en el tratamiento de infecciones oculares: pirimetamina: 50 mg iniciales, 25 mg seis hr -- después, posteriormente 25 mg + 6 mg de sulfamida triple diariamente durante 2 semanas. Dado que se puede producir anemia macrocítica con estas dosis de pirimetamina, es importante efectuar exámenes de sangre repetidos durante el tiempo -- que tarde el tratamiento (7).

Cuando una mujer embarazada adquiere la toxoplasmosis en los primeros meses de gestación y es tratada oportunamente, disminuyen las posibilidades de lesión al producto, reportando algunos autores prevención de 23 a 60% de los casos (16).

## 2.- DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la toxoplasmosis no es fácil y depende a menudo de una combinación de signos, síntomas, serología, histopatología y aislamiento del parásito. Dado que la infección en los humanos es muy común (11), esto hace que la prevalencia de anticuerpos contra T. gondii sea muy frecuente en la población normal, por lo que una prueba serológica positiva en una persona es índice de una infección presente o pasada, pero no necesariamente de enfermedad. Los métodos que se tienen a disposición para el diagnóstico de esta parasitosis son:

- a) Demostración directa e indirecta del parásito en tejidos o líquidos del cuerpo.
- b) Demostración de anticuerpos en suero, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y exudados conjuntival y vaginal.
- c) Pruebas de tipo alérgico (toxoplasmina) (11, 25).

**2.1 DEMOSTRACION DIRECTA E INDIRECTA DEL PARASITO.** En lo que respecta a esta prueba, se tiene primeramente la observación de las formas del toxoplasma (trofozoito o quiste), por el microscopio ordinario, de fase y electrónico, en líquidos orgánicos normales como: líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, lágrimas, saliva, leche, orina, moco, heces, etc., en productos patológicos: exudado conjuntival, amigdalino, bronquial peritoneal, pleural, vaginal, etc.

También se pueden hacer estudios de improntas, de biopsias y cortes histológicos (ganglios linfáticos, endometrio principalmente), etc., (11), examinados por microscopio ordinario, de fluorescencia o en contraste de fase.

O bien, se puede hacer el aislamiento del parásito por inoculación de los especímenes mencionados a animales en laboratorio (ratones), usando diversas vías.

Los frotis o improntas se colorean con las técnicas de May-Grunwald-Giemsa, Wright, etc. La dificultad para hallar el T. gondii en sus diversas formas de evolución por éste método, hace que no se utilice en la práctica de rutina cuando se sospecha de toxoplasmosis humana (11).

## 2.2 INMUNODIAGNOSTICO. Se disponen de varias técnicas:

2.2.1 Reacción de Sabin y Feldman. Descrita por Sabin y -- Feldman en 1946 y ha sido modificada por diversos autores muy ligeramente en el transcurso de los años. La reacción es compleja y se basa en el hecho de que los toxoplasmas frescos obtenidos del exudado peritoneal de ratones blancos infectados, puestos en presencia de anticuerpos específicos y de un factor semejante al complemento, el llamado "factor accesorio", que se encuentra en el suero humano fresco, sufren una lisis del citoplasma la cual se puede ver de manifiesto por diversos métodos. En la reacción original los toxoplasmas modificados no se tiñen en presencia de azul de metileno alcalino.

La prueba se considera altamente específica, sensible y capaz de dar resultados cuantitativos y reproducibles. La reacción comienza a ser positiva una semana después de la infección y generalmente los títulos se elevan rápidamente alcanzando títulos máximos entre la sexta y octava semana después de la infección. El inconveniente que presenta esta técnica es el gran riesgo de infección que se tiene al trabajar con parásitos vivos, (4, 25).

2.2.2 Prueba de fijación del Complemento. Fue aplicada -- por Nicolau y Ravelo en 1937 para detectar anticuerpos contra T. gondii. La reacción se basa en la propiedad que tienen ciertos anticuerpos de fijar el complemento. Se puede considerar sensible en alto grado, pero no es muy específica, por lo que muchos autores piensan que no se puede utilizar como prueba de sondeo, sino sólo y exclusivamente en casos y poblaciones muy concretas y no para estudios epidemiológicos en general (2, 11, 25).



2.2.3 Prueba de Hemoaglutinación Pasiva. Fue introducida por Jacobs y Lunde en 1957 en el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis. El método consiste en sensibilizar eritrocitos de carnero, previamente tanizados, con antígenos solubles de T. gondii obtenido del exudado peritoneal de ratones infectados, los cuales en presencia de un suero con anticuerpo específico se aglutinan característicamente en el fondo del tubo. La prueba manejada correctamente es ampliamente satisfactoria. Es un método tan sencillo y tan sensible como la reacción de Sabin y Feldman y menos peligrosa porque no se manejan toxoplasmas vivos y los resultados se observan a simple vista (2, 11, 25).

2.2.4 Reacción de Aglutinación Directa. Se fundamenta en la formación de una malla tridimensional visualizable a simple vista al formar un velo uniforme, consecuencia de la unión de un antígeno integrado en la pared del parásito y su anticuerpo aglutinante correspondiente.

Cuando en la formación de esta malla interviene el anticuerpo pentamérico IgM, es posible inhibirla utilizando el 2-Mercaptoetanol. Esta sustancia tiene como propiedad la ruptura de los puentes disulfuro intercatenarios que unen los números; acción que no tiene lugar en las moléculas de IgG, por lo que el tratamiento de los sueros con este producto hace negativa la reacción de aglutinación provocada por las IgM. La reacción no es tan sensible y específica como la de Sabin y Feldman y suele dar resultados confusos en sueros tratados con 2-Mercaptoetanol o sin él. (11).

2.2.5 Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta. Preconizada por Kelen y cols. y modificada por Ambroise-Thomas. Es una prueba inmunohistoquímica utilizada en la identificación y localización de antígenos mediante anticuerpos específicos conjugados con compuestos fluorescentes. Estos conjugados son muy útiles en la identificación rápida de organismos responsables de enfermedades infecciosas o para medir los niveles de anticuerpos, especialmente en enfermedades autoinmunes

é infecciosas. El reactivo fluorescente más utilizado es el isotiocianato de fluoresceína. Los anticuerpos suplementados con uno o dos restos de fluoresceína por molécula son intensamente fluorescentes y retienen su reactividad específica durante mucho tiempo. En general, se considera una técnica altamente sensible aunque no es muy específica. En la determinación de anticuerpos contra T. gondii se considera que títulos iguales o inferiores a 1:16 no son significativos; diluciones de 1:32 y 1:64 son dudosos y a partir de ésta son significativamente positivos (2, 11,25, 28).

2.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Esta técnica se ha usado extensamente para la detección de hormonas - (30), en el diagnóstico de enfermedades tanto no infecciosas como infecciosas y es aquí donde tiene mayor aplicación. La prueba de ELISA puede ser competitiva, indirecta y de doble anticuerpo o "sandwich" (2, 11,25, 27).

El método competitivo es usado en la detección y semicuantificación de antígenos: el anticuerpo específico es adsorbido a la fase sólida, se incuba, y la muestra a probar, que su puestamente contiene el antígeno, es adicionada, se deja reaccionar y enseguida se agrega el antígeno ligado a enzima, se incuba para permitir la reacción antígeno-anticuerpo. Al adicionar el sustrato de la enzima los pozos que solamente contienen la enzima ligada al antígeno muestran coloración, debido a que la inhibición del cambio de color en pozos con muestras a probar es proporcional a la cantidad del antígeno presente en la muestra (fig. 2).

El método indirecto se puede usar en la detección y semicuantificación de anticuerpos. El antígeno específico es adsorbido a la fase sólida, se adiciona el suero a probar y a varias diluciones se incuba y se lava, se agrega una enzima ligada a una antiglobulina y se deja reaccionar, en seguida se adiciona el sustrato y se hace observación visual del color producido.

La degradación del sustrato tiene por resultado un cambio de color así la cantidad y velocidad del cambio de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo en el suero probado (fig. 3).

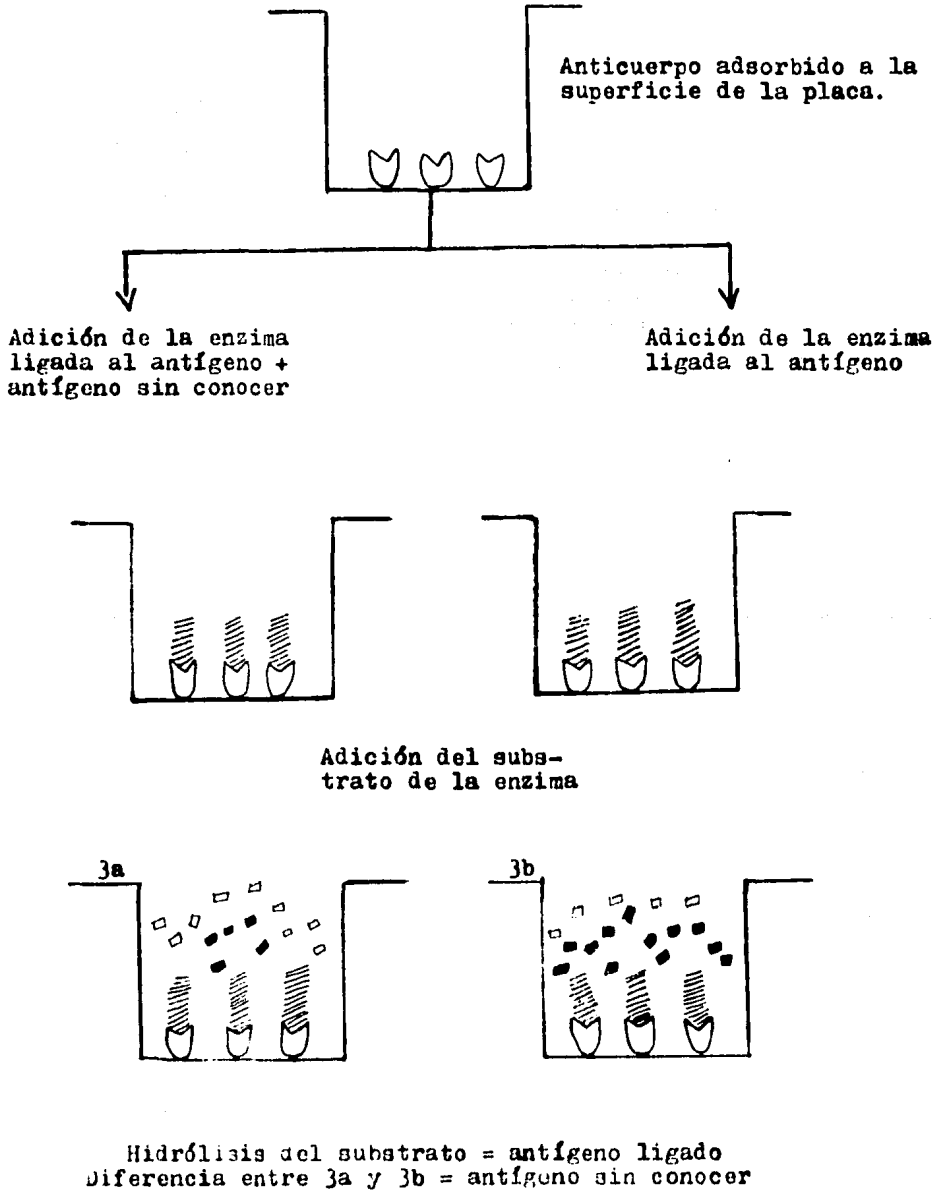
El método de doble anticuerpo o "sandwich" sirve principalmente para detectar antígenos. El anticuerpo específico es adsorbido a la fase sólida, se incuba, se lava y posteriormente se adiciona la solución a probar que se piensa contiene el antígeno, se incuba y se lava. Bajo estas condiciones, se adiciona un complejo enzima-anticuerpo (anti-antígeno), se incuba, se lava y se agrega el sustrato de la enzima, el cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno en la solución problema (fig. 4), (19, 29).

La técnica de ELISA es muy sensible y específica, pero requiere un equipo inicial bastante costoso, así como ajuste de todas las variantes que intervienen en la reacción (2).

La técnica de ELISA utilizada en éste estudio pertenece al tipo del método indirecto para medir anticuerpo y se considera que títulos menores de 30 UI/ml son francamente negativos entre 30 y 80 UI/ml dudosos, entre 100 y 200 positivos y a partir de 200 UI/ml en adelante se toman como francamente positivos. Estos grados de afectación se han clasificado en 4 grupos de la siguiente manera:

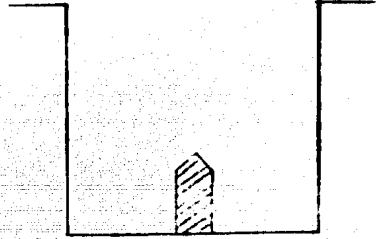
- Grupo I - menor de 30 UI/ml - francamente negativo
- Grupo II - entre 30 y 80 UI/ml - dudosos
- Grupo III - entre 100 y 200 UI/ml - positivos
- Grupo IV - mayor de 200 UI/ml - francamente positivos.

**FIGURA No. 2 METODO COMPETITIVO DE ELISA  
ENSAYO DE ANTIGENOS**

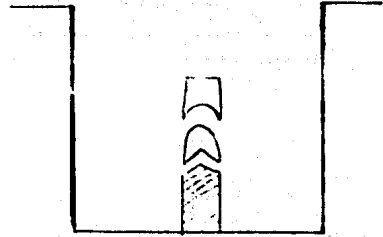


**FIGURA No. 3. METODO INDIRECTO DE ELISA PARA  
MEDIR ANTICUERPO.**

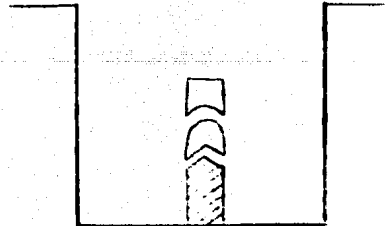
1.- Antígeno adsorbido a la placa.



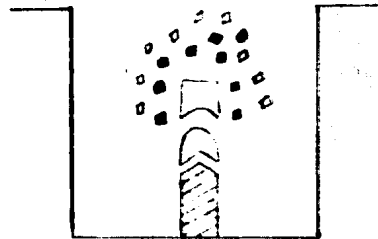
2.- Adición del suero (el anticuerpo específico se une al antígeno).



3.- Adición de la enzima ligada a la antiglobulina la cual se une al anticuerpo.



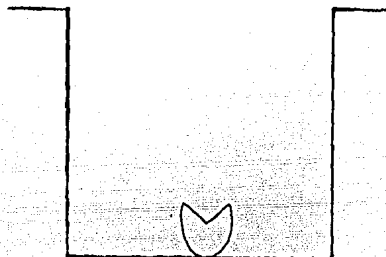
4.- Adición del sustrato.



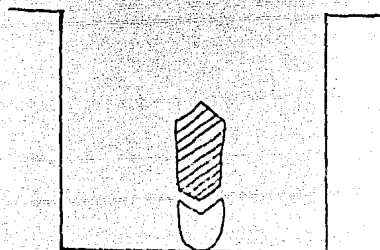
Cantidad de hidrólisis = cantidad de anticuerpo presente.

FIGURA No. 4 METODO DE DOBLE ANTICUERPO O SANDWICH DE ELISA PARA MEDIR ANTIGENO.

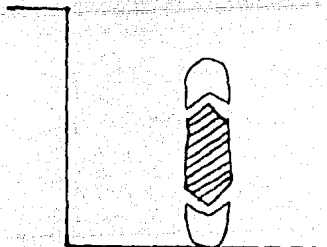
1. Anticuerpo adsorbido a la placa.



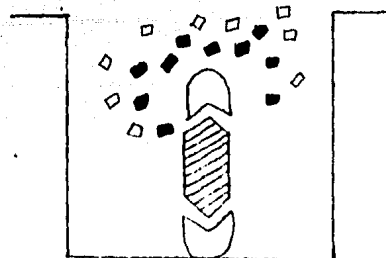
2. Adición de la solución a probar (conteniendo el antígeno).



3. Adición de la enzima ligada al anticuerpo específico.



4. Adición del sustrato a la enzima.



Cantidad de hidrólisis = cantidad de antígeno presente.

FIGURA No. 5. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA IFI  
 PARA DEMOSTRAR Ac IgM CONTRA T. gondii

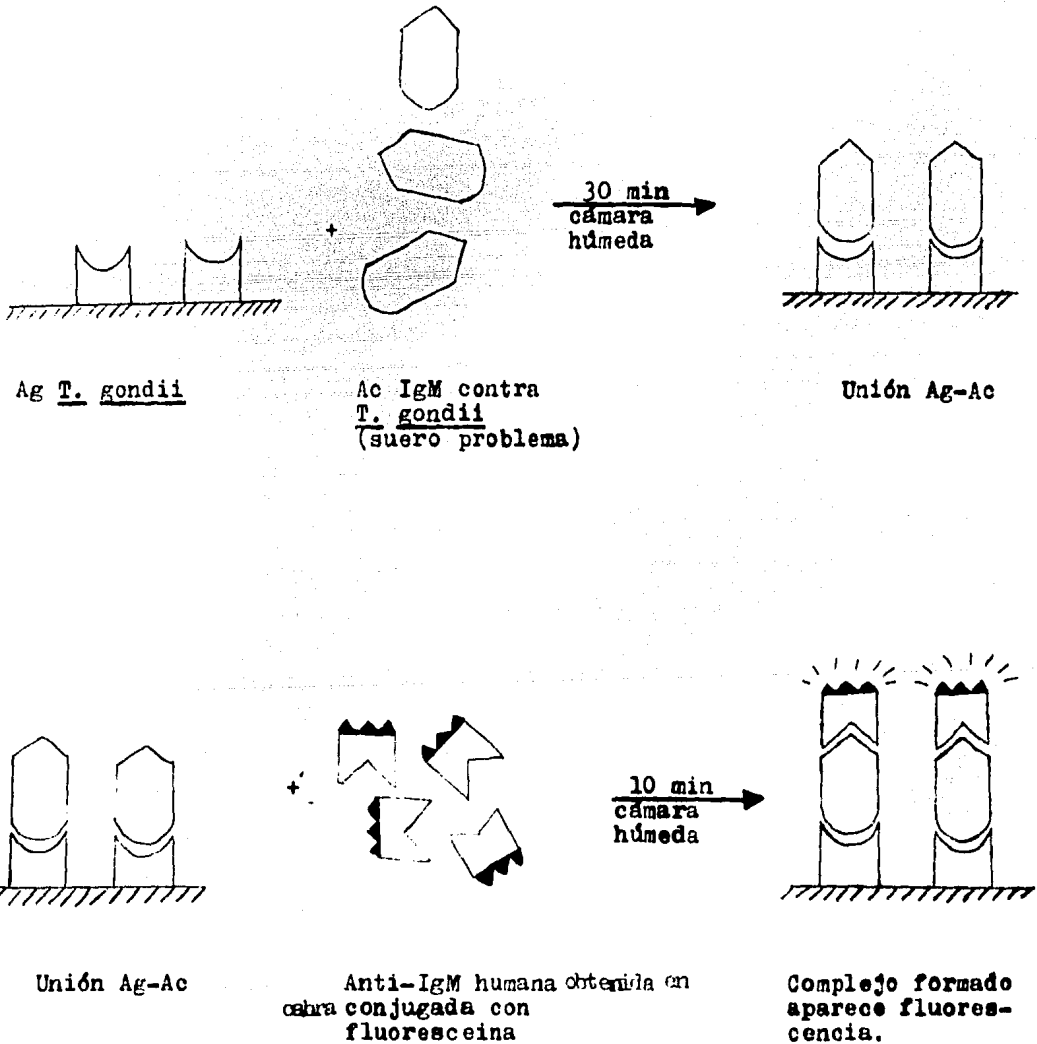
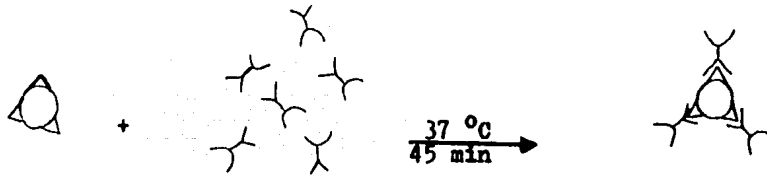


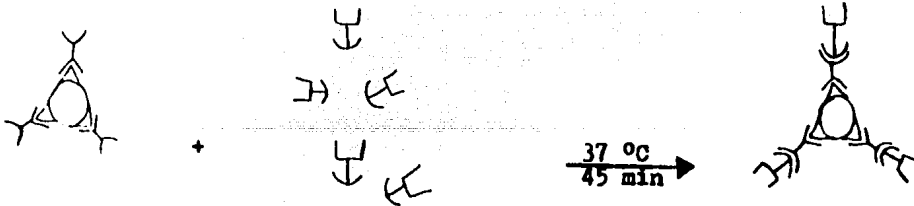
FIGURA No. 6. REPRESENTACION GRAFICA DE LA TECNICA ELISA PARA DEMOSTRAR Ac IgM CONTRA T. gondii



disco marcado con  
Ag T. gondii

Ac IgM contra  
T. gondii  
(suero problema)

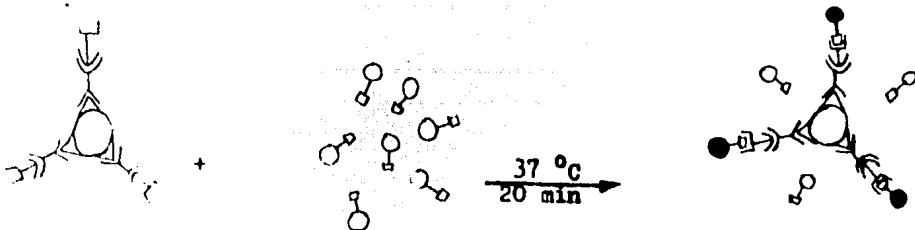
Unión Ag - Ac



Unión Ag-Ac

Anti-IgM humana  
marcada con enzima

unión Ag-Ac-Anti-  
IgM humana marca-  
da con enzima



unión Ag-Ac-Anti-  
IgM humana marca-  
da con enzima

substrato  
(p-nitrofenil  
fosfato)

reacción enzima-  
substrato. Color  
amarillo



## OBJETIVOS

Para el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos:

- Establecer las ventajas y desventajas de las técnicas de ELISA e IFI en la detección de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii, y así determinar cual es más conveniente.
  
- Determinar el título de anticuerpos IgM contra T. gondii en suero de una muestra de 50 mujeres que presentaron aborto previo involuntario por las técnicas de ELISA e IFI para establecer la frecuencia del T. gondii en dicha muestra.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente estudio se basa en el hecho de que existen - un gran número de técnicas para la determinación de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii presentando la mayoría de -- ellas diversos inconvenientes, siendo las técnicas de ELISA e IFI las que presentan mayor confiabilidad. Sin embargo, éstas también presentan ventajas y desventajas, las cuales se - aclararan en el presente estudio.

El diagnóstico serológico de la toxoplasmosis es muy importante desde muchos puntos de vista, sobre todo, el de ejercer una vigilancia en aquellas mujeres que estándo en estado fértil sean seronegativas, pues son ellas las que están ex--- puestas a sufrir una primoinfección durante el embarazo por - lo que podrían producirse abortos (caso bastante frecuente) o bien malformaciones del feto, las cuales muchas veces van a - cursar sin síntomas en el momento del nacimiento, pudiendo ma-- nifestarse éstas semanas o meses después. Por tanto es conveniente realizarse las siguientes preguntas:

- ¿ Es posible que ELISA presente ventajas sobre IFI o viseversa en el diagnóstico de la toxoplasmosis?
- ¿ Cual es la frecuencia de T. gondii en mujeres que han presen-- tado aborto previo involuntario sin causa aparente?

**HIPOTESIS**

**Hi<sub>1</sub>** Hipótesis alternativa 1. En la determinación de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii, la técnica de ELISA es más recomendable por sus ventajas que la técnica de IPI.

**Ho<sub>1</sub>** Hipótesis nula 1. En la determinación de anticuerpos IgM contra T. gondii, la técnica de IPI es más recomendable por sus ventajas que la técnica de ELISA.

**Hi<sub>2</sub>** Hipótesis alternativa 2. La frecuencia de T. gondii en mujeres que sufrieron aborto involuntario es alta.

**Ho<sub>2</sub>** Hipótesis nula 2. La frecuencia de T. gondii en mujeres que sufrieron aborto involuntario es baja.

**CARACTERISTICAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION**

El presente estudio tiene las siguientes características:

**Observacional:** Porque no modifica el fenómeno observado.

**Comparativo:** Porque se van a comparar dos técnicas de diagnóstico.

**Prospectivo:** Porque no se basa en la búsqueda de conocimientos ya establecidos.

**Transversal:** Porque es un estudio que pretende ser terminado.

**ACTIVIDADES PARA LA RECOLECCION DE DATOS****1) DELIMITACION DEL UNIVERSO**

Se trabajó con una muestra de 50 mujeres mexicanas en -- edad fértil provenientes de la Ciudad de México. Estas mujeres sufrieron aborto previo involuntario y fueron atendidas -- en el Departamento de Ginecobstetricia del Hospital General -- de México S.S. Todas las muestras se procesaron en los Labo ratorios Centrales de dicha Institución.

**2) FACTORES DE INCLUSION**

- Mujeres en edad de 15 a 49 años.
- Mujeres que acudieron al Hospital General de México S.S. con aborto involuntario a Urgencias.
- Mujeres que esten dispuestas a colaborar en el estudio.

**3) FACTORES DE NO INCLUSION**

- Mujeres menores de 15 y mayores de 49 años.
- Mujeres con abortos no recientes.
- Mujeres con aborto provocado.

**4) CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA.**

Se trabajó con una muestra seleccionada ya que de 1563 -- casos de aborto involuntario captados en el año de 1983 se to maron las primeras 50 muestras captadas a partir de agosto -- del mismo año con las características ya mencionadas.

## 5) TECNICAS

Para un estudio diagnóstico de laboratorio se realizó una Biometría Hemática (BH) como prueba de rutina para conocer el estado general de las pacientes. Se realizaron dos pruebas adicionales que fueron Factor Reumatoide (FR) y Anticuerpos - antinúcleo (ANA). Finalmente para nuestro estudio principal se realizó la determinación de anticuerpos  $IgM$  contra Toxo---plasma gondii por las técnicas de ELISA e IFI.

Se recolectó la muestra de sangre de las pacientes inmediatamente después de haber ingresado al hospital. De ésta una parte se utilizó para hacer inmediatamente la BH y con la otra parte se separó el suero, el cual se dividió en partes - alícuotas y almacenó a  $-20^{\circ}C$  hasta su utilización. No se - uso ningún tipo de conservador.

De la BH que fue la primera prueba que se realizó, los - parámetros que se tomaron en cuenta fueron: hemoglobina, hema - tocrito, leucocitos totales y cuenta diferencial de leucocitos

La BH se realizó en un Contador de partículas electróni - co "Coulter Counter" (modelo 3 plus), el cual determinó los - parámetros de hemoglobina, hematócrito y cuenta total de leu - cocitos. Para la cuenta diferencial de leucocitos se siguió la siguiente técnica:

- Se hizo una extensión de sangre bien mezclada recientemente extraída en un portaobjetos, y se dejó secar.
- Se cubrió con colorante de Wright de minuto a minuto y me - dio.
- Se añadió el doble de solución amortiguadora de fosfatos - pH 6.4 durante seis minutos.
- Se lavó al chorro de agua y se dejó secar.
- Se observó en objetivo de inmersión para hacer la diferen - ciación de la serie blanca en un total de 100 células.

Para la determinación del PR se utilizó el equipo de reactivos "Reumatex" de los laboratorios Lafón que consiste en lo siguiente:

- Placas de vidrio para aglutinación.
- Solución reguladora glicina-salina pH 8.2.
- Solución látex-globulina.
- Sueros control positivo y negativo.

Técnica: Primeramente se realizó una prueba cualitativa y sólo a los sueros que dieron resultados positivos se hizo la --- prueba semicuantitativa para determinar el título.

a) Prueba cualitativa:

- Se diluyó una gota de suero problema con 1 ml de solución reguladora glicina-salina pH 8.2 y se agitó.
- Se colocó una gota de la solución anterior en una placa de vidrio con una gota de la solución de látex-globulina (partículas de poliestireno sensibilizadas con gamma-globulina humana).
- Simultáneamente se colocaron los controles positivo y negativo con una gota de látex-globulina.
- Se osciló suavemente la placa hasta observar si aparecía - aglutinación.

b) Prueba semicuantitativa:

- En 9 tubos numerados se colocó solución reguladora glicina salina; en el tubo 1 se colocó 1.9 ml y en los restantes - 1 ml.
- Se añadió 0.1 ml de suero problema al tubo 1, se mezcló y transfirió 1 ml al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo 9. Las diluciones efectuadas fueron las siguientes:

tubo	dilución
1	1:20
2	1:40
3	1:80
4	1:160

tubo	dilución
5	1:320
6	1:640
7	1:1280
8	1:2560
9	1:5120

- Se colocó una gota de cada una de las diluciones efectuadas en la placa de vidrio y una gota del reactivo de látex globulina para cada dilución.
- Se osciló la placa hasta observar aglutinación. El título del suero correspondió a la última dilución en que se presentó aglutinación del reactivo de látex-globulina.

La determinación de ANA se realizó siguiendo la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta; para lo cual se utilizó el equipo de reactivos "FLUOGNOST ANA/AMA" del Instituto Behring que consta de lo siguiente:

- Portaobjetos recubiertos de células BHK (células renales - Hamster).
- Anti-globulina ANA conjugada con fluoresceína.
- Sueros control positivo y negativo.
- Solución salina de Tampón-fosfatos.

#### Técnica:

- Se hicieron diluciones 1:20, 1:80 y 1:320 de los sueros con solución salina de tampón fosfato, así como del suero control positivo. Del suero control negativo se hizo dilución 1:20. Cada dilución se trabajó por duplicado.
- Se aplicó sobre las áreas de reacción de las laminillas una pequeña gota de los sueros problema y de los sueros control.
- Se incubaron las preparaciones durante 1 hr en un cuarto húmedo a temperatura ambiente.
- Se enjuagaron las preparaciones con solución de tampón fosfatos y se pusieron en un recipiente con solución de fosfatos durante 10 min. Posteriormente se cambió la solución y se dejó por 5 min más.



- Se metieron las preparaciones en un recipiente con agua -- destilada durante 30 seg y entonces se sacaron para que se secaran dejandolas escurrir paradas verticalmente sobre pa pel filtro.
- Se cubrieron las zonas de reacción con una gota de anti-- globulina humana conjugada con fluoresceína y se dejaron - incubar durante 30 min en un cuarto húmedo a temperatura - ambiente.
- Se enjuagaron las preparaciones con solución de tampón fos fatos y se metieron en un recipiente por 10 min contien- do solución de tampón fosfatos, posteriormente se cambió - la solución y se dejó por 5 min. Se dejaron escurrir pa - radas verticalmente sobre papel filtro.
- Se fijaron las preparaciones con solución tamponada de gli cerina (1 parte de solución de tampón fosfatos + 9 partes de glicerina). Se evaluaron en un microscopio de fluores- cencia inmediatamente después de haberlas fijado.

Determinación de anticuerpos IgM contra T. gondii por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). El equipo - necesario para realizar esta prueba fue el proporcionado por el Instituto Behring "Test de Inmunofluorescencia de toxoplas- ma" consistente en:

- Portaobjetos toxoplasma. Son portaobjetos con areas de -- reacción que ya están cubiertos con T. gondii.
- Concentrado de tampón fosfatos. Solución salina tamponada con fosfatos pH 7.2 - 7.4.
- Anti-IgM humana de cabra, conjugada con fluoresceína, lio- filizada.
- Suero control toxoplasma, positivo. Suero humano liofili- zado.
- Suero control toxoplasma, negativo. Suero humano liofili- zado; en dilución 1:64 da un resultado negativo.
- Solución tamponada de glicerina. Consiste en una parte de solución salina de tampón fosfatos más nueve partes de gli

cerina.

**Técnica:**

- Se hicieron diluciones 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 de los sueros problemas con solución salina de tampón fosfatos, así como del suero control positivo; cada dilución se trabajó por duplicado.
- Se aplicó sobre las áreas de reacción de los portaobjetos una gota de suero problema, así como de los sueros control positivo y negativo. Se incubaron durante 30 min en cuarto húmedo a temperatura ambiente.
- Se lavó con solución salina de tampón fosfato y se dejó -- por 10 min en un recipiente con dicha solución. Poste---riormente se cambió la solución de lavado y se dejó duran---te otros 5 min. Se dejó escurrir sobre papel filtro y -- posteriormente se dejó secar al aire.
- Se cubrieron las áreas de reacción con una gota de anti---globulina humana conjugada con fluoresceína y se incubó -- por 30 min en cuarto húmedo a temperatura ambiente.
- Se lavaron y secaron las preparaciones siguiendo el proce---dimiento anteriormente citado.
- Se aplicó la solución tamponada de glicerina sobre las a---reas de reacción y se cubrieron con un cubreobjetos.
- Se observó en el microscopio de fluorescencia después de - 15 min a temperatura ambiente.
- En los que dieron reacción positiva en dilución 1:128 se - repitió la técnica con diluciones del suero de 1:128, ---- 1:256, 1:512 y 1:1024.

**Evaluación:**

**Positiva:** aparecen los toxoplasmas teñidos de rojo y presen---tan sus contornos más o menos extensos fluorescentes verde - amarillo.

**Negativa:** Toxoplasmas teñidos de rojo y no presentan fluores---cencia en sus contornos.

Determinación de anticuerpos IgM contra T. gondii por la técnica de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA). Los reactivos necesarios para realizar ésta técnica fueron -- los contenidos en el estuche de reactivos "Cordia T método -- ELISA" proporcionado por Equipos de Laboratorio para Inmuno-- diagnóstico, S.A. de C.V. que consiste de lo siguiente:

- Viales para llevar a cabo las reacciones.
- Discos de papel revestidos con antígeno T. gondii.
- Anticuerpos Anti-IgM humana marcados con fosfatasa alcalina.
- Control positivo. Plasma humano recalcificado que contiene altos títulos de anticuerpos contra T. gondii.
- Control negativo. Plasma humano recalcificado francamente negativo.
- Diluyente para muestras. Esta solución contiene 6% de albumina sérica bovina; 0.05% Tween-20 en tampón salina de fosfatos 0.01 M conservada con azida de sodio.
- P-nitrofenil fosfato (p-NPP).
- Tampón de carbonato de sodio.
- Solución de hidróxido de sodio 3 N.
- Solución salina lavadora. Solución de cloruro de sodio al 0.9% pH ajustado entre 7.2 y 8 con solución tampón tris -- 2 M.

Además se utilizó el siguiente equipo:

- Baño maría con agitación continua; apróximadamente 100 agitaciones por min.
- Sistema lavador y aspirador para efectuar los lavados.
- Pinzas para transferir los discos.
- Baño de hielo.
- Micropipetas de distintas capacidades.
- Espectrofotómetro que pueda leer a 405 nm de absorbancia - volúmenes de 0.7 ml o menos.

Técnica:

- Primeramente se prepararon las diluciones del suero con--- trol positivo para la curva estándar de la siguiente manera:
  - a) En tres tubos se pipetearon 200 mcI del diluyente para muestras.

- b) Se agregó 50 mcl del control positivo al primer tubo y se mezcló bien (tubo 1).
- c) Del tubo anterior se tomaron 50 mcl y se agregaron al - segundo tubo y se mezcló bien (tubo 2).
- d) Del tubo anterior, se tomaron 50 mcl y se colocaron en el tercer tubo, se mezcló bien (tubo 3).
- De acuerdo con lo anterior, las diluciones que se lograrón en cada tubo fueron:

tubo	dilución
1	1:5
2	1:25
3	1:125

- Una vez hechas las diluciones se montó la técnica con 10 - controles de la siguiente manera:
  - 2 viales para el control negativo
  - 2 viales para el control positivo sin diluir
  - 2 viales para el control positivo, dilución 1:5
  - 2 viales para el control positivo, dilución 1:25
  - 2 viales para el control positivo, dilución 1:125
  - y dos viales para cada muestra problema.
- Se colocaron 500 mcl del diluyente para muestras en cada - vial.
- Se colocó enseguida 10 mcl de cada muestra en cada vial con forme a lo especificado anteriormente.
- Se agitaron bien los viales y se adicionó a cada uno un disco con el antígeno T. gondii, éste debió quedar bien inmerso en los viales.
- Se incubaron los viales en baño maría por 45 min, con agitación continua a 37 ± 2°C.
- Posteriormente se retiraron los viales y se pusieron en baño de hielo a 0 °C.
- Lavado de discos. Se lavaron los discos con 2.5 ml de so-lución lavadora previo aspirado del líquido. Posterior--mente se aspiró, lavó, y aspiró cada disco 5 veces, procurando que el aspirado fuera lo más completo posible.

- Se adicionó a cada vial 500 mcl de anti-IgM humana marcada con fosfatasa alcalina.
- Se incubaron los viales en baño maría a 37 °C por 45 min - con agitación continua.
- Durante éste periodo de incubación se preparó la solución de p-NPP de la siguiente manera:
  - a) Se diluyó el bicarbonato de sodio en agua destilada.
  - b) Se transfirió el bicarbonato diluido en los viales que contenían el p-NPP y se mezcló bien. La concentración final fue de 1 mg/ml.
  - c) Se guardó en baño de hielo hasta su utilización.
- Se sacaron los viales del baño maría y se pusieron en baño de hielo.
- Se lavaron los discos nuevamente siguiendo la técnica de lavado descrita anteriormente.
- Una vez lavados, se transfirieron los discos al segundo -- juego de viales.
- A cada vial se agregó 1000 mcl del sustrato p-NPP.
- Se incubaron los viales a 37 °C por 20 min con agitación - continua.
- Se agregaron 2 gotas de hidróxido de sodio 3 N a cada vial.
- Se hizo la lectura de absorbancia a 405 nm. Primero se leyó el control negativo, posteriormente el control positivo sin diluir, enseguida, el control positivo diluido 1:5, -- 1:25 y 1:125 y finalmente los sueros problemas. La lectura de absorbancia se multiplicó por 1000.
- La curva estándar de concentración del anticuerpo IgM contra T. gondii contra D.O. a 405 nm reportó un coeficiente de correlación de 0.987. Con base a esta curva se determinó la concentración de anticuerpos IgM contra T. gondii en cada una de las muestras problema, lo cual se hizo automáticamente en una calculadora Texas Instrument Modelo 58C la cual fue programada para tal fin.

## ANALISIS ESTADISTICO

Para comparar las técnicas de ELISA e IFI para determinar Ac IgM contra Toxoplasma gondii en cuanto a sensibilidad y especificidad se empleó una tabla del tipo 2 X 2, (2).

	Técnica 2	
Técnica 1	-	+
-	a	b
+	c	d

en donde, para calcular la sensibilidad de las dos técnicas se uso la fórmula:

$$S = \frac{d}{d + b} \times 100$$

y la especificidad esta dada por la fórmula:

$$E = \frac{c}{c + a} \times 100$$

E indica la discordancia en la especificidad. La correlación de las técnicas esta dada por: (2)

$$C = \frac{a + b}{a + b + c + d} \times 100$$

De estos valores se puede deducir que títulos recogen -- las dos técnicas como negativos, los que son negativos por -- las dos y los positivos que no recogen algunas de las técnicas y sí la otra (falsos positivos) y viceversa (falsos negativos). (Resultados ver cuadro 25).

Cuadro No. 1 . Datos de la curva estándar de concentración de Ac IgM contra T. gondii -- contra D.O. a 405 nm, para la técnica de ELISA. Coef. corr. = 0.987.

controles	Absorbancia a 405 nm X 1000	Concentración de IgM contra <u>T. gondii</u> (UI/ml)
Positivo s/dil.	2857	337
Positivo dil. 1:5	1130	72
Positivo dil. 1:25	332	12.9
Positivo dil. 1:125	147	2.7

## RESULTADOS

Para el análisis de los resultados, la población de 50 -muestras se dividió en 4 grupos. Como se ve en el cuadro 2, para tal división se tomó como base el título obtenido de anticuerpos IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA

Cuadro No. 2. Distribución de muestras en grupos de acuerdo al título de Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA en sueros de pacientes con - aborto involuntario del Hosp. Gral. de la --- Sria. de Salud en 1983.

GRUPO	TITULO DE ELISA (UI/ml)	GRADO DE AFECTACION	NO. DE MUESTRAS
I	menor de 30	francamente negativo	22
II	entre 30 y 80	dudosos	9
III	entre 100 y 200	ligeramente positivo	7
IV	mayor de 200	francamente positivo	12
TOTAL			50



Cuadro No. 3. Características de la BH en pacientes con aborto involuntario del grupo I (francamente negativo a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud. 1983.

MUESTRA	HEMOGLOBINA g/100ml	HEMATOCRITO %	LEUCOCITOS TOTALES 1.0 mm <sup>3</sup>
1	12.4	39	6800
2	13.3	43	6800
3	8.9	28	9200
4	10.2	32	7700
5	10.5	33	12600
6	10.5	33	9200
7	12.4	40	6900
8	10.5	33	11500
9	11.1	35	7000
10	11.7	38	12700
11	9.7	31	7400
12	2.5	8	4600
13	11.7	33	7750
14	11.5	32	6200
15	13.8	40	13800
16	13.1	37	2000
17	14.2	40	2850
18	13.1	39	2950
19	8.4	27	7800
20	12.1	35	9300
21	12.7	40	6500
22	11.1	36	5200
media	11.19	34.18	7579
desv. estándar	2.4	7.03	1077

Cuadro No. 4 Características de la BH en pacientes con aborto involuntario del grupo II (dudoso a Ac IgM - contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud. 1983.

MUESTRA	HEMOGLOBINA g/100ml	HEMATOCRITO %	LEUCOCITOS, TOTALES 1.0 mm <sup>3</sup>
1	10.8	37	12500
2	7.3	23	6400
3	13.3	43	7400
4	9.9	31	10300
5	10.2	32	12250
6	11.5	36	13600
7	9.8	32	8100
8	12.0	36	15350
9	10.2	33	5800
media	10.56	33.6	10188
desv. estándar	1.57	5.12	3225

Cuadro No. 5. Características de la BH en pacientes con aborto involuntario del grupo III (ligeramente positivo a Ac Igm contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud. 1983.

MUESTRA	HEMOGLOBINA g/100ml	HEMATOCRITO %	LEUCOCITOS TOTALES 1.0 mm <sup>3</sup>
1	10.8	37	8100
2	10.3	36	3600
3	10.8	37	8500
4	10.8	34	10400
5	13.4	40	6800
6	8.4	27	7800
7	12.0	36	9150
media	10.9	35.28	7764
desv. estándar	1.41	3.76	1992

Cuadro No. 6 . Características de la BH en pacientes con aborto involuntario del grupo IV (francamente positivos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud 1983.

MUESTRA	HEMOGLOBINA g/100ml	HEMATOCRITO %	LEUCOCITOS TOTALES 1.0 mm <sup>3</sup>
1	10.2	32	8400
2	10.5	33	5250
3	11.5	35	8500
4	10.5	33	4800
5	10.8	37	24800
6	6.0	19	9400
7	12.7	37	10850
8	12.7	37	4250
9	15.0	43	8600
10	10.1	32	5900
11	10.8	35	10500
12	12.4	40	10500
media	11.1	34.46	7904
desv. estándar	2.05	5.61	5173

Cuadro No. 7 . Cuenta diferencial de leucocitos en pacientes con aborto involuntario del grupo I (francamente negativos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud. 1983.

MUESTRA	NEUTROFILOS %	LINFCITOS %	MONOCITOS %	EOSINOFILOS %
1	54	37	5	4
2	60	34	4	2
3	58	35	4	3
4	56	36	5	3
5	59	36	3	2
6	58	34	5	3
7	57	33	5	5
8	62	28	5	5
9	64	30	4	2
10	52	40	5	3
11	54	34	2	3
12	76	18	4	2
13	56	37	4	3
14	55	38	4	3
15	56	35	5	4
16	72	24	3	1
17	60	37	2	1
18	56	38	4	2
19	63	30	4	2
20	57	40	2	1
21	59	34	5	2
22	56	37	4	3
media	59	32	4	2.6
desv. estándar	5.55	5.10	1.0	1.1

Cuadro No. 8 . Cuenta diferencial de leucocitos en pacientes con aborto involuntario del grupo II (dudosos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de - ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud. 1983.

MUESTRA	NEUTROFILOS %	LINFOCITOS %	MONOCITOS %	EOSINOFILOS %
1	53	36	7	4
2	60	37	2	1
3	56	35	5	4
4	54	38	4	4
5	59	31	6	4
6	57	32	8	3
7	56	38	4	2
8	60	33	4	3
9	56	38	4	2
media	56.5	35	5	3
Desv. estándar	2.34	2.58	1.72	1.05

Cuadro No. 9. Cuenta diferencial de leucocitos en pacientes con aborto involuntario del grupo III (ligera-mente positivos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la --- SRIA. de Salud. 1983.

MUESTRA	NEUTROFILOS %	LINFOCITOS %	MONOCITOS %	EOSINOFILOS %
1	61	34	3	2
2	53	38	5	4
3	61	35	3	1
4	61	33	4	2
5	60	35	4	1
6	63	30	4	3
7	56	38	4	2
media	59	35	3.8	2.5
DESV. ESTANDAR	3.23	2.6	0.63	0.98

Cuadro No. 10. Cuenta diferencial de leucocitos en pacientes con aborto involuntario del grupo IV (francamente positivos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la -- Sria. de Salud. 1983.

MUESTRA	NEUTROFILOS %	LINFOCITOS %	MONOCITOS %	EOSINOFILOS %
1	60	33	4	2
2	57	38	3	2
3	58	33	5	4
4	58	34	4	4
5	59	36	3	2
6	65	26	5	4
7	63	27	6	4
8	61	36	3	0
9	59	32	5	4
10	51	44	3	2
11	69	24	5	2
12	57	38	3	2
<b>media</b>	<b>59.5</b>	<b>33.5</b>	<b>4</b>	<b>2.6</b>
<b>Dev. estándar</b>	<b>4.32</b>	<b>5.43</b>	<b>1.03</b>	<b>1.24</b>



Cuadro No. 11 . Medias de la muestra total y de las muestras positivas a Ac IgM contra *T. gondii* por las técnicas de ELISA e IPI de la ~~EM~~ en pacientes con aborto involuntario del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

MUESTRAS	$\bar{X}$ HEMOGLOBINA (g/dl)	$\bar{X}$ HEMATOCRITO (%)	$\bar{X}$ LEUCOCITOS TOTALES (en mm <sup>3</sup> )
50	10.1	34.3	5810 .7
32 (IPI +)	11.08	34.0	8668
19 (ELISA +)	11.03	34.7	7832.5
RANGO NORMAL	12 - 16	38 - 47	5000 - 10000

Cuadro No. 12 . Este cuadro muestra los valores medios de la cuenta diferencial de leucocitos tanto para la muestra total como para las muestras positivas a Ac. IgM contra T. gondii según las técnicas de ELISA e IFI en pacientes con aborto involuntario del Hosp. Gral. de la Sria. - de Salud en 1983.

MUESTRA	$\bar{X}$ NEUTROFILOS %	$\bar{X}$ LINFOCITOS %	$\bar{X}$ MONOCITOS %	$\bar{X}$ EOSINOFILOS %
50	58.8	34	4	3.4
32 (IFI +)	58	34	4	3.4
19 (ELISA +)	59.5	33.8	4	2.4
RANGO NORMAL	50 - 70	24 - 38	4 - 9	2 - 4

Cuadro No. 13 . Título de FR y ANA en suero de pacientes con aborto involuntario del grupo I (francamente negativo a Ac Igm contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

MUESTRA	FACTOR REUMATOIDE	ANTICUERPOS ANTINUCLEO
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	1:40	-
9	1:40	-
10	-	-
11	-	-
12	1:40	-
13	-	-
14	1:40	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-

Cuadro No. 14. Títulos de FR y ANA en suero de pacientes con aborto involuntario del grupo II (dudoso a Ac IgK contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

MUESTRA	FACTOR REUMATOIDE	ANTICUERPOS ANTINUCLEO
1	-	-
2	-	-
3	1:40	-
4	1:80	-
5	-	-
6	1:40	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-

Cuadro No. 15. Títulos de FR y ANA en sueros de pacientes con aborto involuntario del grupo III (ligeramente positivos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de salud en 1983.

MUESTRA	FACTOR REUMATOIDE	ANTICUERPOS ANTINUCLEO
1	1:80	-
2	1:80	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-

Cuadro No. 16 Títulos de FR y ANA en suero de pacientes con aborto involuntario del grupo IV (francamente positivos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

MUESTRA	FACTOR REUMATOIDE	ANTICUERPOS ANTINUCLEO
1	1:80	-
2	-	-
3	1:80	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-

Cuadro No. 17 . Este cuadro muestra la relación que hay entre títulos positivos y negativos de PR con los títulos positivos de Ac IgM contra T. gondii por las técnicas de ELISA e IFI en pacientes con aborto involuntario del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

# MUESTRAS	NEGATIVO	POSITIVO			
		1:20	1:40	1:80	1:160
50	39 78%	--	6 12%	5 10%	--
32 (IFI +)	25 78%	--	2 6%	5 15.15%	--
19 (ELISA +)	15 79%	--	--	4 21%	--

Cuadro No. 18 . Este cuadro muestra la relación que hay entre títulos positivos y negativos de ANA con los títulos positivos de Ac IgM contra T. gondii por las técnicas de ELISA e IFI en pacientes con aborto involuntario del Hosp. Gral de la Sria. de Salud en 1983.

# MUESTRAS	NEGATIVO	POSITIVO	
		1:20	1:80
50	50 100%	--	--

Cuadro No. 19. Títulos de Ac IgM contra T. gondii por las técnicas de ELISA e IFI en sueros de pacientes con aborto involuntario del grupo I (francamente negativo a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

MUESTRA	ELISA (UI/ml)	IFI
1	7.0	1:32
2	2.7	-
3	29.0	1:64
4	23.0	1:32
5	7.0	1:16
6	7.0	1:32
7	27.0	1:64
8	4.5	1:16
9	10.0	1:32
10	13.0	1:64
11	19.0	1:64
12	2.6	1:16
13	6.1	1:32
14	5.8	1:16
15	4.5	1:32
16	2.4	1:16
17	12.0	1:16
18	12.0	1:32
19	12.0	1:32
20	9.0	1:16
21	19.0	1:64
22	27.0	1:32



Cuadro No. 20. Títulos de Ac IgM contra T. gondii por las técnicas de ELISA e IFI en sueros de pacientes con aborto involuntario del grupo II (dudosos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) - del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

MUESTRA	ELISA (UI/ml)	IFI
1	32	1:64
2	30	1:32
3	58	1:64
4	58	1:64
5	70	1:128
6	56	1:128
7	58	1:64
8	46	1:64
9	80	1:64

Cuadro No. 21. Títulos de Ac IgM contra T. gondii por las técnicas de ELISA e IFI en súeros de pacientes con aborto involuntario del grupo III (ligeramente positivos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la Sria. de Salud en 1983.

MUESTRA	ELISA (UI/ml)	IFI
1	130	1:64
2	200	1:128
3	130	1:128
4	140	1:64
5	140	1:128
6	130	1:256
7	140	1:128

Cuadro No. 22. Títulos de Ac IgM contra T. gondii por las técnicas de ELISA e IFI en sueros de pacientes -- con aborto involuntario del grupo IV (francamente positivos a Ac IgM contra T. gondii por la técnica de ELISA) del Hosp. Gral. de la --- Sria. de Salud en 1983.

MUESTRA	ELISA (UI/ml)	IFI
1	300	1:1024
2	430	1:512
3	200	1:512
4	200	1:128
5	480	1:128
6	200	1:128
7	540	1:1024
8	520	1:512
9	200	1:512
10	220	1:1024
11	265	1:512
12	200	1:512

Figura No. 7. Histograma que muestra la distribución de muestras de acuerdo al título obtenido de Ac IgM - contra T. gondii por la técnica de IFI en suero de pacientes con aborto involuntario del Hosp. Gral. de la Sría de Salud. 1983.

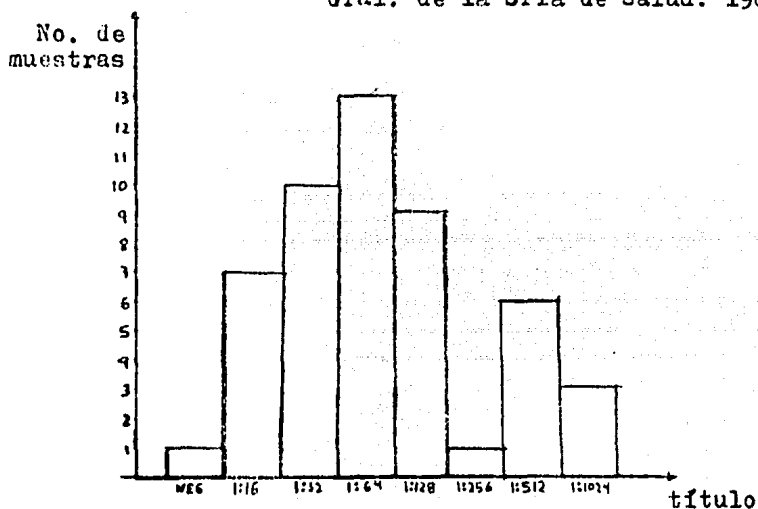
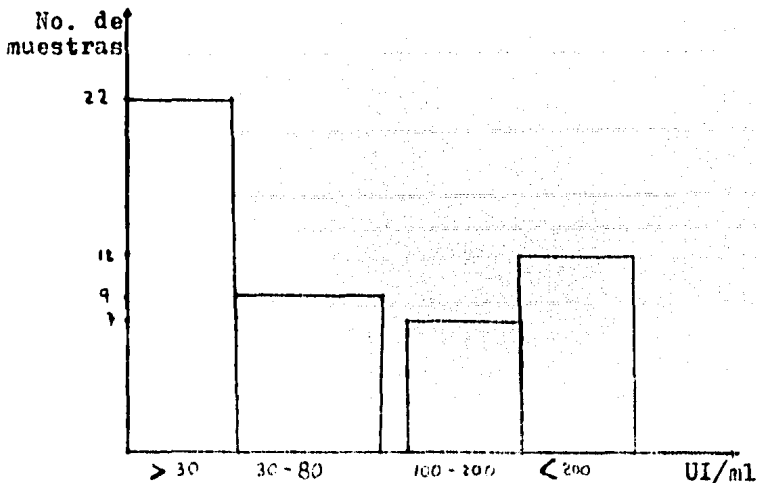


Figura No. 8. Histograma que muestra la distribución de muestras de acuerdo al título obtenido de Ac IgM - contra T. gondii por la técnica de ELISA en suero de pacientes con aborto involuntario del Hosp. Gral. de la Sría de Salud. 1983.



Cuadro No. 25. Comparación de las técnicas de ELISA e IFI en la detección de Ac IgM contra T. gondii en pacientes con aborto involuntario del Hosp. -- Gral. de la Sria. de Salud. 1983.

TECNICA	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %	CORRELACION %	FALSOS (+) %	FALSOS (-) %
ELISA	59	100	74	0	26
IFI	100	58.5	74	26	0

## ANALISIS DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos en la Biometría hemática se obtuvo un valor medio para la muestra total y uno para las -- muestras positivas a Ac IgM contra Toxoplasma gondii según -- las técnicas de ELISA e IFI, y al comparar éstos valores con respecto a los valores normales se pudo observar que en lo -- que respecta a hemoglobina y hematocrito, están muy por debajo de los valores normales. Cabe mencionar que ésta prueba se realizó para conocer el estado general de las pacientes; y con base a lo anteriormente mencionado se puede afirmar que -- el estado presentado por las pacientes no era el óptimo. -- (Ver cuadro 11).

Con respecto a la cuenta total y diferencial de leucocitos, no muestran ninguna anormalidad, ya que los valores medios obtenidos caen dentro de los normales. (Ver cuadros 11 y 12).

De factor reumatoide y anticuerpos antinúcleo cabe mencionar que se hizo su determinación debido a que cuando éstos están presentes en el suero se producen resultados falsos positivos en la determinación de anticuerpos IgM contra T. gondii por técnicas como ELISA e IFI. (17).

De FR fueron 11 los sueros con títulos positivos, de los cuales sólo 7 fueron positivos a anticuerpos IgM contra T. gondii por la técnica de IFI y 4 por la técnica de ELISA lo -- que representa un 21.8% y 21% respectivamente de los sueros -- en los que se pudieron haber presentado falsos positivos por la presencia en el suero de FR. (Ver cuadro 17).

Sin embargo, según el análisis estadístico, en la determinación de anticuerpos IgM contra T. gondii, la técnica de ELISA no presentó ningún falso positivo, en cambio en la técnica de IFI se presentó un 26% de los sueros con falsos positivos, de ahí que se podría descartar la posibilidad de que en la técnica de ELISA se hayan presentado resultados falsos positivos por la presencia en el suero de FR. (Ver cuadro - 25).

Con respecto a ANA, no es posible establecer la existencia de resultados falsos positivos en alguna de las dos técnicas, ya que no se presentó ningún suero positivo a ANA. (Ver cuadro 18).

Al comparar estadísticamente las técnicas de ELISA e IFI en la determinación de anticuerpos IgM contra T. gondii, tenemos que ELISA es mucho más específica que IFI pero menos sensible, de ahí que ELISA no presente resultados falsos positivos pero si falsos negativos, IFI por su falta de especificidad presenta falsos positivos, mismos que pueden haber sido causados por la presencia de FR. (Ver cuadro 25).

La correlación de ambas técnicas es del 74% el cual representa un porcentaje alto, si se toma como base un estudio semejante hecho en España ( 2 ) en donde la correlación de las técnicas fue del 92%.

Las dos técnicas son muy sencillas de realizar, y en cuanto a tiempo, IFI es más rápida de realizar que ELISA, empleando un tiempo promedio de 2 hr. y 3 hr. respectivamente en montar las técnicas. El equipo inicial de ELISA es mucho más costoso que el de IFI, pero una vez contando con todo éste equipo, el costo de las dos técnicas es aproximadamente igual.

Con base a lo anteriormente citado, se considera que con fines de un buen diagnóstico, la técnica de ELISA es más ventajosa que la técnica de IFI en la determinación de Ac IgM -- contra T. gondii, por lo que se puede establecer que la hipótesis alternativa 1 se cumplió.

La frecuencia de Ac IgM contra T. gondii en la muestra de 50 pacientes con aborto involuntario según la técnica de ELISA es del 38% y según la técnica de IFI es del 64%. Si se considera el valor reportado por la técnica de ELISA por ser ésta más específica, se puede decir que un 38% implica un porcentaje alto en la muestra, tomando como referencia un estudio hecho en México el cual reportó que de 300 mujeres puerperas más del 50% presentan anticuerpos anti-T. gondii (11); y otro realizado en España en donde de 95 mujeres gestantes el 47.05% reportó cifras significativas de Ac IgM contra T. gondii (2). Por lo tanto la hipótesis alternativa 2 se cumplió.



## CONCLUSIONES

Se han estudiado 50 sueros en total, correspondientes a mujeres que presentaron aborto involuntario y fueron atendidas en el Hospital General de la Secretaría de Salud obteniéndose títulos significativos de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii en un 38% de la muestra por la técnica de ELISA y un 64% por la técnica de IFI, lo que representa una frecuencia alta de toxoplasmosis en las mujeres estudiadas por lo que es conveniente éste diagnóstico como posible causa frecuente de aborto.

De las dos técnicas estudiadas para determinar anticuerpos IgM contra T. gondii se comprueba que ELISA es más específica pero menos sensible que IFI presentando ambas un 74% de correlación en sus resultados.

En la técnica de ELISA no se presentó ningún falso positivo, en cambio en la técnica de IFI se presentaron un 26% de falsos positivos de los cuales el 53% pueden haber sido debidos a la presencia de FR en el suero. Como no se presentaron títulos positivos de ANA, puede ser que no existe la posibilidad de falsos positivos en ninguna de las dos técnicas por su causa.

Aunque las dos técnicas pueden ser aconsejables en laboratorios de rutina por su sencillez, la técnica de ELISA es más tardada que la de IFI, además que requiere un equipo inicial bastante costoso.

En definitiva, se considera que aquellos laboratorios que deseen iniciarse en el diagnóstico de la toxoplasmosis tomen en cuenta alguna de éstas dos técnicas ya que ofrecen un al-

to porcentaje de confiabilidad, sin embargo, si requieren un alto grado de especificidad tomen la técnica de ELISA como única. O bien, si se cuenta con los medios adecuados y el número de muestras a analizar es alto tomen las dos técnicas para obtener diagnósticos aún más fiables.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Calderon R. J., Toxoplasmosis. Infectología., México 1978 pp 1 - 13.
- 2.- Concuera M., Lozano J., Ruiz-Falco L. F., Estudio comparativo de las distintas técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la toxoplasmosis., Revista de Sanidad e Higiene Pública., España 1981., Vol. 55., pp 1045 - 1059.
- 3.- Davidsohn I., Henry J. B., Diagnóstico Clínico por el Laboratorio., Ed. Salvat., 6a. edición., México 1979, pag. 1484.
- 4.- Desmonts G., Toxoplasmosis, Epidemiologic and Serologic - aspects of perinatal infection on infections of the fetus and the newborn infants., Ed. Alan R., New York 1975, pag 115.
- 5.- Elmer B. M., Elementos de probabilidad y estadística., Ed. Reverte Mexicana S.A., 1972., pag. 367.
- 6.- Erwin Kreyszig., Introducción a la estadística matemática Ed. Limusa., 4a. edición, México 1978, pag. 505.
- 7.- Faust E. C., Farr R. F., Parasitología Clínica, Ed. Salvat., México 1981, pp 229 - 235.
- 8.- Fayer R., Toxoplasmosis Update and Public Health Implications., J. Can. vet. November 1981., vol. 22, pp 344 - 352.
- 9.- Fougereau M., Dausset J., Immunology 80., Academic Press., Vol. 2., pp 272 - 275.
- 10.- Franco E., Walls K., Sulzer A., Reverse enzyme immunoassay for detection of specific anti-Toxoplasma Immunoglobulin M antibodies., J. Clin. Microb., May 1981, vol. 13, No. 5, - pp 859 - 864.

- 11.- Frenkel J., Ruiz A., Toxoplasmosis humana., Acta Médica - Costarricense., San José de Costa Rica 1973, vol. 16, No. 1, pp 7 - 25.
- 12.- González A. G., Frecuencia de anticuerpos antitoxoplasma positivos en mujeres puerperas normales en el Hospital de Ginec Obstetricia 3-A., México, 1984.
- 13.- Gordon M., Duncan R., Kingsley L., Automated Immunofluorescence Test for Toxoplasmosis., J. Clin. Microb., Feb. 1981 vol. 13, No. 2, pp 283 - 285.
- 14.- Greo R., Piacentino R., Toxoplasmosis and pregnancy., Rev. Obstetrics and Gynecology., Excerpta médica., vol. 43, No. 8, 1983, pag. 370.
- 15.- Hugh H., Stites D., Cadwel J., Wells V., Inmunología Clínica., Ed. El Manual Moderno., 2a. edición, México 1978, pp 378, 412 - 415.
- 16.- Kumate J., Antibióticos y Quimioterápicos., Ed. Fco. M. - O., México 1981.
- 17.- Naot Y., Barnet M., Method for avoiding false-positive results occurring in Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assay due to presence of both Rheumatoid Factor and Antinuclear Antibodies., J. Clin. Microb., July 1981 vol. 14, No. 1, pp 73 - 78.
- 18.- Naot Y., Remington., An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii: Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis., J. Infect. Dis., Nov. 1980, vol. 142, No. 5, pp 757 - 766.
- 19.- Oellerich M., Enzyme Immunoassays in Clinical Chemistry., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1980, vol. 18, pp 197 - 208.

- 20.- Pyndiah N., Krech U., Wilhelm J., Simplified Chromatographic separation of Immunoglobulin M from G and its application to toxoplasma Indirect Immunofluorescence., *J. Clin. Microb.*, Feb. 1979, vol. 9, No. 2, pp 170 - 174.
- 21.- Roch E., Compendio de toxoplasmosis., México 1971., Ed. Patria S.A., pag. 145.
- 22.- Roch E., Toxoplasmosis, control de enfermedades transmisibles., 2a. edición, México 1975, pp 416 - 423.
- 23.- Roitt I., Essential Immunology., Blackwell Scientific Publications, 3a. edición, pp 206 - 209.
- 24.- Ruitenberg E., The enzyme-Linked Immunosorbent Assay and its application to parasitic infections., *J. Infect. Dis.* vol. 136, No. 1, 1977, pp 267 - 273.
- 25.- Sánchez G., Lanzón L., Gómez Calatayud, Castillo S., Aportaciones al estudio de la toxoplasmosis., Cátedra de -- Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina de Zaragoza. México 1972, pp 7 - 53.
- 26.- Soulsby, E. J. L., Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals., 7a. edición, Academic Press, USA 1982.
- 27.- Violand S., Mitchell T., Kleeman K., Comparison of an Enzyme-Linked Immunoassay and Quantitative Indirect Fluorescent-Antibody Test with the conventional Indirect Fluorescent-Antibody Test for detecting antibodies to Toxoplasma gondii., *J. Clin. Microb.*, Aug. 1982, vol. 16, No. 2, pp 341 - 344.
- 28.- Voller A., Bartlett A., Biowell D., Enzyme Immunoassay - with special reference to ELISA Techniques., *J. Clin. Pathol.*, vol. 3, 1978, pp 507 - 520.

- 29.- Voller A., Bartlett A., Biowel D., The enzyme Linked -- Immunosorbent assay (ELISA)., Editorial Flowlins Publications., 1977, pp 3 - 45.
- 30.- Weemen V., Schuurs A., Immunosorbent using antigen enzyme conjugates., FEBS Lett, vol. 15, 1971, pp 232 - 236.
- 31.- Woodward B., Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific for human Immunoglobulin G as a --- screening test for detecting Anti-toxoplasma antibodies., J. Clin. Microb., Aug. 1982, vol. 16, No. 2, pp 367-372.