



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

131
2ej

FACULTAD DE QUIMICA

TOXOPLASMOSIS: ANTIGENOS Y PRUEBAS
DE DIAGNOSTICO.

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION:

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

JUAN RUIZ SANCHEZ

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990.



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

CAPITULOS	Págs
I.- OBJETIVOS	1
II.-INTRODUCCION	2
TOXOPLASMOSIS	
1.- Descripción cronológica de los principales acontecimientos y descubrimientos relacionados con la toxoplasmosis.	2
III. ESTRUCTURA ANTIGENICA DE TOXOPLASMA GONDII.	7
1.- Reproducción de <i>Toxoplasma gondii</i> en cultivos de tejidos.	7
2.- <i>Toxoplasma gondii</i> : Purificación de trofozoítos propagados en cultivos celulares.	10
2.1. Utilización de lectina en el proceso de purificación de - tacuizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	11
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> : Ultraestructura y antigenicidad de la membrana externa del ta-cuizoíto purificado.	12
2.3. Cambio antigénico de los ta-cuizoítos de toxoplasma en - cultivo celular.	13
3.- Estudios ultraestructurales en la esporulación de ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> .	14
4.- Investigación de la estructura antigénica de ----- <i>Toxoplasma gondii</i> .	18
4.1. Contribución hacia el análisis antigénico de ----- <i>Toxoplasma gondii</i> .	20
4.2. Identificación de los componentes antigénicos de ----- <i>Toxoplasma gondii</i> por medio de técnica inmunomanchante.	21
4.3. Detección y caracterización de los antígenos de membrana de <i>Toxoplasma gondii</i> .	21

	Pégs
4.4. Análisis del peso molecular de antígenos solubles de <i>Toxoplasma gondii</i> .	22
4.5. Análisis del peso molecular de los principales polio péptidos y glicopéptidos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	24
5.- La mayor proteína superficial de <i>Toxoplasma gondii</i> (n30) contiene una región inmunodominante.	24
6.- Diferencias antigénicas entre endozoítos y cuistozoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	25
IV.- PRUEBAS PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA TOXOPLASMA GONDII.	27
1.- Estudio comparativo de pruebas (Sabin-Feldman, hemaglutinación indirecta, aglutinación de látex, inmunoelectroforesis indirecta, y ELISA de doble sandwich para la detección de anticuerpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> .	27
1.2. Ensayo de enzima ligado a un inmunoabsorbente para la detección de anticuerpos IgG contra <i>Toxoplasma gondii</i> y su comparación con otras pruebas serológicas.	32
1.3. Ensayo de enzima ligado a un inmunoabsorbente para la detección de anticuerpos IgM contra <i>Toxoplasma gondii</i> el cual no es afectado por el factor reumatoide.	33
1.4. Separación cromatográfica simplificada de IgM de IgG y su aplicación a la inmunoelectroforesis indirecta contra <i>Toxoplasma gondii</i> .	37
1.5. Comparación de métodos para la cuantificación de anticuerpos IgM específicos a antígeno con un ensayo invertido de enzima ligado a inmunoabsorbente.	38

	Página
1.6. Uso de anticuerpos monoclonales en ELISA y ELISA de doble sandwich para la detección de anticuerpos IgM - contra la proteína superficial mayor (p30) de ----- Toxoplasma gondii.	39
1.7. Un ensayo de enzima ligado a un inmunoadsorbente para - la detección de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii su uso para el diagnóstico de la toxoplasmosis adquirida aguda.	43
V.- DETECCIÓN DE ANTIGENOS Y PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE - TOXOPLASMOYOSIS.	46
1.- Uso de anticuerpos monoclonales para la detección de - antígenos de Toxoplasma gondii en suero y otros fluidos del cuerpo.	46
2.- Reconocimiento de diferentes antígenos de toxoplasma - por medio de anticuerpos IgM e IgG en madres y sus recién nacidos infectados congénitamente.	47
VI.- INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL.	58
1.- Actividad de los leucocitos sanguíneos humanos contra Toxoplasma gondii.	58
VII. CONCLUSIONES.	68
VIII. BIBLIOGRAFIA.	71

CAPITULO I

I.- OBJETIVOS

Uno de los objetivos de este trabajo, es informar acerca de los principales acontecimientos relacionados con la toxoplasmosis, dado la importancia de las enfermedades causadas por el Toxoplasma gondii. Así, como también hablar sobre la estructura antigénica de este parásito, cuando se reproducen en cultivos de tejidos, utilizando para ello diferentes métodos para la identificación de sus componentes antigénicos.

Se hablará sobre las diferencias antigénicas que existen entre estas estructuras. Se describirán las diferentes pruebas que existen para detectar los anticuerpos contra Toxoplasma gondii, utilizando anticuerpos monoclonales en diferentes ensayos para la detección de dichos anticuerpos, y para la detección de antígenos solubles del parásito.

Se detallará sobre la preparación de antígenos de Toxoplasma gondii, y su uso en serología diagnóstica. Serán evaluadas diferentes pruebas para el diagnóstico de toxoplasmosis. Se mencionarán algunas dificultades en el diagnóstico serológico de Toxoplasma gondii. También se darán a conocer cuales pruebas de las aquí mencionadas, tienen mayor aceptación para la identificación de padecimientos causados por Toxoplasma gondii.

Otros de los principales objetivos de este trabajo, es conocer como actúan los linfocitos y los macrófagos en el sistema inmune, estimulando la respuesta humoral y celular, al ser transportados estas defensas por medio de la sangre.

CAPITULO II

II.- INTRODUCCION

TOXOPLASMOSIS

1.- DESCRIPCION CRONOLOGICA DE LOS PRINCIPALES ACONTECIMIENTOS Y DESCUBRIMIENTOS RELACIONADOS CON LA TOXOPLASMOSIS.

La secuencia de acontecimientos que han permitido llegar a los conocimientos que actualmente contamos sobre esta enfermedad, comenzaron hace algunos años cuando Nicolle y Manceaux en el año 1908, - encontraron en un pequeño roedor del norte de África conocido con el nombre de Ctenodactylus zondii, un diminuto microorganismo de forma arqueada, con dos a cuatro micras de ancho por cinco a siete micras de largo, con un extremo más redondeado que el otro y marcada refringencia microscópica. Estos autores le llamaron el parásito Toxoplasma zondii, tomando en cuenta su forma (toxos en griego significa arco) y el nombre científico del roedor en el que fue descubierto.

Simultáneamente Splendore en Brasil, describe este mismo parásito en conejos con una enfermedad muy parecida al Kala-azar, dándole el nombre de Toxoplasma cuniculi. Según señala Remington, Samuel T. Darling, un patólogo y parasitólogo de Panamá, publica en 1908 - la descripción de un caso con síndrome febril, cefaleas y rigidez musculoesquelética, encontrando en estudios microscópicos realizados por él, quistes de protozoarios a los que identificó como sarcosporidias.

Chavez Carballo, opina que la descripción de Darling resulta - la primera comunicación sobre los síntomas clínicos de esta enfermedad en el hombre, y Keen y Grocott sustentan la probabilidad de que los microorganismos descritos por Darling, fuesen en realidad toxoplasmas.

En el año 1913, Carini, describió la infección toxoplásmica en el perro, y éste constituyó el primer señalamiento en la literatura, sobre el toxoplasma como agente productor de enfermedad en los animales. Diez años más tarde, Janku en Checoslovaquia, describe un pequeño microorganismo intracocular, en la retina del ojo de un niño al parecer fallecido de toxoplasmosis congénita; los parásitos descritos por Janku, tenían una gran similitud citomorfológica con el Toxoplasma gondii. (figura 1).

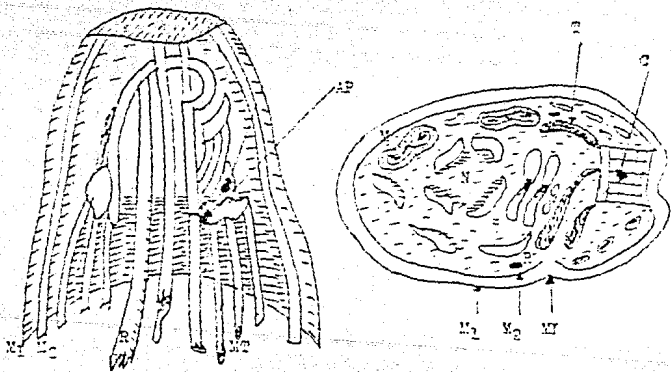


Figura 1.

Abreviaturas: M= mitocondria, N= núcleo, R= retículo endoplásmico, M_1 = membrana externa, M_2 = membrana interna, - MI= micróplio (invaginación), C= conoide, T= Taxonemas, XT= Tubillos submembranosos, AP= Anillos polares.

En el año 1939, se verifica un hecho trascendental en la sucesión de acontecimientos que llevan a señalar a este protozoario, como el agente etiopatogénico de la toxoplasmosis en el hombre. Efectivamente en este año Wolf, Owen y Paige, aislan en un niño con encefalitis neonatal, una cepa virulenta de toxoplasma, mediante la técnica de pasas seriadas en ratón; éste resultó ser la primera referencia en la literatura médica, señalando al Toxoplasma como agente causal de esta enfermedad en el hombre, con comprobación posterior al aislar el parásito por métodos biológicos. En el año 1943, se produce un acontecimiento de relevancia manifiesta en lo que se refiere a los conocimientos sobre serología y epidemiología, de esta entidad nosológica

En este año, Albert B. Satin y Harry A. Feldman, publican el descubrimiento de una prueba sérica de gran especificidad, para diagnosticar esta enfermedad y medir la intensidad de la actividad inmunitaria en suero humano y animal. El fundamento de esta técnica, gira en torno a una observación ingeniosa de ambos investigadores; efectivamente, como lo señala el propio Feldman, en ocasión de realizar algunos experimentos no planificados pudieron observar que al adicionar una gota de azul de metileno en solución acuosa amortiguada a una suspensión de toxoplasmas vivos, estos se coloreaban intensamente en azul, pero si previamente se mezclaban los toxoplasmas con sueros reactivos, éstos se mantenían incoloros.

Este hallazgo fue interpretado en el sentido de que los anticuerpos de los sueros reactivos, que actúan como agentes bloqueadores, se adherían a la superficie del parásito, y no permitían el paso del colorante a su interior. A punto de partida de esta observación, surge la prueba que ha pasado a la poste

ridad con el nombre de dye-test - Sabin y Feldman, la que a pesar de haber transcurrido 28 años desde su publicación y a pesar del enorme desarrollo técnico de estos últimos 17 años, no ha perdido vigencia y no solamente esto, sino que también se utiliza junto con determinaciones tan modernas, como las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, comprobando la exactitud de las titulaciones de las mismas.

También en el año 1948, Praenkel publica la elaboración de un antígeno, a punto de partida de líquido ascítico de ratones previamente inoculados con una cepa virulenta de toxoplasmas; a este antígeno se le dió el nombre de toxoplasmina, y con el se puede realizar una prueba intradérmica de alergia retardada similar al Mantoux. A esta determinación se le denominó skin-test o prueba intradérmica de Praenkel; esta ha perdido vigencia en la actualidad por sus frecuentes falsos resultados positivos y negativos, por lo que debe ser utilizada solamente en encuestas de epidemias y siempre con ciertas reservas.

Posteriormente al dye-test, se publican otras técnicas séricas, entre las que destacan: la prueba de fijación de complemento, introducida por Nicolau y Revelo, el test de hemaglutinación pasiva de Lurie y Jacobs y la prueba del látex sensibilizado de Garin y Desnègues. Ninguna de estas determinaciones ha logrado superar en especificidad, sensibilidad o reproducibilidad al dye-test, excepto, como es natural, de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, introducida por Kelen y Goldman, las que se han difundido rápidamente por su gran valor práctico y por su poco riesgo. La técnica de inmunofluorescencia indirecta tiene un fundamento sencillo que responde a los principios siguientes: los distintos anticuerpos antitoxoplásmicos presentes en el suero de personas portadoras, al ser inyectados al

conejo actúan como estímulo antigénico, determinando en estos la formación de antiglobulinas humanas; en un segundo paso estas se conjugan con una sustancia fluorescente (isotiocianato de fluoresceína). Esta antiglobulina humana conjugada, al ponerse en contacto con los complejos antígeno-anticuerpo, se fijan a los mismos liberando la fluoresceína, que fácilmente se detecta con los microscopios de luz ultravioleta.

La técnica de inmunofluorescencia tiene la ventaja de que se trabaja con toxoplasmas muertos, lo que permite tener la seguridad de la no existencia de accidentes o veces fatales, en el personal técnico que las realiza (55).

CAPITULO III

III.- ESTRUCTURA ANTIGENICA DE TOXOPLASMA GONDII.

1.- REPRODUCCION DE TOXOPLASMA GONDII EN CULTIVOS DE TEJIDOS.

En la reproducción de Toxoplasma gondii en cultivo primario de tejidos de embrión de pollo y en una línea continua de células Vero, se infiere la conveniencia de este sistema para el estudio del parásito desde diversos aspectos. La multiplicación de este agente infeccioso se lleva a cabo en un alto grado de sincronización, utilizando un tiempo de 4 a 7 horas. Las células parasitadas se lisan entre 16 y 48 horas después de infectadas, dejando salir al exterior abundante número de toxoplasmas que inician un nuevo ciclo de reproducción. En ciertos casos uno de los experimentos se mantienen cultivos celulares sin inocular, que se extraen en un cubreobjeto, se fijan y se tiñen al igual que las células infectadas. En todos los casos los cultivos son exuberantes y cubren toda la superficie del cubreobjeto con una capa monocelular.

Los elementos celulares como núcleo, nucleolo y citoplasma se observan con nitidez. En ningún caso se presenta degeneración celular inespecífica, cuando menos en los intervalos de tiempo que duran los experimentos, o sea, un tiempo máximo de 72 horas. Cuando se reproduce Toxoplasma gondii en células cultivadas de embrión de pollo, los parásitos se caracterizan por tener forma de luna en cuarto creciente, es decir, cuerno "elgado".

Por el contrario las formas extracelulares se caracterizan por ser globosas y tener los extremos en punta romo. Debido a que los toxoplasmas pueden estar dentro o fuera de las células de la extensa capa monocelular, únicamente se consideran como intracelulares los que presentan una zona clara alrededor del

parásito y que, según el criterio de diversos autores, corresponden a la vacuola parasitófora. A las tres horas 9% de los parásitos que habían penetrado se encontraban en la segunda generación (es decir, primera duplicación). A las 24 horas las formas extracelulares disminuyeron apreciablemente encontrándose - que el 8% de las células parasitadas contenían un sólo parásito el 50% contenía dos, el 28% contenía cuatro, el 4% contenía ocho y el 10% diez y seis. En este tiempo después de la inoculación, aún no se apreciaron células lisadas como consecuencia de la abundante reproducción intracelular de toxoplasmas. A las 48 horas las formas extracelulares se encontraron en forma abundante, así como las células en proceso de lisis, se nota la dispersión de parásitos a partir de células rotas con marcado número de parásitos alrededor del núcleo.

Nuevamente las formas extracelulares toman la forma de luna en cuarto creciente. De las células parasitadas a las 48 horas 21% tenían 16 parásitos y 17% tenían 32 o más parásitos. La proporción de células con un sólo parásito aumentó a 35% a las 48 horas. Lo anterior se interpretó como si los tripanocitos salieron de las células infectadas rotas e iniciaron una nueva invasión a células que habían escapado al primer ataque.

A las 72 horas el proceso infeccioso había destruido casi todas las células y se notaron abundantes formas extracelulares, hasta mil por campo bajo microscopio, sin embargo aún quedaron algunas células con toxoplasmas intracelulares, obteniéndose la impresión de que las invasiones y los ciclos de reproducción continuaron hasta afectar todas las células del cultivo quedando núcleos vacuolizados picnóticos y sin restos de citoplasma como remanentes.

Cuando la reproducción de Toxoplasma gondii se lleva a cabo en células Vero, se toman muestras a menores intervalos de tiempo después de efectuada la inoculación de los cultivos celulares. El inóculo en este caso fue mucho más concentrado que el experimento anterior. Únicamente se percibió 0.5% de los parásitos en el interior de la vacuola, el 99.5% restante aunque estaba dentro de la limitación de las células, no presentó vacuola parasitífera. A los 20 minutos no se apreció modificación alguna sobre los datos encontrados en el período de 10 minutos. A los 30 minutos el número de parásitos intracelulares aumentó a 21%. Lo anterior permitió suponer que la penetración y la formación de la vacuola parasitífera ocurrió entre los 20 y 30 minutos de efectuada la inoculación.

A los 45 minutos, 38% de los parásitos presentaron una clara vacuola parasitífera. Los parásitos continuaron en forma de células solitarias. El resto, o sea, 62% de los parásitos no estuvieron dentro de la vacuola, lo que se interpreta que estaban sobre las células sin haber penetrado. A los 60 minutos, 42% de los parásitos observados presentaron vacuola parasitífera. A los 90 minutos, 50% de los parásitos observados presentaron vacuola parasitífera. A los 120 minutos, 55% de los parásitos presentaron vacuola parasitífera.

Todos los parásitos considerados como intracelulares estaban aún solitarios; y a partir de las 3 horas, se observaron además de los parásitos solitarios, pares de parásitos, indicando que la penetración se estaba iniciando. Por lo que en este tiempo después de efectuada la inoculación, 89% eran parásitos solitarios y 11% en forma de pares. A las 6 horas, 84% de los parásitos aún eran solitarios, 14% eran pares, y 2% conjunto de

cuatro parásitos. A las 9 horas, disminuyó a 72% el número de parásitos solitarios, 21% se presentaron por pares y continuó bajo el número de grupos de cuatro parásitos. A las 12 horas, hubo una baja muy apreciable del porcentaje (50%) de parásitos solitarios y un aumento considerable (31%) de vacuolas con pares. La primera duplicación estaba en su máxima expresión y la segunda duplicación se hizo manifiesta. Para esto se utilizan los cultivos mencionados (65).

2.- TOXOPLASMA GONDII: PURIFICACION DE TROFOZOITOS PROPAGADOS EN CULTIVOS CELULARES.

Se han reportado algunas técnicas para aislar trofozoitos de fluidos peritoneales de ratones, pero no son adaptables para la reproducción de grandes cantidades de parásitos propagados en cultivos celulares, necesarios para el análisis inmunológico. Se ha reportado el aislamiento de trofozoitos de cultivos celulares, por medio de un método de filtración, pero cuando se realizó no funcionó, debido a que los papeles del filtrado se tornan bastante y muy fácilmente.

Se realizó otro procedimiento de filtración para aislar trofozoitos de la cepa RH de Toxoplasma gondii cultivados, que incluyen la centrifugación diferencial del filtrado para concentrar a los trofozoitos y eliminar cualquier medio o material soluble o partícula de la célula huésped. Los organismos purificados se utilizan como fuente de antígeno para inmunodiagnóstico, para investigaciones de metabolismo extracelular y para estudios de la factibilidad del desarrollo de una vacuna.

Este nuevo procedimiento es para la purificación de trofozoitos de la cepa RH virulenta de Toxoplasma gondii, propagada en cultivos celulares de riñón de crías de Hamster (BHK 21). El medio de cultivo que contiene restos celulares del huésped y

los trofozoitos, se filtró a través de una fibra de filtración - de lana de vidrio que eliminó a la mayor parte del material celular del huésped. El filtrado que contenía trofozoitos fue centrifugado, y el acúmulo de trofozoitos se resuspendió y lavó en buffer salino de fosfato.

Se recuperó un promedio de alrededor del 75% del número original de trofozoitos. No se observó la pérdida de la visibilidad del trofozoito como se determinó por medio del promedio de destrucción de la monocapa del cultivo celular del huésped. Fue insignificante la cantidad de material celular del huésped contaminado en la fracción trofozoital, después de una cofiltración con material celular del huésped no infectado que fue premarcado con precursores radioactivos (9).

2.1.- UTILIZACION DE LECTINA EN EL PROCESO DE PURIFICACION DE TROFOZOITOS DE TOXOPLASMA GONDII.

La eliminación de las células del huésped, es esencial para preparar suspensiones puras de trofozoitos de toxoplasma de eritrocitos peritoneales de ratones infectados. La membrana del trofozoito parece no tener sitios de unión a la lectina, de acuerdo a lo investigado con la concavalina A, aglutinina de germen de trigo y aglutinina de soya. Se ha observado la falta de aglutinación de las suspensiones de toxoplasma con lectinas como concavalina A, aglutininas de lenteja y fitohemaglutinina.

En contraste a los parásitos que permanecieron en suspensiones, las células huésped y los restos celulares fueron fácilmente aglutinados formando grandes grupos. Se obtuvieron los mejores resultados con la fitohemaglutinina a una concentración de 0.01 por ciento (peso/volumen), que proporcionó una pureza en la suspensión de toxoplasma de 99.74.

El procedimiento fue reproducible y fácil para realizar, los toxoplasma así obtenidos fueron infectivos y sirvieron como fuente de antígenos de alta calidad para las pruebas de inmunofluorescencia, hemaglutinación y fijación de complemento(28).

2.2.- TOXOPLASMA GONDII: ULTRAESTRUCTURA Y ANTIGENICIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA DEL TAQUIZOITO PURIFICADO.

La microscopía electrónica indica que los taquizoitos de Toxoplasma gondii, contienen tres membranas periféricas visibles. Dos membranas dispuestas estrechamente, surgen en el anillo polar anterior y terminan en el anillo posterior. La tercera membrana rodea al organismo entero y es considerada análoga a la membrana celular típica. Varias manipulaciones han demostrado, en su caso, que ésta envoltura externa se comporta como una membrana unitaria de tres capas. La purificación del erudado nutricional se ratón por sacudimiento con partículas de vidrio, lisarán las células blanco del húsmed, pero no a los parásitos, éstos se lisarán sólo si son suspendidos en agua destilada durante una noche, no se han encontrado sitios de unión a la lectina sobre la superficie externa.

Recientemente el tratamiento con hemolisina, ha mostrado que, mientras las células blanco del húsmed son lisadas la membrana externa del Toxoplasma gondii permanece intacta y el parásito continúa siendo viable. Los estudios de inmunofluorescencia mostraron que hay una deposición de anticuerpo antitoxoplásmico marcado con ferritina sobre la superficie de la película externa de este modo la película parece hincharse y romperse durante la reacción antígeno-anticuerpo. Se postuló que el material antigénico encontrado en la superficie de Toxoplasma gondii, se origina en el citoplasma. Cuando se ha purificado trofozoitos de

Toxoplasma gondii, se procede a tratarlos con hemolisina, DNase y RNasa, los organismos producen un sistema de tres componentes que contienen la membrana externa (película), microtúbulos y conoide en una configuración morfológica relativamente normal. Se favoreció el tratamiento de esta preparación con proteasa que digirió todo, pero la película aparentemente fue más colapsada.

Estas dos preparaciones se usaron en experimentos de marcaje con ferritina, antitoxoplasma de conejo y anticonejo de cabra. El sistema de tres componentes mostró marcaje de ferritina en el conoide, e igual marcaje de ferritina en la superficie externa e interna de la película. Los microtúbulos no fueron marcados. Después del tratamiento con proteasa, la película se marcó igualmente en su superficie externa e interna, lo que indicó que el suero antitoxoplásmico de conejo, contenía anticuerpos contra antígenos de la superficie externa e interna de la película (50)

2.3.- CAMBIO ANTIGENICO DE LOS QUISTOZOITOS DE TOXOPLASMA EN CULTIVO CELULAR.

Fue de interés determinar si los antígenos del quistozoito persistieron o no sobre la superficie de los organismos derivados de cultivos tisulares infectados con quistozoitos. Se infectaron células de músculo esquelético embrionario de bovino en cultivo con quistozoitos derivados de los quistes de la cepa ME 49 de toxoplasma, separados de cerebro de ratón por centrifugación.

Los quistozoitos fueron obtenidos por digestión con pepsina-HCl. Se adicionaron aproximadamente 100×10^3 quistozoitos a cada uno de los cultivos tisulares e incubados a 37°C con CO_2 al 5%. A los tres días los cultivos mostraron efecto citotóxico, lisis celular e hinchamiento y después fueron examinados.

Se observaron quistozoítos viables. Las células fueron removidas mecánicamente y centrifugadas y lavadas con PBS a pH de 7.2. Las porciones de los quistozoítos sedimentados fueron colocados en áreas circunscritas en micropreparaciones. A los endozoítos (taquizoítos) de toxoplasma obtenidos de células de músculo esquelético de embrión de bovino, fueron también adicionados a preparaciones similares.

Los quistozoítos fueron secados al aire y fijados brevemente en metanol absoluto. Entonces fue adicionado a las preparaciones antisuero de conejo marcado con fluoresceína contra endozoítos o quistozoítos. Las preparaciones fueron lavadas y examinadas por inmunofluorescencia. Los toxoplasmas derivados de cultivos tisulares infectados con quistozoítos o con endozoítos reaccionaron idénticamente con los antisueros marcados con fluoresceína.

Todos los organismos reaccionaron positivamente con el anticuerpo antiendozoíto. Parece por lo tanto, que sólo unas cuantas generaciones de parásitos (se estiman que siete) en células cultivadas, resultan en la pérdida de los determinantes superficiales específicos de los quistozoítos.

El hecho de que ocurra esta transformación sugiere que probablemente, esto toma lugar en la primera división de los quistozoítos en las células cultivadas, debido a las primeras membranas que son formadas en el proceso de división (70).

3.- ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES EN LA ESPORULACION DE OOCISTES DE TOXOPLASMA CONDII.

a).- DESARROLLO DEL CIGOTENO Y FORMACION DE LOS ESPOROBLASTOS.

Quando los oocistos de Toxoplasma gondii son desprendidos en las defecaciones del gato, estos no son esporulados, sino que durante la esporulación son formados dos esporocistos, cada uno de los cuales contiene cuatro esporozoitos. Estos oocistos y trazoitos son similares a los del género Isospora.

Se examinaron los estadios iniciales de la esporulación en oocistos de Toxoplasma gondii, en muestras esporuladas. El citeno inicial es rugosamente esférico y limitado por una sola membrana. Unas cuantas microsporas de tipo inactivo estuvieron presentes en la membrana. El citoplasma contenía un gran núcleo, un cleolo, gránulos de polisacáridos, glóbulos lipídicos, mitocondrias y aparato de golgi, conjuntamente con unos cuantos filamentos de retículo endoplásmico rugoso.

Fue notado muy poco cambio después de iniciada la esporulación en el citoplasma, excepto por un incremento en la síntesis protéica, como lo evidenció el aumento de la cantidad de retículo endoplásmico rugoso y la aparición de polirribosomas. La división nuclear ocurrió dos veces dando origen a cuatro núcleos que estuvieron situados cerca de la periferia celular y separados unos de otros.

En este estadio multinuclear fue formada una segunda membrana limitante. Entonces la masa citoplásmica fue dividida para formar los esporoblastos. Esto fue acompañado de una invaginación de las membranas limitantes en combinación con las membranas internamente formadas. Los dos esporoblastos binucleares fueron rugosamente esféricos. Los cuales fueron limitados por dos membranas unidas y contenían los mismos organelos ci-

tolámicos como se describió antes. (13).

b).- FORMACION DEL ESPOROQUISTE Y ESTRUCTURA DE LA PARED ESPOROQUISTICA.

Los cambios ultraestructurales observados durante la formación del esporoquiste y la estructura de la pared esporoquistica fueron examinados en los oquistes a quienes se les permitió esporular. Así como el esporoblasto esférico, que se desarrolló en el esporoquiste, la masa citoplásmica llegó a ser de forma elipsoidal, aunque no se notó cambio alguno de los organelos, que consistieron en dos núcleos, más un número de gránulos de polisacáridos, gránulos lipídicos, mitocondrias, aparato de golgi y un poco de retículo endoplásmico rugoso.

La pared esporoquistica, consistió de una capa externa delgada (15 a 20 nm), que fue formada de las dos membranas limitantes del esporoblasto y una capa interna (40 a 50 nm), que comprendió las cuatro placas curvas, esta capa interna fue formada bajo la capa externa. Cada una de las placas tenía un abultamiento marginal y una franja interpuesta de material que está presente entre los márgenes de las placas adyacentes.

Las placas están unidas a la franja interpuesta, por medio de una banda delgada de material osmiofílico. En cortes oblicuos y tangencial a través de las placas, fueron observados dos tipos de bandeos de cruce, el cual se diferenció en periodicidad. (19).

c).- FORMACION DE LOS ESPOROZOITOS DENTRO DE LOS ESPOROQUISTES.

La formación del esporozoito fue estudiada en oquistes a quienes se les permitió esporular. El proceso se inició dentro de los esporoquistes que tenían una pared totalmente formada. Se situó un núcleo en cada extremo del organismo. Dos nucleos den

sas que consistieron en dos unidades de membrana estrechamente -
apiladas con microtúbulos subyacentes se observaron cerca de mem-
brana limitante en la vecindad de cada núcleo. En este estadio -
los núcleos tuvieron huso nuclear localizado excéntricamente en
los polos de los cuales se dirigían a las placas.

La formación del esporozoíto continuó con un crecimiento -
posterior de las placas acompañado de una invaginación de la mem-
brana limitante. Dos esporozoítos son formados en cada extremo -
del esporoquiste. Cuando esto ocurre, los aparatos de golgi orga-
nismos activos y son formadas numerosas membranas y vacuolas. Cada
uno de los esporozoítos encierra un número de estas vacuolas, -
probablemente precursoras de roprios y micromemas; los primeros
son estructuras en forma de palo, electrón-densas, localizadas -
en el extremo anterior de los endozoítos, quistozoítos y merozoí-
tos; los segundos son estructuras cordiformes, pequeñas electrón
densas, localizadas cerca del conoide y después de la división -
final se encierra también un núcleo.

El crecimiento posterior de las placas continúa hasta que -
la formación de esporozoítos esté terminada. Así el esporoquiste
maduro contiene cuatro esporozoítos y una masa citoplásmica re-
sidual. Cada esporozoíto contiene unos cuantos gránulos de poli-
sacáridos además de los organelos previamente mencionados, pero
faltan los cuerpos refráctiles o cristaloides. (20).

4.- INVESTIGACION DE LA ESTRUCTURA ANTIGENICA DE TOXOPLASMA GONDII.

Pocos investigadores se han enfocado al estudio de la estructura antigénica de Toxoplasma gondii. La fragmentación mecánica ha sido el método primordial para la preparación de antígenos solubles de Toxoplasma gondii, para usarlos en el serodiagnóstico. Los tres métodos más comúnmente utilizados en las preparaciones de antígeno usados en la prueba de hemaglutinación indirecta y en la prueba de fijación del complemento son: la lisis hipotónica de parásitos en agua, el ultrasonido o las preparaciones por congelado/descongelado.

Las tres preparaciones dan tres picos antigénicos (4, 5 y 6) los cuales se muestran en la figura 3, a quienes se les detectó por inmunoelectroforesis cruzada. El antígeno 5, ha demostrado ser el más estable al calor (56°C/h) y parece ser el antígeno principal de la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA).

Se encontró que la saponina y el octil glucósido son los detergentes más efectivos para la solubilización cuando se usan en combinación, produciendo entre 7 y 11 antígenos. Utilizando una nueva técnica de triple tinción, se ha caracterizado el antígeno 3 como una glicoproteína; el antígeno 7 como un lipopolisacárido y los antígenos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 11 que se muestran en la figura 3, como proteínas.

Se ha llevado a cabo por filtración en gel, la determinación del peso molecular y la mayoría de los antígenos tuvieron un peso molecular de 10^5 a 1.5×10^5 daltones. La inmunoelectroforesis cruzada, demostró que todos los antígenos son isoelectrícos a pH ácido. Los descubrimientos en esta investigación preli-

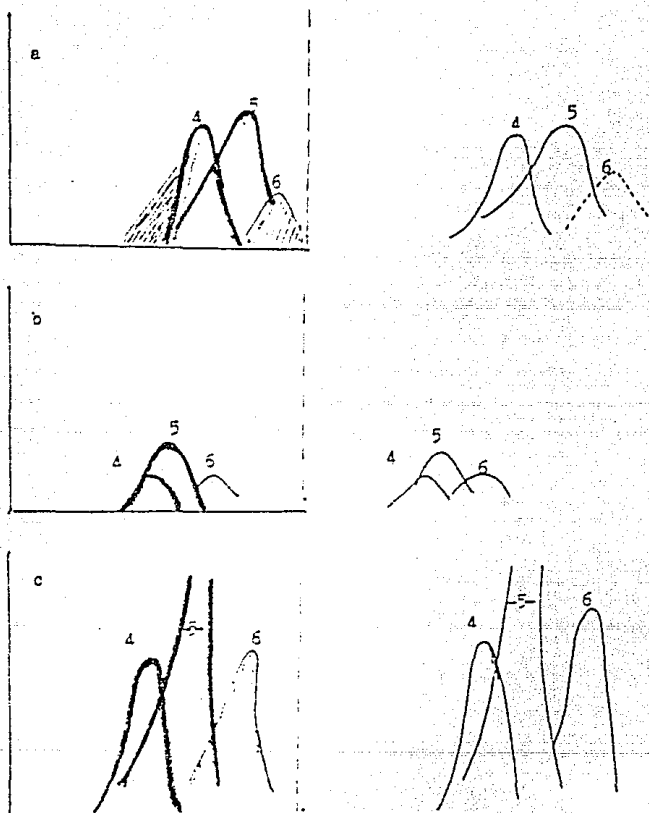


Figura 3. a) Inmunoelectroforesis cruzada del parásito lisado en agua. b) Congelado-descongelado. c) Trofozoito solubilizado con saponina. El mismo modelo básico fue observado en las tres preparaciones.

minar en base a la estructura antigénica de Toxoplasma gondii, se discuten en relación el trabajo futuro y al desarrollo racional de las pruebas serodiagnósticas (43).

4.1.- CONTRIBUCION HACIA EL ANALISIS ANTIGENICO DE TOXOPLASMA GONDII.

Toxoplasma gondii existe en tres formas; el trofozoito, quiste y oocisto. Los trofozoitos son crecéntricos o de forma oval con un extremo puntiagudo y tienen de 4 a 3 micrómetros de largo y 2 a 4 micrómetros de ancho. Están constituidos de una pared celular y una membrana interna que limita a los elementos subcelulares.

Cuando la pared celular es destruida, muchos componentes antigénicos diferentes son liberados. Se describe el examen de cuatro preparaciones de antígenos diferentes, por medio de una inmunoelectroforesis cruzada (IEF) para determinar cual método de preparación expuso el mayor número de componentes antigénicos.

Indudablemente el tratamiento con nitrógeno líquido del antígeno PTH₂ (antígeno congelado/descongelado), fue muy efectivo en el rompimiento de la membrana celular y probablemente esto contó para el gran número de picos de precipitación. Los resultados obtenidos mostraron que contienen muchas proteínas diferentes, a pesar de que los puntos isoelectrónicos fueron extremadamente estrechos.

Algunas de las bandas proteicas llegaron a estar opacas, sólo cuando el antígeno corrió sobre un rango de pH bajo de 4 a 6.5. El método PTH₂ de preparación de antígeno, causó mayor rompimiento de trofozoitos que los otros métodos, probablemente de-

bido a los cambios extremos de temperatura. Con los métodos de congelado/descongelado a -20°C las membranas externas de los trofozoítos son todavía identificables por microscopía después del tratamiento; con el método PM_2 se desintegran y no son identificables.

4.2.- IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES ANTIGENICOS DE TOXOPLASMA GONDII POR MEDIO DE TECNICA INMUNOMANCHAANTE.

Las proteínas de Toxoplasma gondii, se separan por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida/sulfato dodecílico de sodio con la transferencia subsecuente de manchas electroforéticas a una lámina de nitrocelulosa. Se detectó a los polipéptidos inmunológicamente reactivos por los sueros humanos con niveles de anticuerpos de toxoplasma previamente conocidos.

Se utilizó la cadena pesada específica de inmunoglobulina antihumana de conjugado de peroxidasa como el indicador de anticuerpos para la identificación separada de los polipéptidos reactivos de IgG e IgM. Los anticuerpos IgG toxoplásmicos reaccionó con varios antígenos de peso molecular de 27 000 y 67 000 daltones, mientras que el IgM específico de toxoplasma pareció detectar sólo unos cuantos polipéptidos.

Fue observado el peso molecular de un antígeno de 35 000 daltones para la dominación del polipéptido reactivo del IgM.

4.3.- DETECCION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTIGENOS DE MEMBRANA DE TOXOPLASMA GONDII.

Los trofozoítos de Toxoplasma gondii, fueron radioyionizados superficialmente por la técnica de la lactoperoxidasa, y las proteínas de membrana solubilizadas fueron analizadas por medio de la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida.

Se detectaron cuatro proteínas mayores, marcadas con un peso molecular aparente de 43 000, 35 000, 27 000 y 14 000 daltones. Nueve de las proteínas radioyodizadas se unieron a la concanavalina A-Sefarosa.

Cuando se utilizó un grupo de ocho lectinas diferentes, - conjugadas con fluoresceína en un intento para caracterizar más allá de la naturaleza de la membrana celular; nueve de las lectinas se unieron a los taquizoítos intactos. La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida no reveló ninguna diferencia significativa entre las tres cepas diferentes de toxoplasma.

Cada una de las proteínas superficiales radioyodizadas fue precipitable por medio de sueros de ratones infectados crónicamente con la misma cepa, así como por una serie de sueros de ratones infectados con otras cepas. Los sueros de humanos con infección aguda de toxoplasmosis mostraron mayor variabilidad en quienes precipitaron todas las proteínas marcadas, mientras que los otros precipitaron sólo dos o tres de ellas.

Los anticuerpos monoclonales de clones 2G11 y 3E6 (IgG) - preparados por hibridación de células de bazo con células de mieloma de ratón inmune a toxoplasma, precipitaron consistentemente ambas proteínas solubilizadas de 35 000 y 14 000 daltones mientras que el clon 1E3 precipitó a la proteína de 43 000 daltones y el clon 1E11 precipitó a la proteína de 27 000 daltones - (15).

4.1.- ANALISIS DEL PESO MOLECULAR DE ANTIGENOS SOLUBLES DE TOXOPLASMA GONDII.

Hardman et. al. marcó radioactivamente taquizoitos intactos de Toxoplasma gondii y los inmunoprecipitó con antisuero humano y murino para caracterizar los antígenos de membrana del parásito. Johnson fraccionó taquizoitos en una fracción soluble e insoluble y por comparación con células hospederas estableció controles del peso molecular de la mayoría de los polipéptidos y glicopéptidos en las fracciones. Los taquizoitos de Toxoplasma gondii ultrasonificados (cepa RH) se separaron en una fracción soluble en agua y la otra en desoxicolato.

El suero policlonal inmune de ratón, fue preparado por exposición de ratones crónicamente infectados con taquizoitos viables de la cepa RH de Toxoplasma gondii. Las fracciones del parásito fueron marcadas con I^{125} , y los antígenos marcados radioactivamente fueron precipitados por medio del suero de ratón inmune o un anticuerpo monoclonal antitoxoplasma (FMC 20), que es un híbrido, el cual secreta anticuerpos monoclonales de sub-clase IgG_1 , que reacciona solamente con los antígenos solubles de toxoplasma en la prueba de hemaglutinación indirecta.

La electroforesis en gel de poliacrilamida/sulfato dodecílico de sodio y la auto-radiografía de los inmunoprecipitados mostraron que la fracción soluble en agua contenía diez polipéptidos antigénicos, y la fracción soluble en desoxicolato contenía siete péptidos antigénicos. El FMC 20 que como se mencionó antes, es un híbrido que secreta anticuerpos monoclonales, los cuales reaccionan con los antígenos solubles de toxoplasma solamente en la prueba de hemaglutinación indirecta; reaccionó contra un antígeno de peso molecular 28 000 daltones que estuvo presente sólo en la fracción soluble en agua.

4.5.- ANALISIS DEL PESO MOLECULAR DE LOS PRINCIPALES POLIPÉPTIDOS Y GLICOPEPTIDOS DE TOXOPLASMA GONDII.

Se preparó por centrifugación una fracción soluble y una insoluble de taquizoítos ultrasonificados de la cepa RH de Toxoplasma gondii. La fracción insoluble del parásito fue solubilizada por incubación en desoxicolato de sodio al 1%. Se determinaron los pesos moleculares de los polipéptidos de las fracciones, por medio de la electroforesis en gel de poli-acrilamida/sulfato dodecílico de sodio.

Después de la configuración con los pesos moleculares de los polipéptidos de controles apropiados, la fracción soluble de toxoplasma contenía por lo menos nueve polipéptidos del parásito con pesos moleculares de 20K, 22K, 23K, 26K, 56K, 69K, 90K, 98K, y 113K y la fracción insoluble del parásito contenía por lo menos ocho polipéptidos derivados de toxoplasma, con pesos moleculares de 28K, 41K, 43K, 49K, 53K, 61K, 70K y 90K.

Se detectó la presencia de glicopéptidos glicosilados por medio de incubación de geles cortados con concavalina A (Con A) - (I^{125}). La fracción soluble de toxoplasma, no contenía grandes cantidades del glicopéptido, mientras la fracción insoluble del parásito contenía por lo menos 3 polipéptidos de 29K, 53K y 113K (5).

5.- LA MAYOR PROTEÍNA SUPERFICIAL DE TOXOPLASMA GONDII (p30) CONTIENE UNA REGIÓN INMUNODOMINANTE.

Se produjeron cuatro anticuerpos monoclonales (mAb), dos de la clase IGM_1 y los dos de la clase IGG_{2b} , contra los antígenos superficiales de los taquizoítos de Toxoplasma gondii. La inmunoprecipitación de extractos de taquizoítos marcados con I^{125} , identificó al mismo polipéptido con un peso molecular de 30 000 (p30). Un ensayo de competencia de sitios de unión, indicó que -

fue reconocida una región única de p30 con todos los cuatro anticuerpos monoclonales (mAb). Además se encontró que el anticuerpo monoclonal único mAb, inhibió del 25% al 50% de la unión específica de los anticuerpos de pacientes con toxoplasmosis al extracto antigénico de taquizoítos.

Parece ser que el p30, es el constituyente más inmunogénico de los taquizoítos y que una región única de esta molécula, contiene la mayor parte de la actividad inmunogénica. Finalmente un ensayo inmunoradiométrico con el mismo anticuerpo monoclonal, indicó que la molécula de p30 es multivalente con respecto a la expresión de un sitio único (15).

6.- DIFERENCIAS ANTIGÉNICAS ENTRE ENDOZOÍTOS Y QUISTOZOÍTOS DE TOXOPLASMA GONDII.

Las diferencias entre quistozoítos (bradizoítos) y endozoítos (taquizoítos) de Toxoplasma gondii, fueron registradas por Dubey y Fraenkel, quienes señalaron la tinción de muchos gránulos con ácido peryódico de Schiff (PAS), así como la presencia de núcleos subterminales en los quistozoítos. Claro, los quistes teñidos con PAS sobresalen notablemente en las preparaciones histológicas.

El quistozoíto es también más pequeño y más delgado. También se encontró que los endozoítos son destruidos inmediatamente con jugo gástrico artificial (pepsina-HCl), mientras que los quistozoítos son liberados muy rápidamente del quiste por digestión péptica, los cuales sobreviven arriba de tres horas en el fluido de la digestión. Los diferentes efectos notables de la pepsina-HCl en las dos formas del parásito, indican diferencias en su superficie, aunque las diferencias anatómicas no son dicitadas en las micrografías electrónicas. Los anticuerpos contra el

quistozoito reaccionan sólo contra el quistozoito, mientras que los antisueros contra el endozoito, reaccionan tanto con el endozoito como con el quistozoito. La absorción de los sueros con endozoitos eliminó sólo las reacciones positivas con endozoito. Estos descubrimientos son los primeros que muestran diferencias antigénicas entre estas dos formas de toxoplasma (71).

CAPITULO IV

IV.- PRUEBAS PARA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA TOXOPLASMA GONDII.

1.- ESTUDIO COMPARATIVO DE PRUEBAS (PRUEBA DE COLOR, PRUEBA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA, PRUEBA DE AGLUTINACION EN LATEX, PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA Y ELISA DE DOBLE SANDWICH PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA TOXOPLASMA GONDII.

El método de preferencia en el serodiagnóstico de infecciones debidas a Toxoplasma gondii, todavía es la prueba de color - (DT) de Sabin-Feliman (1943), que ha sufrido muchas modificaciones subsiguientes y ahora es llevada a cabo en placas de microtubo y los resultados pueden leerse directamente utilizando un microscopio invertido. La necesidad de utilizar parásitos y suero humano apropiado como un recurso de factor accesorio, limita severamente la disponibilidad del (DT) y ha guiado a investigar continuamente para una prueba alternativa que es igualmente efectiva pero menos exacta.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta ha sido evaluada extensamente y es satisfactoria en comparación con la (DT). Sin embargo, debido a las facilidades para la microscopía fluorescente, se requiere de un operador calificado para leer e interpretar los resultados obtenidos con esta técnica. La prueba de hemaglutinación indirecta (IHA), que utiliza células rojas de oveja como un antígeno portador, es sensible y específica.

Los reactivos están comercialmente disponibles en forma equipada de varios fabricantes y son ampliamente utilizados rutinariamente. Sin embargo se ha demostrado que la prueba (IHA), puede fallar para detectar infecciones tempranas y es sólo de valor limitado en la determinación del estado de progresión de -

una infección por *Toxoplasma gondii*. El uso de látex como un portador de antígeno en una preparación con la prueba de aglutinación, demostró una ausencia de sensibilidad con inconsistencia entre los lotes. Más recientemente se desarrolló la prueba de aglutinación en látex, para el uso en el sistema de microtítulo, que permite la valoración, tanto cuantitativa como cualitativa de niveles de anticuerpos para un antígeno de *Toxoplasma gondii* cubierto sobre las partículas. Se elaboró una evaluación de una prueba comercial de aglutinación indirecta en látex (Toxotest-WT (TMT), para la detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en sueros humanos.

En los estudios cualitativos se examinaron 373 sueros en la prueba comercial y Sabin-Feldman, encontrándose un 96.6% de concordancia. En los estudios cuantitativos se titularon 119 sueros en la prueba comercial de aglutinación indirecta (TMT) y Sabin-Feldman, con 137 de estos sueros titulados también en la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA).

La concordancia entre la (IHA) y (TMT) fue del 66%, mientras que la concordancia entre (DT) y (IHA) fue del 40.9%. Los resultados indican que el patrón de determinantes antigénicos para el cual los anticuerpos son medios; son diferentes en los tres sistemas de prueba. El TMT es el mejor sustituto para la (DT) en comparación con la (IHA). (3). La prueba de aglutinación indirecta en látex utiliza una suspensión de látex de poliestireno al 0.1% cubiertas con antígeno toxoplásmico. La prueba es llevada a cabo en cubetas transparentes de microtítulo y requiere 24 microlitros de suspensión de látex por pozo de prueba. Las pruebas son leídas después de mantenerse una noche a temperatura ambiente. No es necesaria la inactivación del suero para esta prueba.

Se describe un ensayo directo de enzima ligado a inmunosorbente (ELISA) que utilice antígeno marcado con peroxidasa de rábano, para la detección de IgM e IgA contra toxoplasma. En este ensayo las placas de microtítulo de poliestireno fueron sensibilizadas con anticuerpos IgM o IgA antihumano para separar IgM o IgA de otras clases de anticuerpos. Se detectó la presencia de anticuerpos IgM o IgA contra toxoplasma (Tox-IgM, Tox-IgA), por una adición secuencial de antígeno y sustratos solubles de toxoplasma marcado con peroxidasa de rábano. Como se juzgó por el examen de sueros en gradientes fraccionados de sacarosa, el ensayo fue específico para las clases de anticuerpos IgM o IgA.

En contraste a la inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos IgM contra toxoplasma, la falta de inhibición de la reactividad de IgM por medio de anticuerpos IgG específicos no se detectó. Además, el factor reumatoide no causó resultados falsos negativos. De los 20 sueros con títulos altos de anticuerpos contra toxoplasma en inmunofluorescencia indirecta y fijación del complemento, 16 fueron positivos en ELISA de "doble Sandwich", 10 fueron positivos en ELISA directo para Tox-IgM y sólo 21 fueron positivos en la inmunofluorescencia indirecta para Tox-IgM, cuando fue utilizado todo el suero.

En la inmunofluorescencia indirecta, otros 13 sueros llegaron a ser positivos después del fraccionamiento en gradiente de sacarosa. El ELISA directo para anticuerpos IgA contra toxoplasma fue positivo en 43 sueros, de los cuales 39 fueron positivos en ELISA directo para Tox-IgM. Se encontraron niveles altos de anticuerpos IgM dentro de los tres meses después del advenimiento de los síntomas, decreciendo lentamente después de eso. (5).

Se seleccionaron aleatoriamente 500 sueros que se sometieron a las pruebas serológicas rutinarias, se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y se almacenaron a -20°C hasta se le hizo la prueba. Los sueros positivos en la investigación inicial en 1 y 32 fueron titulados y los que fueron positivos en una o más pruebas se sometieron al laboratorio de Salud Pública, para una prueba de Sabin-Feldman. Los controles positivos y negativos se incluyeron en cada lote y todos los resultados anómalos se checkaron, reprobándolos.

La Prueba Tox-RA, es una prueba de hemaglutinación indirecta, que utiliza eritrocitos sensibilizados de pavo con un ultrasonido de Toxoplasma gondii. Se realizó la prueba de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las células fueron reconstruidas 30 minutos antes de usarlas y se probaron después de 1-2 horas a temperatura ambiente. Hemos comparado los resultados de la prueba Tox-RA y la prueba de color de Sabin-Feldman, utilizando 1955 sueros que se sometieron rutinariamente.

Además se examinaron 42 sueros elegidos de pacientes donde la evidencia serológica y clínica disponible indicó una infección toxoplásmica de origen reciente, para determinar la interpretación de la prueba Tox-RA en la detección de estos casos tempranos. Nueve de los casos recientes de linfadenopatías y cuatro casos de infección ocular, no se detectó por medio de la prueba. Un gran número de sueros encontrados negativos en la prueba de Sabin-Feldman, dieron resultados positivos en la prueba de hemaglutinación. (2).

El equipo fluoro, es una prueba de anticuerpo fluorescente indirecto el cual es suministrado con doce preparaciones crepadas cada una con las áreas respectivas, conteniendo una monoclonal

de células de Toxoplasma gondii, fijadas con formalina (que fue ron almacenadas a -20°C hasta su uso) y también con conjugado - fluorescente (IgM polivalente y específico) con azul de Evens - en cartuchos farmacéuticos. Las preparaciones son leídas en un - microscopio de fluorescencia: los resultados positivos muestran fluorescencia roja o fluorescencia Bi o Monopolar amarillo verdo sa. De los tres equipos (prueba de látex, prueba de Tox-HA y - equipo fluoro), la prueba de látex, fue la más sensible, detec - tándose 33 sueros positivos en una dilución 1:32.

De estos sueros, 38 fueron positivos y 5 fueron negativos - en la prueba de Sabin-Feldman; no se detectó el factor reumati - de en estos últimos sueros. El equipo fluoro parece ser la prue - ba más específica, con 66 sueros positivos en una dilución 1:32 (97% de correlación con la prueba de Sabin-Feldman). Falló para detectar anticuerpos en sólo un suero. La prueba Tox-HA, detectó anticuerpos en 65 sueros en una dilución 1:32 (73% de correla - ción con la prueba de Sabin-Feldman y falló en la detección de - anticuerpos en 21 sueros (23.8%). La prueba de Sabin-Feldman, - técnicamente demanda y requiere el uso de parásitos vivos, no es practicable como una prueba de investigación. La prueba de hem - aglutinación indirecta, no es recomendada para la investigación de infecciones en suero en casos de toxoplasmosis adquirida con sospecha de menos de seis meses de duración y en niños menores - de un año de edad.

Este estudio indica que la prueba de látex, es la más sensi - ble y de costo efectivo y la que gasta menos tiempo para llevar - la a cabo, aunque la prueba de látex ha mostrado una falta de - sensibilidad y reproducibilidad. A este respecto parece la más - cercana a los criterios requeridos para una prueba de investiga -

ción para los anticuerpos de Toxoplasma gondii. La propia vida - del reactivo de látex es de 12 meses. así que puede ser usada - cuando sea requerido, mientras que las células de pavo de Tox-MA tienen una vida limitada después de la reconstitución y el volumen mínimo es suficiente para por lo menos 40 pruebas, lo que - llevaría a un gasto de reactivo, para la determinación de un número pequeño de pruebas. (53).

1.2.- ENSAYO DE ENZIMA LIGADO A UN INMUNOABSORBENTE PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS I_gG CONTRA TOXOPLASMA GONDII Y SU COMPARACION CON OTRAS PRUEBAS SEROLÓGICAS.

Se describe un ensayo de enzima ligado a un inmunoadsorbente (ELISA) para la detección de I_gG antitoxoplásmico, pero no puede distinguir entre sueros con niveles moderados y niveles altos de anticuerpos de la prueba de Sabin-Feldman. Se describió una investigación de diferentes preparaciones de antígeno de toxoplasma para usarlos en ELISA, y el desarrollo de este sistema para el inmunodiagnóstico de la toxoplasmosis y se comparó el sistema desarrollado de ELISA con otras pruebas serológicas.

Se compararon las capacidades relativas de unión de cuatro preparaciones de antígeno toxoplásmico en la prueba de ELISA para I_gG antitoxoplásmico. Una preparación (antígeno congelado/descongelado) consistentemente dió valores de absorbancias mayores que las otras. Los resultados obtenidos por ELISA con este antígeno relacionó estrechamente a los obtenidos por la prueba de Sabin-Feldman, pero no con la prueba de hemaglutinación indirecta, para anticuerpo antitoxoplasma. (51).

Se ha desarrollado otro método para la medición de los anticuerpos I_gG de suero humano contra toxoplasma, utilizando perlas de poliestireno, cubiertas con antígeno como una fase sólida y -

el conjugado IgG-humano con peroxidasa de rábano como un indicador enzimático. Para evaluar la sensibilidad y especificidad de ELISA, fue hecha una comparación entre varios métodos utilizando las pruebas serológicas convencionales. (1).

1.3.- ENSAYO LIGADO A INMUNOABSORBENTE PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS I_M CONTRA TOXOPLASMA GONDII EL CUAL NO ES AFECTADO POR EL FACTOR REUMATOIDE.

Recientemente fue descrito un nuevo principio para la detección de una clase específica de anticuerpos I_M, por medio de un ensayo de encima ligado a inmunoadsorbente (ELISA). El método permitió una demostración simple y rápida de I_M específica y dió una alta especificidad con la determinación para IgG. La interferencia del factor reumatoide fue fuertemente reducida. Se ha reportado el desarrollo de una ELISA para la detección de anticuerpos I_M contra toxoplasma basados en el siguiente principio.

Los orificios de las placas de poliestireno para microtítulos, fueron cubiertas con la fracción IgG de un suero de oveja - I_M antihumano, que se trató con suero de cordón umbilical para absorber la actividad anti-IgG. Luego el suero de prueba fue incubado por cuatro horas a 37°C y la I_M pudo estar limitada a lo cubierto. Subsecuentemente, el antígeno toxoplásmico obtenido de trofocitos se puso a reaccionar con I_M específica por una noche de incubación a 4°C.

El antígeno delimitado se hizo reaccionar con el conjugado de anticuerpo antitoxoplasma de oveja acoplado a la peroxidasa de rábano. El conjugado fue incubado por una hora a 37°C. El suero, el antígeno y el conjugado fueron diluidos en buffer de fosfato salino 0.005N (pH=7.2), que contenía Tween 20 al 0.05%.

Después de cada paso de incubación, los orificios fueron vaciados y lavados cuatro veces con la dilución del buffer. Fue utilizada una mezcla de o-fenilendiamina-peróxido de hidrógeno como sustrato e incubada por 30 minutos en baño maría. La reacción fue parada mediante la adición de una cantidad igual de $4\text{NH}_2\text{SO}_4$, y las absorbancias fueron medidas con un fotómetro a 492 nm.

Fueron consideradas las muestras con absorbancias mayores que el valor medio de 5 controles negativos, más 3 desviaciones estándar para los anticuerpos IgM antitoxoplasma. Se obtuvo una curva dosis-respuesta por medio de diluciones seriadas de una muestra, que fue positiva para los anticuerpos IgM antitoxoplasma el cual tuvo un título de 1:1024, según lo determinado por la inmunofluorescencia indirecta del IgM (tabla 1).

La sensibilidad se encontró alta, según una dilución de suero positivo por inmunofluorescencia indirecta de IgM de 1:16 y 1:32, que fueron positivos en el ELISA (tabla 1). Se demostró la alta especificidad de la investigación de IgG, según dos sueros con títulos obtenidos por inmunofluorescencia indirecta de IgG de 1:2048 y 1:16000 respectivamente, fueron negativos en la prueba de ELISA-IgM.

Tabla 1. Resultados de IgM-ELISA antitoxoplasma.

Suero No.	Título de I ^g		ELISA	
	IgG	IgM	A ₄₉₂	Resultado
1	2,048	0	0.22	-
2	16,000	0	0.23	-
3	2,048	32	0.41	+
4	16,000	1,024	1.50	+
5	16,000	16	0.51	+

Los datos presentados aquí, demuestran claramente la aplicabilidad del principio anti-IgM de fase sólida en la detección de anticuerpos IgM contra toxoplasma, como se indicó el principio - y que recientemente fue mostrado para los anticuerpos IgM contra toxoplasma para el antígeno central de la hepatitis B.

En las técnicas convencionales que usan antígenos revestidos de una fase sólida y conjugados anti-IgM, en la que la presencia de IgG e IgM, puede conducir a resultados falsos negativos, debido a una competencia del antígeno. En el sistema aquí descrito, este problema ha sido resuelto por medio del uso de anti-IgM para cubrir. En un estudio previo en la detección de anticuerpos IgM de la hepatitis A, se ha demostrado claramente la ausencia de la interferencia del factor reumatoide con anti-IgM de fase sólida y conjugados de antígenos F(ab')₂.

Esto es de gran importancia en la detección de anticuerpos IgM antivoxoplásmicos, ya que el factor reumatoide puede producir reacciones falsas positivas en sistemas convencionales.(25). Se describe un inmunoensayo enzimático invertido (R-EIA), en el cual microplacas de poliestireno fueron sensibilizadas con anticuerpos anti-IgM y secuencialmente se les permitió reaccionar con suero de paciente, antígeno soluble de toxoplasma marcado con peroxidasa, y sustrato.

La actividad del conjugado enzimático de fase sólida, fue hecho por lectura colorimétrica del color desarrollado al final y cinéticamente por el porcentaje inicial del color desarrollado. Este R-EIA, permitió una resolución completa entre los valores de absorbancias de un grupo de 16 sueros que presentaron resultados positivos en la prueba de inmunofluorescencia de IgM contra toxoplasma y los grupos remanentes, que consistieron de 39 anti-

viduos normales, 22 sueros positivos al factor reumatoide, 8 sueros macroglobulinémicos de Waldenström, 3 muestras de mononucleosis infecciosa y 6 sueros de IgG anti-toxoplasma de título alto. No hubo interferencia del factor reumatoide, ni inhibición por IgG específica en la determinación del título, aún en la inmunofluorescencia de IgM, cuando el factor reumatoide es positivo.

Así mismo, las muestras de inmunofluorescencia de IgM falso negativas dieron R-EIA positiva, aún sin la absorción de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. La posibilidad del seguimiento directo del antígeno con la enzima elimina la necesidad de usar los conjugados de antígeno y de anti-antígeno como cebras separadas, por tanto la eliminación de un paso en el ensayo. (27).

Un número de estudios relacionados con la detección de anticuerpos IgM para varios agentes infecciosos, mostraron que la competencia entre los anticuerpos IgG o IgM y el factor reumatoide o ambos, deben ser removidos para eliminar errores en los resultados. Fue modificado el ensayo de enzima ligado a inmunosorbente (ELISA) para anticuerpos totales de toxoplasma, con el fin de medir los anticuerpos IgM específicos.

El ensayo requiere 3 períodos de incubación totalizando 2 horas y anticuerpos específicos de cadena pesada marcada por enzimas para IgM humano. La lectura objetiva en la absorbancia fue normalizada al porcentaje de un control positivo estandarizado para las interpretaciones. No se observó ninguna diferencia entre los resultados del ensayo con o sin absorción previa de las muestras por proteína A de *Staphylococcus aureus*, para remover la mayor parte de los anticuerpos IgG. La adición de suero que contenía muchos niveles altos de anticuerpos IgG y otros que contenían tanto IgG como IgM, no cambia los valores del ensayo para IgM.

Ninguno de los 22 sueros que contenían niveles altos de factor reumatoide (FR), dió resultados ELISA -IgM positivos, aunque 8 de ellos tuvieron altos niveles de anticuerpos IgG toxoplásmicos. Las mezclas de sueros que contenían altas concentraciones de factor reumatoide y que tenían altos niveles de anticuerpos IgG toxoplásmicos, tampoco demostraron alguna reacción falso positivo en el ensayo IgM toxoplásmico. Así esta ELISA para anticuerpos IgM contra toxoplasma, no fue afectado por los anticuerpos IgG toxoplásmicos y el factor reumatoide. (24).

1.4.- SEPARACION CROMATOGRAFICA SIMPLIFICADA DE IgM DE IgG Y SU APLICACION A LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CONTRA TOXOPLASMA GONDII.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IF), para la demostración de anticuerpos IgM específicos, es fácil de realizar y ampliamente utilizada. Sin embargo, los sueros de pacientes que sufren de toxoplasmosis aguda o tempranamente convalescientes, con frecuencia contienen IgG específicos para la toxoplasmosis, que rápidamente puede saturar los sitios de unión en el antígeno de toxoplasma y así inhibir la unión de IgG específica de macroglobulinas. Así el ensayo más seguro para la IgG específica de toxoplasma en suero de pacientes, requieren la separación de IgM de IgG.

Los métodos más comunmente utilizados para separar la fracción IgM del suero total, son la centrifugación en sacarosa con gradiente de densidad y la cromatografía en columna. Ambas técnicas limitan el número de sueros que pueden ser manejados, requiriendo más tiempo y equipo más caro que el procedimiento desarrollado. Se ha adaptado un procedimiento de filtración en gel utilizando Bio-gel A-5m para la separación de IgM de IgG, para ser una prueba de diagnóstico rutinario de IgG específico contra Toxoplas-

ma gondii, que es capaz de manejar por lo menos 10 sueros por día requiriendo sólo 50 microlitros de suero. Los resultados de 109 sueros que tienen títulos positivos para la fijación del complemento contra toxoplasma, mostraron que 17 sueros fueron positivos a la IgM, cuando el total de suero fue probado por IPI, comparado con los 55 sueros positivos cuando fue utilizada la fracción IgM.

Los sueros con títulos de ácido desoxirribonucleico no dan resultados falsos positivos después del fraccionamiento y la separación de IgG, que elimina los resultados falsos positivos debido al factor reumatoide. Un estudio preliminar demostró que la IgM contra toxoplasma puede persistir arriba de 9 meses. (76).

1.5.- COMPARACION DE METODOS PARA LA CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS IgM ESPECIFICO A ANTIGENO CON UN ENSAYO INVERTIDO DE ENZIMA LIGADO A INMUNOABSORBENTE.

Comparamos dos métodos para la cuantificación de anticuerpos específicos a antígeno, por medio de un ensayo invertido de enzima ligado a inmunoadsorbente. En el método de la dilución serial, se determinó el resultado por la dilución más alta de un suero, produciendo una absorbancia por encima del umbral establecido. En el método de una sola dilución se determinó el resultado por medio de la comparación de la absorbancia producida por medio del suero de prueba en una dilución estándar, producidos por los sueros de referencia positivos y negativos en la misma dilución.

Los resultados en el método de una sola dilución reflejaron actividad del anticuerpo IgM específico a antígeno como una proporción del total del anticuerpo IgM en un suero. Por ejemplo la carga inmune; mientras que los resultados en el método de la dilución serial, reflejó la concentración absoluta de la actividad del anticuerpo IgM específico a antígeno.

Los resultados en el método de la dilución serial, comparados con los del método de una sola dilución, tuvieron considerablemente una reproductibilidad mayor día a día y bajo varias condiciones de prueba. El método de una sola dilución fue más útil para la discriminación de los sueros de pacientes en un estado temprano de la infección clínica, debido a Toxoplasma gondii y de pacientes en un estado avanzado de la infección (55).

1.5.- USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN ELISA Y ELISA DE DOBLE SANDWICH PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM CONTRA LA PROTEÍNA MAYOR SUPERFICIAL (p30) DE TOXOPLASMA GONDII.

Para el diagnóstico de la infección de toxoplasmosis adquirida y la congénita, varios laboratorios han propuesto diferentes técnicas serológicas para la detección de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii. A pesar de su valor comprobado para este diagnóstico la mayoría de estas técnicas consumen mucho tiempo y requieren personal cuidadosamente entrenado para hacer una lectura apropiada y la interpretación de los resultados.

Además, la mayoría de ellos dan resultados falsos positivos - con suero que contienen anticuerpos antinucleares o factor reumatoide. Por ello, Naot y Remington (1980), propusieron un ELISA de doble Sandwich que ha resultado ser más específico y sensible para la detección de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii. Para identificar los antígenos relevantes sobre la superficie de los trofozoitos de toxoplasma, algunos laboratorios produjeron anticuerpos monoclonales, que reconocieron una proteína superficial radioyodada, con un peso molecular aparente de 30 000 daltones (p30), medido por electroforesis en gel de polisacrilamida-sulfato dodecílico de sodio. Además, se ha demostrado que p30 contiene una región inmunodominante de dos o más sitios. El método está basado en la captu-

ra de anticuerpos IgM del suero, que indirectamente es relevado por la adición secuencial de un extracto de toxoplasma y un anticuerpo monoclonal de Galactosidasa anti-p30. Todos los pacientes probados con características serológicas de toxoplasmosis recientemente adquirida, mostraron niveles altos de anticuerpos IgM anti p30. Los pacientes con factor reumatoide o con anticuerpos antinucleares, fueron todos negativos. En vista de su simplicidad, especificidad y sensibilidad, se recomienda este método para el diagnóstico rutinario de la infección por Toxoplasma gondii. (54). Recientemente se ha llegado a disponer de un método para la producción de anticuerpos monoclonales.

Este implica la fusión de células de mieloma de ratón, para un antígeno con el fin de obtener híbridos que crezcan continuamente (hibridomas) y secretores de anticuerpos monoclonales con la especificidad deseada (Köhler y Milstein, 1975). Este estudio reporta el establecimiento exitoso de 3 hibridomas funcionales entre las células de mieloma de ratón y las células de bazo de ratones hiperinmunes a Toxoplasma gondii, según se monitoreó por técnicas de inmunofluorescencia indirecta y radioinmunoensayo.

Dos de estos 3 hibridomas clonados, mostraron reactividad positiva en la prueba de Sabin-Feldman. Tres hibridomas de clones seleccionados que siguieron de la fusión de las células de mieloma con las células de bazo recientemente cosechados de ratones hiperinmunes, secretaron en el medio de cultivo anticuerpo anti-toxoplasma de la clase IgG . Cuando las células de bazo de ratones hiperinmunes fueron precultivadas in vitro por 5 días en presencia de Concavalina A (Con A) y lipopolisacárido de *E. coli*, que se fusionaron con las células de mieloma, entonces 5 de los hibridomas estables secretaron anticuerpos de la clase IgG .

Estos anticuerpos monoclonales antitoxoplasma, deberían permitir un acercamiento racional para la purificación de las moléculas antigénicas correspondiente del toxoplasma. (60). La fusión de las células de mieloma de ratón NS-1, con las células de bazo de ratones infectados crónicamente con Toxoplasma gondii, produjo como se describió antes 3 clones de hibridomas con anticuerpos mono-específicos contra la membrana antigénica de taquizoítos de toxoplasma.

Uno de los anticuerpos para un determinante citoplásmico fue una IgM; los otros dirigidos a la membrana antigénica fueron del tipo de la IgG₂ e IgG₃. Los anticuerpos de los clones IEII (IgG₃), 26II y 3E5 (IgG₂), dirigidos a los antígenos membranales, limitaron al complemento y fueron reactivos en el ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento. Estos anticuerpos IgG₂ fueron fuertemente aglutinados por los parásitos, mientras que IgG₃ fue relativamente débil.

Otro anticuerpo IgG₂ (3E5), posiblemente reconoce un antígeno compartido de membrana y citoplasma, que exhibió un título bajo en el ensayo de citotoxicidad, tanto como en el ensayo de aglutinación. Los otros dos anticuerpos para antígenos membranales (2E7 y 2F8), así como un anticuerpo para un antígeno citoplásmico (3E1), no se unieron al complemento y por ende no causaron aglutinación. El patrón de tinción del parásito producidos por los anticuerpos monoclonales para los antígenos membranales en la prueba de IFI, fue diferente de la de los antisueros polivalentes.

Se observó una tinción estrictamente localizada "arroscada" así como un suave arco fluorescente. Los taquizoítos toxoplásmicos fueron radioionizados en la superficie y las proteínas solubilizadas de la membrana fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos mono-

clonales y analizadas por medio de electroforesis bidimensional - en gel de poliacrilamida. Dos anticuerpos monoclonales para antígenos membranales surgen independientemente (2G11 y 1E6), los que precipitaron consistentemente las proteínas solubilizadas de peso molecular 35,000 y 14,000 daltones, mientras que 1E11 precipitó a la proteína de peso molecular 27,000 daltones. (tabla 1). (26).

Tabla 1. Caracterización serológica de anticuerpos monoclonales - contra Toxoplasma gondii.

Clones-Isotipos	-Dye test	-Agglutinación	Títulos en		
			IFI en taquizoítos fijados en formolina.	IFI en taquizoítos levados.	
1E11	G ₂	2,048	800	64	128
2G11	G ₂	2,048	12,800	4,096	4,096
1E6	G ₂	2,048	12,800	256	1,024
2E7	G ₂	-	-	64	128
2F8	G ₂	-	-	256	16
5E6	G ₂	64	800	256	512
3G3	G ₂	-	-	16	-
3E4	IgM	-	-	16,000	-
Antitoxoplasma					
de ratón IgG		16,000	128,000	64,000	16,000

1.7.- UN ENSAYO DE ENZIMA LIGADO A UN INMUNOABSORBENTE PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS I_GM CONTRA TOXOPLASMA GONDII: SU USO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS ADQUIRIDA AGUDA.

En un ensayo de enzima ligado a un inmunoadsorbente (ELISA) para la detección de anticuerpos I_GM contra Toxoplasma gondii, tanto los sueros de individuos con resultados negativos en la prueba de color de Sabin-Feldman (DT), como de sueros de individuos con infección toxoplásmica crónica, dieron resultados positivos cuando se probaron sin diluir.

En contraste de los sueros de individuos con toxoplasmosis recientemente adquirida, los que dieron resultados positivos tanto en la prueba de Sabin-Feldman y la prueba de IFI-I_GM, así como el 92% de los sueros que dieron resultados negativos en la prueba de I_GM-ELISA.

De esta manera la prueba de I_GM-ELISA, resultó ser más sensible que la prueba de I_GM-IFI, en el diagnóstico de la infección recientemente adquirida con Toxoplasma gondii. Por otra parte los sueros que dieron resultados negativos en la prueba de Sabin-Feldman, pero que contienen anticuerpos antinucleares o factor reumatoide y que causaron resultados falsos negativos en la prueba de I_GM-IFI, provocaron resultados negativos en la prueba de I_GM-ELISA, debido probablemente al suero con I_GM y fraccionamiento de I_GG que fueron separados durante la etapa inicial (101).

La prueba de I_GM-ELISA que como ya dijimos, es más específica y más sensible que la prueba de IFI-I_GM, para la detección de anticuerpos I_GM contra Toxoplasma gondii, en pacientes con toxoplasmosis congénita y adquirida aguda. Los resultados de estos trabajos dieron el impulso para el estudio de la duración y la

significancia diagnóstica de los títulos de anticuerpos IgM, como se detectó en la IgM-ELISA, durante las fases de infección aguda y crónica. Se probaron sueros de individuos de EE.UU. en varios intervalos después del ataque clínico de la enfermedad -- para la prueba IgM-ELISA e IgM-IFI.

La IgM-ELISA, fue positiva más frecuentemente y reveló mayores títulos en comparación con la prueba de IgM-IFI. Los títulos promedio de anticuerpos IgM, como se detectó en ambas pruebas, aumentó durante los primeros tres meses del estado clínico de la enfermedad.

Aunque los títulos de IgM decrecieron en ambas pruebas, en intervalos mayores de tres meses, en la mayoría de las muestras los sueros fueron detectados con anticuerpos IgM-ELISA, con una duración de 9 meses después del estado clínico de la enfermedad. Los títulos mayores o iguales a 1:64, con la prueba de IgM-IFI, indican una infección recientemente adquirida.

Los títulos correspondientes en la IgM-ELISA son mayores o iguales a 1:256. Sin embargo, los títulos más abajo de estos valores en cualquiera de estos ensayos, no debe ser interpretado como que la infección no fue recientemente adquirida. En tales casos los sueros adicionales, preferiblemente en intervalos de dos semanas, podrían probarse en un intento para demostrar un incremento en los títulos de anticuerpos IgM (102).

Se desarrolló otro ensayo de enzima ligado a un inmunoadsorbente para la detección de clases de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii, la cual fue evaluada con respecto a la especificidad y sensibilidad. No hay interferencia del factor reumatoide, debido a la captura de anticuerpos por $F(ab')_2$. Tampoco hay reacciones cruzadas con IgG por anticuerpos anti-Toxoplasma.

ma ni interferencias con anticuerpos antinucleares. Un estudio a gran escala con cerca de 1,500 casos clínicos reveló un 100% de especificidad. De 79 sueros probados de pacientes con toxoplasmosis adquirida en fase aguda, se encontró una sensibilidad del 97%.

En la práctica clínica rutinaria, el IgM-ELISA, es una herramienta más sensible para el diagnóstico en comparación con la IgM-IPI. Se estudió el curso de los anticuerpos IgM-ELISA, en pacientes con infección aguda, en la cual la IgM alcanza niveles más altos dentro del primer mes de manifestada la enfermedad y podría demostrarse hasta en un promedio de 3 meses después de su aparición (12).

CAPITULO V

V.- DETECCION DE ANTIGENOS Y PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE TOXOPLASMOSIS.

1.- USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCION DE ANTIGENOS DE TOXOPLASMA GONDII EN SUECO Y OTROS FLUIDOS DEL CUERPO.

Los anticuerpos monoclonales contra toxoplasma son usados en - Enzima Unido al Ensayo Inmunoabsorbente (ELISA), para detectar antígenos de toxoplasma del parásito lizado, en fluido peritoneal de ratón y en suero de personas con infección aguda, producidos por el parásito Toxoplasma gondii. Cuatro de estos seis anticuerpos (1E11, 2G11, 5E6, 3E8, 3E6 y 3G1) monoclonales, son capaces de detectar antígenos de toxoplasma en estos especímenes.

El suero control de individuos no infectados con Toxoplasma gondii, y de individuos con infección crónica del parásito son negativos en la prueba de ELISA. Los sueros de individuos no infectados con Toxoplasma gondii, pero con títulos positivos de factor reumatoide son también negativos, dos de diez sueros de personas no infectadas con el parásito pero con títulos positivos para anticuerpos antinucleares, reaccionaron con los anticuerpos monoclonales.

Los resultados de la prueba de ELISA, con anticuerpos monoclonales y con la fracción P(ab)₂ de IgG, de un conejo infectado con Toxoplasma gondii, es comparado, encontrándose que la fracción P(ab)₂ es más activa que los anticuerpos monoclonales. A pesar de que se usan anticuerpos monoclonales, para la detección de antígenos de Toxoplasma gondii, en suero y otros fluidos del cuerpo, aparecen anticuerpos polivalentes (tal como la fracción P(ab)₂). (28).

Se describe un nuevo método de solubilización para Toxoplasma en la cual se usan 5% de Saponina y 5% de Octyl glucósido en combi-

nación con (S-Ag). Cuando es analizado por inmunoelectroforesis (IEF), se detectaron siete antígenos; cuatro de estos antígenos (Ag1, 2, 3 y 12) es demostrado por I^{125} por ser de origen de membrana. Los tres antígenos remanentes (Ag4, 5, y 6), son de origen intracelular y comprenden el perfil antigénico de más preparaciones convencionales usados en serología diagnóstica.

La preparación de antígeno con solubilizados de Saponina Octyl-glucósido (S-Ag), es probado por la prueba de Enzima Unida al Ensayo Inmunoabsorbente (ELISA), sea, S-ELISA paralela con una preparación de congelación-descongelación, conteniendo solamente Ag4, 5 y 6 (PT-ELISA), contra la IgG-IPI. La regresión de la PT-ELISA contra IgG-IPI es pobre y con una alta incidencia (28.9%) de resultados falsos negativos y éste pronosticó resultados negativos de PT, en sueros con títulos de IgG-IPI más bajo que 1:1024.

De estos títulos ascientes, la prueba es específica pero insensible. La S-ELISA, es más específica (5% de falsos negativos) y más sensible: perfiles poliméricos no pueden suministrar un mejor pronóstico. El mejoramiento en las pruebas usando la S-Ag es considerado, debido a los antígenos de membrana adicionales. El posible papel de este antígeno solubilizado en futuros sueros diagnósticos es discutido. La IPI, se refiere a la inmunofluorescencia indirecta. (14).

2.- RECONOCIMIENTO DE DIFERENTES ANTIGENOS DE TOXOPLASMA POR MEDIO DE ANTICUERPOS IgM E IgG EN MADRES Y SUS RECIEN NACIDOS INFECTADOS CONGELITAMENTE.

Se usa la técnica de la proteína absorbente para detectar los antígenos de Toxoplasma gondii, reconocidos por anticuerpos IgG e IgM, en suero de recién nacidos infectados congénitamente y de sus madres. Los patrones de la molécula de IgM e IgG de

los neonatos, revelaron reacciones antígeno-anticuerpo en forma de bandas, que no estaban presentes en las moléculas respectivas obtenidas de los sueros de sus madres. Esto fue verificado para el 50% de los 24 recién nacidos infectados congénitamente. En contraste, tal diferencia fue solamente notada en un 5% de los recién nacidos que no fueron infectados congénitamente, pero cuyas madres tuvieron alguna evidencia serológica de una infección aguda con Toxoplasma gondii, adquirida durante la gestación.

Los resultados indican, que el método de la proteína absorbente o alguna adaptación podrían estar disponibles, para el estudio de la respuesta inmune de la madre, feto y recién nacidos para algunos antígenos de organismos infecciosos y para el diagnóstico de infecciones congénitas en el neonato. (49).

Fue evaluado un ensayo de enzima ligado a un inmovisorbente (ELISA), desarrollado para la detección de anticuerpos IgM, contra Toxoplasma gondii, para definir su utilidad en el diagnóstico de la infección congénita de toxoplasma. Los sueros de 51 infantes, con sospecha de tener infección congénita de toxoplasma, a quienes éste diagnóstico fue excluido, fueron negativos en la prueba de IgM-ELISA. Cincuenta de ellos también fueron negativos en la prueba de anticuerpos fluorescentes (IFI-IgM), sólo fue positivo en un niño con sífilis congénita, quien tuvo el factor reumatoide circulante.

De 55 sueros de niños recién nacidos con la infección congénita de toxoplasma comprobada, la prueba de IgM-ELISA fue positiva en 43 (78.2%), mientras que la prueba IgM-IFI, fue positiva en sólo 14 (25.4%). De los sueros obtenidos durante los primeros 30 días de vida de los infantes infectados, el 91.2% fueron positivos en la prueba de IgM-ELISA, mientras que sólo el 25% fueron positi

vos en la prueba IgM-IPI. La prueba IgM-ELISA, evita los resultados falsos positivos debido al factor reumatoide y los resultados falsos negativos debidos a la competencia de los altos niveles de anticuerpos IgG materna, concluimos que la prueba IgM-ELISA es altamente sensible y especifica para el diagnóstico de la infección congénita de toxoplasma. (100).

Ha sido desarrollado otro método sencillo y rápido para la separación de IgM e IgG del suero. Fue utilizado en la técnica, la cromatografía GMBio-FEL A resultando en una fracción rica en IgM, conteniendo el 81% de la IgM del suero original y menos del 2% de IgG del suero. El procedimiento fue utilizado para detectar los anticuerpos IgM enmascarados en pacientes con sospecha de tener infecciones de Toxoplasma gondii. (40).

El fracaso en la detección de los anticuerpos IgG por inmunofluorescencia indirecta (IIF-IPI), en sueros de algunos pacientes con toxoplasmosis adquirida aguda, ha sido atribuido recientemente a un efecto inhibitor de altos títulos de anticuerpos IgG en estos sueros. Para confirmar este descubrimiento y definir su importancia para el diagnóstico, se utiliza filtración en gel para separar anticuerpos IgM de IgG en una serie de sueros que fueron negativos en la prueba de IgM-IPI.

Un total de 68 sueros fueron de pacientes con toxoplasmosis adquirida, 13 de adultos no infectados, 13 de infantes con toxoplasmosis congénita y 7 de neonatos no infectados. De los 68 sueros de pacientes con toxoplasmosis adquirida, las preparaciones de IgM (de los sueros separados), fueron positivas en la prueba de IgM-IPI en 36 de ellos (53%). Los anticuerpos IgM también fueron detectados en 5 de las preparaciones de IgM (38%) de los 13 sueros de infantes infectados congénitamente, pero en algunas de las prepara-

ciones no fueron detectadas los IgM de los sueros de neonatos no infectados. Los anticuerpos IgG contra Toxoplasma gondii, manifestaron interferir con la demostración de anticuerpos IgM en la prueba IgM -IFI. El tratamiento de los sueros con proteína A, resultó en una mayor dilución de anticuerpos IgM y una separación - menos eficiente de anticuerpos IgM de IgG , en comparación con la prueba de separación de sueros por filtración en gel.

El tratamiento de los sueros con proteína A, no resultó en una detección incrementada de anticuerpos IgM contra toxoplasma. El análisis de las preparaciones IgM (obtenidas por filtración en gel), resultó en un incremento significativo en la sensibilidad de la prueba IgM -IFI, para el diagnóstico de la toxoplasmosis recién adquirida y congénita. (35).

La presencia de IgM o IgG en suero de pacientes, frecuentemente es utilizada para ayudar a determinar si la infección por Toxoplasma gondii es reciente o vieja. Esto es particular importancia durante el embarazo donde tal información es usada para determinar si la infección ocurrió al principio del embarazo y poder causar potencialmente algún daño fetal severo.

Los problemas asociados a la exactitud de los resultados se han observado en algunos laboratorios comerciales. Estos problemas no están relacionados con el procedimiento de la técnica, pero están relacionados con los componentes del suero, como el factor reumatoide o la IgG . Se ha comparado el suero en las pruebas IFI y ELISA utilizando algunas variaciones en el procedimiento de la técnica, se encuentra que cuando se realiza el ensayo de la IgM , todos los resultados falsos positivos se deben a la presencia del factor reumatoide y los resultados falsos negativos se deben a la competencia con los altos niveles de IgG . Se determinó

que la infección natural en humano, los niveles de IgM, que en - persistir de 6 meses a 3 años en unos cuantos individuos, mientras que en la mayoría de estos, los niveles de IgG decrecen - un nivel infectable de 2 a 3 meses. La presencia de anticuerpos IgM en el suero, no es un indicio confiable para determinar cuando ocurrió la infección (17).

El diagnóstico de la toxoplasmosis aguda depende usualmente de la serología; todavía son pocos los datos disponibles para - comparar la relativa utilidad de algunas pruebas serológicas después del inicio de la enfermedad. Se realizaron las pruebas de Sabin-Peldman, de anticuerpos IgM inmunofluorescentes (IgM-IPI), de fijación de complemento al antígeno soluble (CP) y de la hemaglutinación indirecta (IHA) en sueros seriales de 27 individuos anteriormente sanos, cada uno de los cuales podría identificar - el dato del inicio de la enfermedad de las dos primeras semanas.

Los títulos de IgM-IPI de mayor o igual a 1:160, son los - mejores indicadores de la infección adquirida durante los dos a cuatro meses. La prueba de Sabin-Peldman fue de utilidad para - la investigación, pero dos tubos con títulos altos fueron escasamente documentados y los títulos absolutos fueron indicadores - imprecisos de la actualidad de la infección.

Aunque los dos tubos con títulos altos en las pruebas de - fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, pueden ser observados en la mayoría de los pacientes y los ascensos fueron de tal modo lentos, que las pruebas que fueron menos útiles, así como la prueba de IgM-IPI en el diagnóstico de toxoplasmosis aguda (78).

Se utilizó un ensayo de enzima ligado a un inmunóscorbente ELISA, diseñado para detectar las bajas concentraciones de los antígenos de Toxoplasma gondii, esto es, para detectar si la antigenemia está presente en los pacientes con toxoplasmosis aguda recientemente adquirida.

La ELISA detectó la antigenemia en 15 (68.2%), de los 22 sueros de los 23 pacientes con toxoplasmosis aguda recientemente adquirida. La antigenemia no fue detectada en los sueros de 26 individuos normales (seronegativos para anticuerpos contra toxoplasma) o de 55 individuos infectados crónicamente con el Toxoplasma gondii.

Los sueros de 13 individuos que no fueron infectados con toxoplasma y que no tuvieron factor reumatoide circulante, fueron positivos con IgG de conejo normal e infectado con toxoplasma, pero no con la fracción P(sb')₂.

Los sueros de cada uno de los 15 pacientes en la fase aguda de la infección reaccionaron con la fracción P(sb')₂ de IgG de conejo infectado con toxoplasma, pero no con la fracción P(b')₂ de conejo normal.

En estudios preliminares, los antígenos del toxoplasma, también fueron detectados en el fluido amniótico y en el fluido cerebrospinal de recién nacidos con toxoplasmosis congénita (29). Con el uso modificado de la enzima unido al ensayo inmunoscorbente, se condujo a un estudio detallado sobre la síntesis intravascular de anticuerpos contra toxoplasma en toxoplasmosis ocular.

El control de pacientes operados de cataratas, al medir anticuerpos IgG contra toxoplasma en suero de éstos en humor acuoso fue de 100. En 6 de los 6 pacientes diagnosticados clíni-

camente con coriorretinitis toxoplásmica, el radio fue de un rango entre 6 y 56. En pacientes con algunos otros tipos de irvef tis, el radio fue comparado en relación a los controles. Paralelamente se hicieron determinaciones de radios de anticuerpos de IgG de paperas, el cual fue corrido fuera, para demostrar que el incremento de niveles de anticuerpos IgG intracular contra toxoplasma, no sea un resultado de incremento de difusión o estimulación de anticuerpo policlonal.

En todos los pacientes, los radios de anticuerpos de papera están dentro del rango normal. También se probaron para suero acuoso para anticuerpos IgM e IgA, pero los anticuerpos son exclusivamente para IgG. Otros resultados indican que la clase IgG de anticuerpos anti-toxoplasma, son producidos localmente dentro del ojo en casos de coriorretinitis toxoplásmica.

Las determinaciones de estos anticuerpos, pueden ofrecer una valiosa ayuda para hacer un diagnóstico etiológico específico de toxoplasmosis ocular (45). En evaluación un ensayo de sistema ligado a un inmunoabsorbente con perlas de vidrio cubiertas de policarbonato como la fase sólida y con mecanismos magnéticos de procesamiento para la cuantificación de anticuerpos contra toxoplasma en muestras de suero humano.

Bajo los parámetros y otras condiciones básicas determinadas en este estudio, el ensayo fue altamente reproducible. Los coeficientes de variación para los valores de absorbancia obtenidos con el suero positivo, fueron de 3.42% en las pruebas en el mismo día y de 3.75% en las pruebas rutinarias. Las correlaciones significantes, fueron observadas entre el presente sistema de ensayo y otras pruebas serológicas: los coeficien-

tes de correlación fueron de 0.950 en la prueba de color y 0.929 en la prueba de aglutinación de látex. El análisis estadístico basado en la distribución de la frecuencia de los valores de absorbancia para las muestras de suero con pruebas de color positivas y negativas, dieron límites posibles para la distinción entre las muestras positivas y dudosas (0.157) y entre muestras dudosas y negativas (0.256).

Bajo este criterio diagnóstico, los resultados del sistema de ensayo concordaron marcadamente bien con los obtenidos en la prueba de color y en la prueba de aglutinación de látex, con consistencia del 94.9% y 91.9% respectivamente. (21).

Se describe un método que incrementa la sensibilidad y la especificidad de la prueba de aglutinación directa (AG) para el diagnóstico de la infección por Toxoplasma gondii. Los resultados cualitativos en la prueba de color de Sabin-Feldman (DT) y en la prueba de (AG), estuvieron en concordancia excelente (95%). La diferencia en los títulos, entre estas dos pruebas están frecuentemente relacionadas al tiempo en que el individuo es infectado.

El título de la prueba (AG) tiene una frecuencia más alta que el título de DT en la infección más vieja o crónica. Si el antígeno de la prueba (AG) aquí descrita, puede estar disponible, la prueba (AG) sería ideal, para usarla como tal y proveería un medio sencillo y barato para la vigilancia de la mujer seropositiva durante el embarazo y para la detección de seroconversiones. (11).

Fueron utilizados implementos disponibles comercialmente para la detección de anticuerpos IgM específicos para toxoplasma. Se observaron resultados falsos positivos de la IgM en todos los sueros que contienen anticuerpos específicos al toxoplasma, juntos con el factor reumatoide cuando se probaron por inmunofluorescencia (IFI)

Los resultados falsos negativos de IgM, ocurren en todos los sueros que contienen niveles competentes de anticuerpos específicos IgG, como es identificado por la IPI. Los resultados falsos negativos y falsos positivos, frecuentemente ocurren cuando los sueros son probados. Estas reacciones falsas fueron eliminadas por fraccionamiento de IgM e IgG usando el sistema Isolab de aislamiento de IgG.

Los 5 sueros de este estudio con un título IPI para toxoplasma mayor o igual a 1:16,384, también tuvieron anticuerpos IgG específicos contra toxoplasma. Esto indica que los sueros con títulos altos para toxoplasma deberán ser probados para anticuerpos IgM específicos contra toxoplasma(55). La toxoplasmosis diseminada y especialmente la encefalitis toxoplásmica, está llegando a ser una enfermedad complicante, reconocida frecuentemente en las personas que sufren inmunodepresión. Los abscesos cerebrales, fueron confirmados por Tomografía Computarizada, y el agente etiológico se identificó en las preparaciones citológicas de uno de los abscesos.

La enzima unido al ensayo inmunoabsorbente (ELISA) es evaluada para toxoplasmosis humana en tres laboratorios en los cuales usan sus propios procedimientos. El mismo lote de sueros simples es investigado y los resultados con ELISA, son probados por análisis estadístico y con las de la prueba de Sabin-Feldman (DT), inmunofluorescencia (IF), prueba de fijación de complemento (CF), y hemaglutinación indirecta (IHA).

Se obtuvieron correlaciones muy significativas en los tres laboratorios con la prueba de ELISA, usando dos diferentes antígenos y conjugado de enzima. Las correlaciones entre la prueba de ELISA y el de otras pruebas serológicas, muestran la siguiente secuencia CF mayor que IPI mayor que IHA mayor que DT. Correlaciones

significativas, son obtenidas entre la prueba de ELISA usando cada una de anti-gama y conjugado de inmunoglobulinas antitotales. En discriminación al acuerdo entre poco suero y niveles altos de anticuerpos, es bueno para todas las diferentes técnicas de ELISA, pero la discriminación entre suero positivo y negativo, depende más bien del procedimiento de ELISA. (59).

Se realizaron la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA), - la prueba de Sabin-Feldman (DT) y la prueba de fijación del complemento (CF) en 17427 sueros de pacientes con sospecha de infección de toxoplasmosis. Se encontró concordancia entre IHA y DT en 15199 sueros (87.4%) y no se encontró correlación en los 2,228 sueros restantes (12.6%). También se encontró que el DT tiene más sensibilidad que el IHA, especialmente con los sueros no correlativos en títulos altos.

La CF fue positiva en 532 sueros concordantes (2.5%) y en 594 sueros discordantes (26.7%). La proporción más alta de la CF positiva (25.3%) se encontró en títulos altos. Se concluye que la IHA como la DT, tienen una sensibilidad similar, no presentando correlación en títulos altos. La CF llega a ser positiva en los casos agudos o reactivos. Se discute la importancia de llevar a cabo una curva serológica. (34).

El ensayo de aglutinación de IgM por medio de un inmunoadsorvente (IgM-ISAGA), fue negativo en todos los sueros de individuos negativos en la prueba de color de Sabin-Feldman, en los sueros de individuos con infección crónica de toxoplasma y de infantes con infección congénita de toxoplasma, siendo positivas, tanto en la prueba de color como en la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IgM-IFI), siendo positiva también en la prueba IgM-ISAGA. Un total de 21 de los 31 sueros (67.7%) que fueron negativos en la prueba

ba de IgM-IFI, a pesar de ser obtenidos de individuos con infección recientemente adquirida de toxoplasma, y 2 de 11 sueros (72.7%) que fueron negativos en la prueba de IgM-IFI obtenidos de niños con infección congénita de toxoplasma, fueron positivos en la IgM-ISAGA. La presencia del factor reumatoide, de anticuerpos antinucleares, o ambos, no causaron resultados falsos positivos en la IgM-ISAGA, pero sí en la prueba IgM-IFI.

Así, la IgM-ISAGA es tanto más sensible y más específica que la prueba de IgM-IFI para la detección de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii, y por lo consiguiente, para el diagnóstico de las infecciones congénita y adquirida del toxoplasma. (13).

CAPITULO VI

VI.- INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL.

Una característica fundamental de los organismos es su capacidad para reconocer moléculas extrañas y responder contra ellas, bien sea a través de la síntesis de proteínas de tipo globulínico de la producción de linfocitos sensibilizados específicos o por ambos procesos. Esta respuesta inmunitaria que se ha dividido tradicionalmente en humoral y celular, tiene como característica principal, su especificidad.

Las dos principales clases de células mononucleares que intervienen en los procesos inmunitarios son: los linfocitos y los macrófagos. Los primeros poseen la propiedad de responder de manera específica, mientras que los macrófagos actúan como células necesarias y tienen un papel inespecífico.

1.- ACTIVIDAD DE LOS LEUCOCITOS SANGUINEOS HUMANOS CONTRA TOXOPLASMA GONDII.

Se ha propuesto que los fagocitos mononucleares facilitan la parasitemia que ocurre durante la infección aguda con Toxoplasma gondii en humanos, por medio de la protección del organismo de los anticuerpos específicos y servir como un medio de transporte para el parásito. Algunos reportes sobre la habilidad de Toxoplasma gondii para multiplicarse dentro de los fagocitos mononucleares, apoyan este concepto.

Sin embargo, nuestras observaciones preliminares, revelan que cuando son cultivados in vitro por más de cuatro horas antes de ser meterlos a los toxoplasmas, más del 80% de los monocitos de sangre periférica humana que tuvieron toxoplasma fagocitado, eliminaron al organismo; los organismos restantes se replicaron intracelularmente. El hecho de que los períodos del cultivo in vitro antes de

la exposición varió en los procedimientos previos, podría contar para estas observaciones aparentemente discordantes. Debido a que los monocitos cultivados in vitro sufrieran cambios bioquímicos y morfológicos significativos, hipotizamos que los monocitos expuestas en una hora de aislamiento podría tener efectos en el toxoplasma, que aquellos reflejados más cercanamente in vivo.

Virtualmente la falta de replicación del toxoplasma ocurrió dentro de estas células (monocitos de sangre periférica humana y leucocitos polimorfonucleares), como se demuestra en el examen microscópico y por medio de la absorción de uracilo H^3 . Estos resultados indican que los fagocitos circulantes de humanos limitan más que facilitan, la diseminación inicial del toxoplasma. (14).

Fueron estudiados los efectos in vitro de monocitos de sangre periférica, macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica y los fagocitos mononucleares de haco de humano en Toxoplasma parvum. En casi todos los casos, arriba del 20% de los monocitos y macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con toxoplasma in vitro, destruyeron al organismo.

La regeneración del toxoplasma intracelular, no se debió a la viabilidad disminuida de los organismos en el inóculo somético. Los monocitos humanos no elaboraron las sustancias del medio de cultivo, lo cual alteró la capacidad de supervivencia y replicación del toxoplasma en macrófagos de ratón. La reducción temprana en el toxoplasma intracelular no fue afectada por los inhibidores de algunos procesos intracelulares o por enfermedades asociadas con la inmunidad celular alterada (sarcoidosis, mononucleosis infecciosa o linfoma). Los toxoplasmas que permanecieron después de 6 horas en los monocitos y macrófagos humanos se multiplicaron. Esta multiplicación fue observada tanto microscópicamente como en

un radioensayo, que detecta la absorción de uracilo H^3 o desoxiuridina (H^3), en los ácidos nucleicos del toxoplasma intracelular. El toxoplasma intracelular en monocitos cultivados con poli (I:C) o en macrófagos derivados de monocitos cultivados con linfocinas, tuvo una absorción disminuida de los precursores radiomarcados en ácidos nucleicos del toxoplasma intracelular.

El tratamiento de los monocitos con endotoxina no altera la síntesis de ácidos nucleicos de toxoplasma intracelular sobreviviente. Estos resultados indican que los fagocitos mononucleares humanos en sangre periférica y tejido (bazo), tienen la capacidad de eliminar un gran porcentaje del toxoplasma que ingieren o a los que invaden.

La inhibición de la síntesis del ácido nucleico del toxoplasma que queda por exposición de los macrófagos derivados de monocitos a las linfocinas, indica que los productos linfocíticos pueden ser importantes para la eliminación del toxoplasma restante y multiplica en una pequeña proporción de los fagocitos mononucleares. (33). Los fagocitos mononucleares, particularmente los macrófagos (Mφ), que han sido activados por las linfocinas, son la principal defensa contra los patógenos celulares tales como Toxoplasma gondii.

Para determinar las causas de la susceptibilidad a la infección por toxoplasma de los recién nacidos, hemos comparado: a) la interacción de toxoplasma con los fagocitos mononucleares de neonatos (los monocitos sanguíneos y los tipos de macrófagos de recién nacidos, derivados de monocitos sanguíneos o de tejido placentar) con los monocitos sanguíneos de adultos y macrófagos derivados de monocitos y b) la producción de linfocinas activantes de macrófagos (MAF), por células mononucleares sanguíneas (MC) de recién na-

cido y adulto, estimuladas con concavalina A (Con A). Tanto los macrófagos de recién nacidos como el adulto, eliminaron el toxoplasma con la misma eficiencia. Similárrmente, la supervivencia y replicación del toxoplasma fueron comparables tanto en macrófagos de adulto como de recién nacido. La exposición a los sobrenadantes de concavalina A del cordón umbilical, no afectó la supervivencia o la replicación del toxoplasma en macrófagos de neonatos pero sí afectó la replicación no así la supervivencia del toxoplasma en macrófagos de adulto.

La exposición a sobrenadantes de concavalina A de células mononucleares de sangre periférica de neonatos de 2 a 5 días, no afectó la supervivencia o replicación del toxoplasma en macrófagos de recién nacidos o adultos. Así, ambas generaciones de MAP, fueron debilitadas por las células mononucleares sanguíneas de neonatos y la respuesta al MAP del recién nacido, por macrófagos del recién nacido. La generación de MAP de células mononucleares de sangre de adulto, no fue inhibida por las células mononucleares sanguíneas de cordón umbilical, ni tampoco fue incrementada la reducción de células OKT₃ ligantes a anticuerpos, por reducción de células adherentes o por adición de indometacina.

La reducción de células OKT₃ ligantes a anticuerpos, abrogó la generación de MAP, por células mononucleares sanguíneas de adulto y cordón umbilical. La actividad de los sobrenadantes de concavalina A de adultos, fue abrogada por medio de diálisis a pH 2, o por adición de anti-gama-interferón, pero no de anticuerpo anti-alfa-interferón. Sin embargo, la correlación entre la actividad antiviral del interferón y la actividad antitoxoplásmica fue débil. La actividad incrementada del antitoxoplasma de los macrófagos no fue asociada detectablemente con la generación incrementada del unión

superóxido, reducción del nitroazul de tetrazolio, o la fusión fagolisosómica y no fue inhibida por la catalasa, superóxido dismutasa o manitol. Estos resultados indican que la generación de MAP y la respuesta a MAP es incrementada en las células de neonatos humanos y que gama-interferón puede ser la MAP mayor, bajo estas condiciones. (13).

Fueron observadas durante la toxoplasmosis sintomática recientes alteraciones en la calidad y función de las células mononucleares de sangre periférica. El análisis de flujo citofluorométrico y los conteos diferenciales de leucocitos, revelaron números absolutos incrementados de células T_3 , células $Leu 7^+$, y monocitos. Las células T_4^+ y las células $HLA-DR^+$, no fueron cambiadas significativamente.

Los ratios celulares T_4/T_3 fueron invertidos en la toxoplasmosis sintomática (0.7 ± 0.3) y fueron normales en la infección crónica (1.7 ± 0.5). El antígeno toxoplásmico indujo mayores números de células T_8 y T_{Q1} en cuatro líneas celulares T de los individuos con infección sintomática, que en cinco líneas celulares T de tres individuos con infección asintomática.

Ocho líneas celulares T produjeron gama-interferón de una manera específica al antígeno y en más altas cantidades cuando se originaron de un sujeto asintomático, que de un sujeto sintomático. Estos resultados indican que las alteraciones marcadas en las propiedades de las células inmunoregulatoras son características de toxoplasmosis sintomática reciente. La disfunción inmune puede ser una parte principal de la enfermedad observada y/o rasgo distintivo del parásito exitoso. (14). Fueron caracterizadas con anticuerpos monoclonales, las células mononucleares en la sangre periférica de 17 personas adultas con toxoplasmosis en fase aguda. El núme

ro absoluto de linfocitos fue incrementado por medio de la presencia de altos números de células T, con un fenotipo superficial de células T citotóxica/supresoras (OKT_3+ , OKT_8+). Poco después del ataque de la infección, estas células expresaron la activación de antígenos ($OKT10+$, $OKIa+$). Estos cambios fueron pronunciados en pacientes con linfadenopatía, pero también estuvieron presentes en aquellos que presentaron síntomas de la enfermedad negativa.

La activación de los antígenos desapareció en las primeras semanas después del ataque de la enfermedad, pero el ratio invertido OKT_2/OKT_3 persistió de dos a cuatro meses. Esto generalmente normalizó paralelamente con la recuperación clínica de los pacientes. Sin embargo, en un paciente el ratio OKT_2/OKT_3 estuvo invertido por más de un año después de la desaparición de los síntomas. (69).

La transformación blastogénica del linfocito en respuesta a antígenos lisados de toxoplasma, fue notoriamente debilitada en seis de los ocho pacientes con infección crónica latente de Toxoplasma gondii y mal de Hodgkin tratado. Nueve de estos pacientes con anticuerpos contra Toxoplasma gondii fueron medidos por la prueba de Sabin-Feldman y debilitaron la transformación linfocítica para antígenos de Toxoplasma gondii, que tuvieron evidencia clínica o serológica de infección diseminada activa de Toxoplasma gondii.

La reducción parcial de los leucocitos mononucleares adherentes, mejoró la transformación linfocítica debilitada en tres de los seis pacientes; el tratamiento de cultivo de todos los pacientes con indometacina mejoró su transformación blastogénica. Estos estudios indican que la respuesta blastogénica linfocítica a antígenos de Toxoplasma gondii es debilitada en algunos pacientes con infección crónica latente de Toxoplasma gondii y mal de Hodgkin.

tratada, pero que este deterioro de la función linfocítica no es suficiente para causar la reactivación de la infección crónica latente de Toxoplasma gondii. (24). La habilidad de los fagocitos no nucleares (monocitos, macrófagos), para eliminar los patógenos intracelulares depende en parte de la capacidad de estas células para generar potencialmente metabolitos tóxicos del oxígeno.

La perturbación de la membrana inducida por los fagocitos, inicia un desencadenamiento de la actividad respiratoria y el incremento del oxígeno consumido, es convertido al anión superóxido (O_2^-), H_2O_2 , radical hidroxilo (OH^*), y posiblemente oxígeno molecular (O_2). El producto inicial del desencadenamiento respiratorio O_2^- , parece tener poca actividad tóxica directa; sin embargo su producto de dismutación, H_2O_2 , y los productos de la interacción catalizada por O_2^- y H_2O_2 , por ejemplo OH^* y posiblemente O_2 , son microbicidas citotóxicos y carecen tener esta función en los fagocitos mononucleares.

La toxicidad de uno de estos productos, H_2O_2 , está marcadamente amplificada por los gránulos de peroxidasa de los fagocitos circulantes en presencia de un halógeno. La peroxidasa eosinófila (EPO) se une firmemente a la superficie de Toxoplasma gondii, permaneciendo viables como se determinó por medio de tinción vital, la absorción de la 2-desoxiglucosa y la supervivencia y replicación en los fibroblastos humanos.

Sin embargo, son rápidamente eliminados por la acción de H_2O_2 y cloro, bajo condiciones en las que los organismos control no son afectados. Se ha utilizado la EPO ligada a Toxoplasma gondii, para explorar el papel de esta peroxidasa en la actividad toxoplasmodica de los fagocitos mononucleares. Los macrófagos peritoneales de ratones ceseros carecen de un gránulo de peroxidasa y

y tienen un desencadenamiento respiratorio débil; el toxoplasma se
breviamente y replica dentro de éstas células. Sin embargo, estas células
adquieren actividad toxoplásmica significativa, como se observa
microscópicamente y por la inhibición de la absorción de uracilo,
cuando los organismos son cubiertos con la peroxidasa eosinófila
antes de la ingestión, los inhibidores hemoproteicos como amino
triazol y azida producen un efecto disminuido.

La peroxidasa eosinófila sobre la superficie del toxoplasma
no incrementa su ingestión por los macrófagos o el desencadenamiento
respiratorio asociado. Los monocitos de pacientes con deficiencia
hereditaria de mieloperoxidasa, tienen un defecto toxoplásmico
significativo que es suprimido cuando los organismos cubiertos
con la peroxidasa eosinófila son utilizados.

En contraste, el defecto toxoplásmico de los monocitos de
pacientes enfermos granulomatosos crónicos no son afectados por la
peroxidasa eosinófila ligada a la superficie. En estos estudios,
la replicación de los organismos intracelulares sobrevivientes,
variaron inversamente con la magnitud del desencadenamiento respi-
ratorio. La replicación fue la más grande en los fibroblastos, un
poco menos en los macrófagos residentes y menos en los monocitos;
fue significativamente mayor en la enfermedad granulomatosa cróni-
ca, que en monocitos normales o monocitos deficientes de mieloperoxi-
dasa.

Estos estudios apoyan el papel para los productos del oxígeno
y la peroxidasa endógena en la eliminación óptima de Toxoplasma
gondii, por los monocitos y demuestra que los fagocitos negativos
a la peroxidasa pueden utilizar peroxidasa en la superficie del or-
ganismo ingerido para aumentar la actividad microbicida. (22). Los
linfocitos de sangre periférica (PBL) obtenidos de individuos sa-

nos y sin conocimiento previo de sensibilización in vivo, son espontáneamente citotóxicos in vitro para células blanco infectadas con virus o relacionadas con tumores. En humanos esta capacidad citotóxica es adscrita para una población específica de linfocitos conocidos como células asesinas naturales (NK). Los linfocitos con actividad NK media, están caracterizados por la presencia de receptores Fc y grandes estructuras granulares citoplásmicas y por la ausencia de receptores del complemento e inmunoglobulinas superficiales.

La célula NK efector, puede ser modulada por un número de agentes, incluyendo a parásitos intracelulares. En este estudio fue examinada la habilidad de los sonicados y las fracciones subcelulares del parásito intracelular, Toxoplasma gondii, para eliminar in vitro la actividad de las células asesinas naturales humanas. La incubación de los linfocitos de sangre periférica humana en lana de Nylon no adherente con sonicados de Toxoplasma gondii, de 16 a 72 horas, resultó en el incremento de la actividad de las células NK, contra un blanco de NK sensible, así como una célula blanco insensible.

Los ensayos con la sola célula, revelaron que el aumento de la actividad de las células asesinas naturales, no se debió a la unión incrementada de las células blanco K-562 a las células efectoras. Los estudios de centrifugación diferencial indicaron que la actividad aumentada de las células asesinas naturales fue distribuida en la membrana enriquecida y en las fracciones citoplásmicas. Esta actividad fue resistente al tratamiento con Ribonucleasa (RNAasa) y Desoxirribonucleasa (DNAasa), pero susceptible a la proteólisis. Los anticuerpos presentes en el suero de humanos infectados con toxoplasma, bloquearon el efecto incrementado de las células -

asesinas naturales de las fracciones enriquecidas de la membrana. El incremento de la actividad de las células asesinas naturales - por medio de los linfocitos de sangre periférica, incubados con - sonificados de toxoplasma, estuvo acompañado de un incremento concomitante de interferón (IFN), pero no de la interleucina 2. (87).

CONCLUSIONES

Toxoplasma gondii, es un parásito intracelular obligado que causa la enfermedad conocida como toxoplasmosis, conociéndose por medio de estudios al respecto sobre la importancia que tiene al presentarse los cuadros clínicos, que se manifiestan en forma adquirida, congénita y diseminada, siendo la más frecuente la infección adquirida y puede ser totalmente asintomática. Debido a que se ha utilizado en forma muy limitada los cultivos de tejidos, como medios de propagación de Toxoplasma gondii y al interés que existe por conocer sobre la estructura de este parásito, para estudios patogénicos e inmunológicos, es de importancia su reproducción en cultivos primarios de células de embrión de pollo y en línea continua de células Vero.

Esto nos permite conocer algunos puntos de su dinámica de reproducción, ya que estas son semejantes, aunque no exactamente iguales; sin embargo, es muy probable que las diferencias en velocidad de reproducción sea más rápido aparentemente en células Vero. Es importante determinar los factores físicos, químicos y biológicos que afectan tanto la penetración de Toxoplasma gondii a las células huésped, así como la velocidad de reproducción.

Los organismos obtenidos por estos cultivos se purifican y son utilizados como fuente de antígeno en inmunodiagnóstico, para investigaciones y para el desarrollo de vacunas. Se describen diferentes pruebas para detección de anticuerpos contra Toxoplasma gondii, utilizando diferentes métodos para su detección. Siendo la prueba de Sabin-Feldman la de preferencia, pero ha sufrido muchas modificaciones y esto limita -

la posibilidad de utilizar el Dye test de Sacin.Feldman, pero esto no quiere decir que no pueda ser utilizado para la identificación de Toxoplasma gondii, al contrario hoy en día es la prueba utilizada para este fin. La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA), ha sido evaluada extensamente y es hoy por hoy la prueba más utilizada para identificación de microorganismos causantes de diversas infecciones, tal es el caso de Toxoplasma gondii, otra de las pruebas utilizadas es la hemaglutinación indirecta (IHAI), esta se ha demostrado que puede fallar para la detección de infecciones tempranas, y sólo se utiliza en la determinación del estado de progresión de una infección por Toxoplasma gondii.

De estas pruebas surgieron varias consideraciones de un análisis, en la que la especificidad de la prueba de Elisa parece comparable con la de las pruebas de referencia. La Elisa, parece correlacionar mejor con la hemaglutinación y la inmunofluorescencia. Se encontró que el factor reumatoide no inhibe la reactividad de IgM, por medio de IgG, además este factor no causó resultados falsos negativos. De esto podemos decir que la prueba de IgM-ELISA, resultó más sensible que la IgM-IFA, al diagnóstico de la infección recientemente adquirida por Toxoplasma gondii.

Por otra parte los sueros que dieron resultados negativos en la DT, pero que tenían anticuerpos antinucleares o factor reumatoide y que causaron resultados falsos negativos en la prueba IgM-IFA, dieron resultados negativos en la prueba IgM-ELISA, debido a IgM y a la separación de la fracción IgM durante la etapa inicial. Con el uso de anticuerpos monoclonales en ELISA de doble sandwich, basados en la captura de en-

anticuerpos IgM del suero, el cual tiene simplicidad, alta especificidad y sensibilidad que se puede considerar como otra de las pruebas para el diagnóstico de infecciones por Toxoplasma gondii. La prueba de IgM-ELISA, evita los resultados falsos positivos debido al factor reumatoide y a los resultados falsos negativos debido a la competencia de altos niveles de anticuerpos IgG naterno, presentes en la prueba de IgM-IF.

El fracaso en la detección de anticuerpos IgM por medio de IgM-IFA, ha sido atribuido a un efecto inhibitor de altos niveles de IgG en estas sueros, ya que los resultados falsos positivos se deben a la presencia del factor reumatoide y los resultados falsos negativos se deben a la competencia con los altos niveles de IgG. De todas estas pruebas concluimos que nos llevan a obtener resultados satisfactorios, ya que todas son aplicables, pero como se mencionó anteriormente, algunas son mejores en comparación con las otras, debido a las ventajas y desventajas que presentan con respecto a la otra.

Por lo que nos inclinamos por la inmunofluorescencia indirecta y la que actualmente podría ser una de las de mayor especificidad y sensibilidad como puede ser la prueba de ELISA. Finalmente concluiremos diciendo que todos los organismos tienen la capacidad de reconocer moléculas extrañas y de reaccionar contra ellas, estas células que reaccionan con moléculas extrañas son conocidas como linfocitos y macrófagos y la respuesta que presenta se conoce como inmunidad celular y humoral, en la que los linfocitos actúan de manera específica y los macrófagos como células accesorias, los cuales son activados por linfactinas y son la principal defensa contra patógenos celulares como Toxoplasma gondii.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-A BALSARI, G POLI, V MOLINA, M DOWIS, E PETRUZZELLI, A BONOLO, AND E ROLLERI. Elisa for toxoplasma antibody detection: a comparison with other serodiagnostic tests. *J Clin Pathol*, 1980; 33: 640-643.
- 2.-ALAN H BALFOUR, JOHN B BRIDGES, AND JOHN P HARFORD. An evaluation of the ToxHA test for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human serum. *J Clin Pathol*, 1980; 33: 644-647.
- 3.-ALAN H BALFOUR, DG FLECK, RUTH PA HUGHES, D SHARP. Comparative study of three test (live test, indirect haemagglutination test, latex agglutination test) for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human sera. *J Clin Pathol*, 1982; 35: 228-232.
- 4.-ALAN M. JOHNSON, P. J. McDONALD, AND S. H. NECH. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *J Protozool*, 1983; 30(2): 350-356.
- 5.-A. M. VAN LOON, J. T. VAN DER LOOT, P. W. A. HESSEN, AND J. VAN DER VEEN. Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: Comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, June 1983; p. 997-1004.
- 6.-ALAN M. JOHNSON, P. J. McDONALD AND S. H. NECH. Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of *Toxoplasma gondii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. June 16, 1981; 100(3): 934-943.

- 7.-ALAN M. JOHNSON, P. J. McDONALD, AND S. H. NEOH. Molecular weight analysis of soluble antigens from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol*, 1983; 69(3): 459-464.
- 8.-A. YANO, K. NOROZE, K. YAMASHITA, P. AOSAI, K. SEGAWA, AND S. HAYASHI. Immune response to *Toxoplasma gondii*-analysis of suppressor T cells in a patient with symptomatic acute toxoplasmosis. *J. Parasit.* 1987; 73(5): 954-961.
- 9.-BRIAN G. GRIMWOOD, KARIM HECHEMY, AND ROY W. STEVENS. *Toxoplasma gondii*: Purification of trophozoites propagated in cell culture. *Experimental Parasitology*, 1979; 48: 262-266.
- 10.-BIBILL STRAY-PEDERSEN, MD. Infants potentially at risk for congenital toxoplasmosis. *Am. J. Dis. Child.* 1980; 134: 638-642.
- 11.-BENJAMIN J. LUFT, MD; ROBERT G. BROCKS, MD; FRANCES K. CONLEY, MD; ROBERT E. MCCABE, MD; JACK S. REMINGTON, MD. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Jama*. 1984; 252: 913-917.
- 12.-BRIAN WONG, M.D, JONATHAN W. M. GOLD. M.D. ARTHUR E. BROWN, M.D. MICHAEL LANGE, M.D. RICHARD FRIED, M.D. MICHAEL L. PAPPER, M.D. JESPER W. LEXNER, M.D, AND DONALD ARMSTRONG, M.D. Central-nervous-system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drugs abusers. *Annals of Internal. medicine.* 1984; 100: 36-42.
- 13.-CHRISTOPHER B. WILSON AND JOEL E. HAAS. Cellular defenses against *Toxoplasma gondii* in newborns. *J. Clin. Invest.* - June 1984, 73: 1606-1610.
- 14.-CHRISTOPHER B. WILSON AND JACK S. REMINGTON. Activity of human blood leukocytes against *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Infectious Diseases.* December 1979; 140(6).

- 15.-CELESTE RODRIGUEZ, DANIEL AFGHAIN, ANDRE CAPRON, COLETTE DISSOUS AND PERRUCCIO SANTORO. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (P10) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. Eur. J. Immunol. 1985;15: 747-749.
- 16.-CLEA DE ANDRADE CHIARI & DAVID PEREIRA NEVES. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1984; 79(3): 157-160.
- 17.-D.L. MADDEN, D. PUCCILLO, M. ILM, J.L. SEVER. Difficulties associated with serological diagnoses of *Toxoplasma gondii*. Immunochemical Methods (1524-3522).
- 18.-D.J.F. FERGUSON, A. BIRCH-ANDERSEN, J. CHR. SIMM AND W.H. HUTCHISON. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. I. Development of the oocyst and formation of the sporoblasts. Acta path. microbiol. scand. sect. B. 1979; 87: 171-181.
- 19.-D.J.F. FERGUSON, A. BIRCH-ANDERSEN, J. CHR. SIMM AND W.H. HUTCHISON. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. II. Formation of the sporocyst and structure of the sporocyst wall. Acta path. microbiol. scand. sect. B. 1979; 87: 183-190.
- 20.-D.J.F. FERGUSON, A. BIRCH-ANDERSEN, J. CHR. SIMM AND W.H. HUTCHISON. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts. Acta path. microbiol. scand. sect. B. 1979; 87: 253-260.
- 21.-DE ABLE, M., C. THIELEMANS, AND B. VAN CAMP. Immunoregulatory T cells in mononucleosis and toxoplasmosis. (letter). New England Journal of Medicine. 1981; 105: 222.

- 22.-ERNESTO CALDERON JAIMES Y GUSTAVO LEON D. Interpretación de las pruebas inmunoserológicas para diagnóstico de toxoplasmosis. *Infectología*. Año V, (10), octubre 1985; 253-254.
- 23.-EIJJI KONOSHI AND JUNKO TAKAHASHI. Reproducible enzyme-linked immunosorbent assay with a magnetic processing system for diagnosis of toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Feb. 1983; 225-231.
- 24.-EILIV K. PETERSEN. Recency of *Toxoplasma gondii* infections correlated with results obtained in dye test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta path. microbiol. scand. sect. B*. 1981; 89: 407-410.
- 25.-EMANUELA HANDMAN, JAMES W. GIDDING, AND JACK S. REMINGTON. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*. June 1980; 124(6).
- 26.-EMANUELA HANDMAN & J. S. REMINGTON. Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Immunology*, 1980; 40: 579-588.
- 27.-EDUARDO L. FRANCO, KENNETH W. WALLS AND ALEXANDER J. SULLER. Reverse enzyme immunoassay for detection of specific anti-toxoplasma immunoglobulin M antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, May 1981; 13(5): 859-864.
- 28.-PAUSIO G. ARAUJO, EMANUELA HANDMAN, AND JACK S. REMINGTON. Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infection and Immunity*, Oct. 1980; 30(1); 12-16.
- 29.-PAUSIO G. ARAUJO AND JACK S. REMINGTON. Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. February 1980; 141(2): 144-150.

- 30.-P. SANTORO, D. APCHAIN, R. PIERCE, J.Y. GESERON, G. OVEAQUE & A. CAPRON. Serodiagnosis of toxoplasma infection - using a purified parasite protein (P30). Clin. Exp. Immunol. 1985; 62: 262-269.
- 31.-FRANCES K. CONLEY, M.D., KAY ANN JENKINS, H. T. (A.S.C.P) AND JACK S. REMINGTON, M.D. Toxoplasma gondii infection - of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. Human Pathology, August, 1981, 12(8).
- 32.-PIET WIMLAARD, HENRI VAN BRUNHOLZSE, WIM DUERMEIER, - ALEX W. L. JGSS, LOUISE SKINNER, HARRY WILLIAMS AND EVERET H. VAN ELVEN. Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. Journal of Clinical Microbiology, June 1983: 17(5):361-367.
- 33.-FERNANDO R. NORIEGA AND WILLIAM E. HAUSER, Jr. Toxoplasma gondii maintenance in tissue culture: A new efficient method for culturing RH tachyzoites. J. Parasit. 1988, 74 (3): 495-499.
- 34.-FELISA ENRIEM, MARIA DEL CARMEN CONTRERAS, MIRSELLA CASTRO, PATRICIA SALINAS Y MARIA EUGENIA MUMOS. Aspectos -- prácticos en el inmunodiagnóstico de la toxoplasmosis. -- Bol. Chile. Parasit, 1980: 35: c2-66.
- 35.-FERNANDEZ TORRANO Y COL., Respuesta inmune a la toxoplasmosis. Bol. Med. Hosp. Infant, Mex. Octubre, 1986, 43 -- (10): c58-661.
- 36.-FERNANDEZ TORRANO Y COL., Toxoplasmosis como riesgo perinatal. Bol. Med. Hosp. Infant, Mex. Octubre 1986, 43(10):

- 37.-PRANCO, E., A.J. SULZER, R. W. HIGBY, AND J. M. PERALTA. Immunoglobulin G and immunoglobulin M polar staining of *Toxoplasma gondii* in the indirect immunofluorescence test. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 12: 780-784.
- 38.-GREGORY A. FILICE, ANNE S. YEAGER, AND JACK S. REMINGTON. Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 1980; 12(3): 136-142.
- 39.-GEORGES DESMONTS, YERLICH NAOT, AND JACK S. REMINGTON. - Immunoglobulin M- immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: Diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasma infections. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 1981; 14(5): 486-491.
- 40.-GUIDO A. ORDÓÑEZ, JOSEPH T. NEWMAN, AND MARVIN J. STONE. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by rapid separation of serum immunoglobulin M and G with CM-Bio-Gel A. *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. 1982; 16(4): 751-753.
- 41.-GEORGES DESMONTS AND JACK S. REMINGTON. Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, June 1980; 11(6): 562-568.
- 42.-GREGORIO SKRONNE-KADLWEIK. CESAR CELIS GONZALEZ. JORGE GARCIA-SOLIS. JOSE CRUZ-NAVA. ANASTASIO MARTINEZ. JOSE LUIS SANCHEZ-MONROY. Diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis utilizando radionúclidos. *Bol. Med. Hosp. Infan* 1980; 3: 409-412.
- 43.-M.T.A. HUGHES & A.H. BALFOUR. An investigation of the antigenic structure of *Toxoplasma gondii*. *Parasite immuno-*

- logy, 1981; 3: 235-248.
- 44.-H.P.A. HUGHES, P. VANKHAPEN, H.J. ATKINSON, A.H. BALFOUR & D.L. LEE. A new soluble antigen preparation of *Toxoplasma gondii* and its use in serological diagnosis. Clin. Exp Immunol. 1982; 49: 239-246.
- 45.-HARNU J. TURUNEI, PAULIO. LEINIKKI, AND K. MATTI SAARI. - Demonstration of intracellular synthesis of immunoglobulin G toxoplasma antibodies for specific diagnosis of toxoplasma chorioretinitis by enzyme immunoassay. Journal of Clinical Microbiology, June 1983; 17(6): 988-992.
- 46.-IVO SKLENAR, THOMAS C. JONES, SEFIE ALKAN, AND PETER EIB. Association of symptomatic human infection with *Toxoplasma gondii* with imbalance of monocytes and antigen-specific T cell subsets. The Journal of Infectious Diseases, - February 1986; 153(2): 315-324.
- 47.-ISRAEL POTASMAN, FAUSTO G. ARAUJO, PHILLIP THULLIEZ, GEORGE DESMONTS, AND JACK S. REMINGTON. *Toxoplasma gondii* antigens recognized by sequential samples of serum obtained from congenitally infected infants. Journal of Clinical Microbiology, Oct. 1987; 25(3): 1926-1931.
- 48.-ISRAEL POTASMAN, FAUSTO G. ARAUJO, AND JACK S. REMINGTON. *Toxoplasma* antigens recognized by naturally occurring human antibodies. Journal of Clinical Microbiology, Dec. - 1988; 24(b): 1050-1054.
- 49.-JACK S. REMINGTON, FAUSTO G. ARAUJO, AND GEORGES DESMONT. Recognition of different toxoplasma antigens by IgM and - IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. The Journal of Infectious Diseases. November, - 1985; 152(5): 1021-1024.

- 50.-JEAN C. TRYON. *Toxoplasma gondii*: Ultrastructure and antigenicity of purified tachyzoite pellicle. *Experimental Parasitology* 1979; 48: 198-205.
- 51.-JANET M. FRANCIS. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasma IgG antibody: A comparison with other serological tests. *Medical Laboratory Sciences* 1983; 40: 327-331.
- 52.-JANET M. FRANCIS. A contribution towards the antigenic analysis of *Toxoplasma gondii*. *Medical Laboratory Sciences* 1983; 40: 319-325.
- 53.-JENNIFER LESTER. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*: A comparison of three test kits. *Medical Laboratory Sciences* 1983; 40: 367-369.
- 54.-J.Z. CESERON, A. CAPRON, G. OVLAKUE AND P. SANTORO. Use of a monoclonal antibody in a double-sandwich Elisa for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30). *Journal of Immunological Methods*. 1985; 83: 151-158.
- 55.-JAY P. SIEGEL AND JACZ S. REITINGTON. Comparison of method for quantitating antigen-specific immunoglobulin M antibody with a reverse enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, July 1983; 16(1): 63-70.
- 56.-JOAN C. FUNG, PH.D., ARLENE GLOTTSTON, B.S., PAUL SWENSON PH. D., AND MARK KAFLAT, M.D. Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. *Am. J. Clin. Pathol* 1985; 83: 190-195.
- 57.-J.D. PICKARD. The diagnosis of toxoplasmosis. *British Medical Journal*. 8 September 1984; 289: 570-571.

- 56.-JOHNSON, W.D., Jr. Chronological development of cellular immunity in human toxoplasmosis. *Infection and Immunity*. 1981; 33: 942-949.
- 59.-JOHN A. GREEN, MD, PHD, SPOTSWOOD L. SPRUANCE, MD, AND BRUCE D. CHESON, MD. Favorable outcome of central nervous system toxoplasmosis occurring in a patient with untreated hodgkins disease. *Cancer*. 1980; 45: 805-810.
- 60.-K.K. SETHI, T. F'LO, H. BRADIS. Hybridomas secreting monoclonal antibody with specificity for *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol*, 1980; 66(2): 192-196.
- 61.-KOEI SAITO, YAYOI ISE, TAKASHI LIDA, TAKAYASU SUZUKI, KOHEICHI SHIMADA AND KUSUYA NISHIOKA. Detection of toxoplasma IgG antibody by passive latex agglutination reaction. *Journal of Immunological Methods*. 1987; 101: 163-191.
- 62.-KASPER, L.H., M. CURRIE, AND M.S. BRADLEY. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (F30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* - 1985; 134: 3426-3431.
- 63.-KASPER L. H., CRABB J. W. & PEPPERDORN E.B. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunabsorption with a monoclonal antibody. *Journal of Immunology*. 1983; 130: 2407.
- 64.-LESLEY-JANE BALES, O. MOSHAEL & A.J. PINCHING. Microbicidal activity of monocyte derived macrophages in AIDS and related disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 1987; 67:227-235.
- 65.-LEYVA CORZO, A. Toxoplasmosis: Resumen histórico y revisión bibliográfica. *Rev. Cub. Med. Trop.* 1979; 11(2):141-156.
- 66.-LUIS ISILIA JANCZEI, JOSE SOSA MARTINEZ, RAQUEL N. SOSA, - HUGO GUZMAN OLERO. Reproducción de *Toxoplasma gondii* en

- cultivos de tejidos. *Infectologia*. 1983; 9: 425-434.
- 67.-LUPT, B. H., G. KANSAS, E. J. ENGLEMAN AND J.S. REMINGTON. Functional and quantitative alteration in T lymphocyte - subpopulations in acute toxoplasmosis. *Journal of Infectious Diseases*. 1984; 150: 761-767.
- 68.-LLOYD H. KASPER. Isolation and characterization of a monoclonal anti-PfO antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, 1987; 9: 433-445.
- 69.-MARC DE WAELE, ANNE NAESSE'S, WALTER FOULON, & BEN VAN CAPE. Activated T-cells with suppressor/cytotoxic phenotype in acute *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1985; 62: 256-261.
- 70.-M.N. LUNDE AND L. JACCS. *Toxoplasma* cystozoite antigenic change in tissue culture. *J. Parasit.* 1985; 71(6): 833.
- 71.-MILFORD N. LUNDE AND LEON JACCS. Antigenic differences - between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1983; 69(5): 806-808.
- 72.-MCLEOD, R., M.O. BEEN, AND R. G. EBBES. Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology*. 1985; 17: 149-153.
- 73.-MICHAEL HANDLER, M.D., VICTOR HO, M.D., MARGARET WHELAN, M.D., AND GLEB SUBZILOVICH, M.D. Intracerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J. Neurosurg.* 1983; 59: 994-1001.
- 74.-MANUEL FERNANDES TORRANO. MARIA TILA SIJAJA-CONTRERAS. -- ANDRES RAPASL TRANTER-MELO. Encuesta seroepidemiológica - de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en 125 mujeres embarazadas del oriente del Estado de Tlaxcala. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* Mayo 1980; 43(5): 274-277.

- 75.-M. HAENTJENS, L. SACRE AND P. DEMEUTER. Congenital toxoplasmosis after maternal infection before or slightly after conception. *Acta Paediatr. Scand* 1986; 75:343-345.
- 76.-N. PYNDIAH, U. KRECH, P. PRICE, AND J. WILHELM. Simplified chromatographic separation of immunoglobulin M from G and its application to toxoplasma indirect immunofluorescence. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979; 9(2): - 170-174.
- 77.-PAUL PARTANEN, HANNU J. TURUNE, RAILI PAASIVUO, ERIK POJSSON, JUUKA SUNI AND PAULI O. LEINIKKI. Identification of antigenic components of *Toxoplasma gondii* by an immunoblotting technique. *FEBS*. July 1983; 152(2):252-254.
- 78.-PETER C. WELCH, HENRY MASUR, THOMAS C. JONES, AND JACK S. REMINGTON. Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases*. August 1980; 142(2): 255-264.
- 79.-POTASHMAN, I., F.G. ARAUJO, J. DESMONTS, AND J.S. REMINGTON. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J. Infect. Dis.* 1986; 142: 757-766.
- 80.-PARTANEN, P., H.J. TURUNE, R. E. A. PAASIVUO, AND P.O. LEINIKKI. Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulin G, M, and A antibodies at different stages of infection. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 133-135.
- 81.-PASLO TELLO. Toxoplasmosis y embarazo.. *Ecl. Chile. Parasit.* 1980; 35: 21-24.
- 82.-RICHARD M. LOCKSLEY, CHRISTOPHER B. WILSON, AND SEYMOUR J. KLEBANOFF. Role for endogenous and acquired peroxidase -

- in the toxoplasmaicidal activity of murine and human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* May. 1982;69:1099-1111.
- 83.-RIMA MCLEOD KLAUS G. BEISCH, SAUNDRA M. SMITH, AND JACK S. REMINGTON. Effects of human peripheral blood monocytes, monocyte-derived macrophages, and spleen mononuclear phagocytes on *Toxoplasma gondii*. *Cellular Immunology*. 1980; 54: 130-150.
- 84.-RIMA MCLEOD & R. T. ESTES. Role of lymphocyte blastogenesis to *Toxoplasma gondii* antigens in containment of chronic, latent *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin. Exp. Immunol.* 1985; 62: 24-30.
- 85.-RIMA MCLEOD AND DOUGLAS G. MACK. Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, April, 1986; 136(7): 2640-2643.
- 86.-RESANO PEREZ FRANCISCO, PASCOE LIRA DALILA, JUNIGA TELLERIA VILMA. Encuesta seroepidemiológica de anticuerpos anti-toxoplasma en la República Mexicana. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 1985; 32(1): 8-17.
- 87.-SOMESH D. SHARMA, JAN VERHOEF, AND JACK S. REMINGTON. Enhancement of human natural killer cell activity by subcellular components of *Toxoplasma gondii*. *Cellular Immunology*. 1984; 86: 317-326.
- 88.-SUMIE HOSHINO-SHIMIZU, JOSE R. MINEC, AND MARIO E. CAMARCO. Lectin used in the purification process of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Parasitol.* 1980; 66(6):989-991.
- 89.-SHARMA, S. D., J. MULLENBAX, F.G. ARAUJO, H. A. BRITTON, AND J. S. REMINGTON. Western blot analysis of the antigen of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgG and IgM an-

- tibodies. *J. Immunol.* 1983; 131: 977-983.
- 90.-SKLENAR, I., T.C. JONES, S. ALKAN, AND P. ERB. Association of symptomatic human infection with *Toxoplasma gondii* with imbalance of monocytes and antigen-specific T cell subsets. *Journal of Infectious Diseases.* 1986;153:315-324
- 91.-SANTORO F., CHARIF H. & CAPRON A. The immunodominant epitope of the major membrane tachyzoites protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology.* 1986;8: 611.
- 92.-STEVEN M. HEUTECH, MD. MPH, ALEXANDER J. SUDZER, PHD, JOE B. RAMSEY, Jr. MD. WALTER A. MURRAY, Jr. MD. MMSC, AND DENNIS D. SURANEK, DVM, MSG. *Toxoplasma gondii* isolated from amniotic fluid. *Obstetrics & Gynecology.* March 1980; 55(3): (supplement), 2 y 3.
- 93.-TEODORO GARRADA-BRAVO. La toxoplasmosis problema de salud pública avances y perspectivas. *Bol.Med. Hosp. Infant. Mex.* Julio 1981; 40(7): 153-162.
- 94.-TSUE-MING LIN, MONROE W. CHIN-SEE, SEYMOUR P. HALBERT, AND J. MENSEN JOSEPH. An enzyme immunoassay for immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* which is not affected by rheumatoid factor or immunoglobulin G antibodies. *Journal of Clin Microbiology,* Jan, 1986;23(1);77-82
- 95.-W. DUERMEYER, P. WIELAARD, H. VAN GRUIJTERINGSEN, AND J. SWINKELS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibodies against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology.* Dec. 1980;12(6):305-308
- 96.-WARE P.L. & KASPER L.H. Strain specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity.* 1987;55: 778.
- 97.-WANG, C. Y., A. AL-KATIB, C.L. LANE, B. KOZINER, AND S.M. FU. Induction of HLA-DQ/DS (Lew 10) antigen expression by

- human precursor B cell lines. *Journal of Experimental Medicine*. 1983; 158: 1757-1762.
- 98.-YASUHIRO SUZUKI, PHILIPPE THULLIEZ, GEORGES DESMONTS, AND JACK S. REMINGTON. Antigen(s) responsible for immunoglobulin G response specific for the acute stage of toxoplasma infection in humans. *Journal of Clinical Microbiology*. May. 1988; 26(5): 901-905.
- 99.-Y. CARLIER, D. ECOT, J.P. BESSAINT, A. CAPRON, P. VAN KIEPEN, E. J. REIBENBERG, R. BERGQUIST, & G. HULDT. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis. *Bulletin of the World Health Organization*. 1980; 56(1): 99-105.
- 100.-YERUDITH NAOT, D. SO., GEORGES DESMONTS, M.D., AND JACK S. REMINGTON, M.D., IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital toxoplasma infection. *The Journal of Pediatrics*. January 1981; 98(1):32-36.
- 101.-YERUDITH NAOT AND JACK S. REMINGTON. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. November-1980;142(5):757-756.
- 102.-YERUDITH NAOT, DOUGLAS R. HUPPILL JACK S. REMINGTON. Duration of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* after acute-acquired toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. May. 1982;145(5): 770.
- 103.-YANO, A., K. YUI, M. YAMAMOTO, F. ACSAI, S. PURUTA, AND S. NOJIMA. Immune response to *Toxoplasma gondii* I. Toxoplasma-specific proliferative response of peripheral

blood lymphocytes from patients with toxoplasmosis. Microbiology and Immunology. 1983a; 27:455-463.