

N° 35
261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"COMPARACION DE DOS METODOS SEROLOGICOS
EN EL DIAGNOSTICO DE PALUDISMO"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
LUVIA GONZALEZ CAMAS

México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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.

I N D I C E

I. OBJETIVOS	3
II. INTRODUCCION	4
. Sinonimia	4
. Antecedentes	4
. Etiología	6
. Epidemiología	7
. Factores epidemiológicos secundarios	7
. Ciclo biológico	10
. Sintomatología	12
. Diagnóstico	13
. Tratamiento	14
. Profilaxis	15
. Malaria de los roedores	16
III. DIAGNOSTICO DE PALUDISMO POR EL LABORATORIO	19
. Inmunofluorescencia Indirecta	19
. ELISA en manchas	20
IV. MATERIAL Y METODOS	21
1. Obtención del antígeno	22
1.1 Sensibilización de láminas con antígeno para IFI	22
1.2 Antígeno para ELISA en manchas	23
1.2.1 Preparación del antígeno	23
1.2.2 Sensibilización de discos de nitrocelulosa	25
2. Técnicas utilizadas	25
2.1 Inmunofluorescencia Indirecta	25
2.2 ELISA en manchas	28
V. SOLUCIONES Y REACTIVOS	30
VI. RESULTADOS	33
A. Tratamientos realizados para la obtención de antígeno de ELISA en manchas	33
B. Muestras procesadas por: B.1 Inmunofluorescencia Indirecta	34
B.2 ELISA en manchas	35
VII. CONCLUSIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41

I. OBJETIVO.

En el presente estudio se determinará el cruce antigénico entre Plasmodium vivax y Plasmodium berghei yoelii, através de la comparación de dos métodos serológicos: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y una variante del ensayo de inmunoadsorbente unido a enzima (Dot-ELISA), con el fin de utilizar la cepa de Plasmodium berghei yoelii para diagnóstico clínico de paludismo humano, tomando en cuenta que dicha cepa o especie infecta únicamente a roedores.

II. INTRODUCCION.

Sinonimia.

Paludismo, Malaria, Fiebre intermitente, Fiebre de los pantanos, Fiebre palustre (19).

El Paludismo (del latín palus-pantano) o malaria (del italiano mal-malo, aria-aire), es una enfermedad transmisible, producida por un parásito del género Plasmodium, transmitida al hombre por un mosquito del género Anopheles el cuál actua como vector del padecimiento.

Clinicamente se manifiesta por una triada sintomatológica caracterizada generalmente por fiebre, anemia y hepatoesplenomegalia.

Es un padecimiento generalmente agudo, con tendencia a la cronicidad, que suele durar uno o varios años, siendo su manifestacion más constante la fiebre, la cuál se presenta en forma de ataques que suelen durar de una a cuatro semanas, formados por paroxismos diarios, tercianos o cuartanos, que comienzan por un intenso período febril que suele durar de cuatro a seis horas, para desaparecer bruscamente durante un período de sudoracion intenso de una a dos horas y reaparecer a las 24, 48 ó 72 horas.

Antecedentes.

El Paludismo es una enfermedad que ha padecido el hombre desde que la especie humana se diferenció como tal, conocida desde épocas remotas de acuerdo a evidencias de los Hebreos, del año 1273 a.C. o en papiros de los Egipcios del año 1550 a.C. (11).

En 1880, Alfonso Laveran médico francés descubrió a los parásitos causantes del paludismo al comprobar cuerpos pigmentados contenidos en las hemafes de palúdicos, con gran movilidad y por ende elementos vivos (1).

En 1889, Sajaron llevó acabo la descripción detallada de Plasmodium falciparum.

En 1890, Romanowski adjuntó al estudio microscópico de los plasmodios, el método panóptico de coloración con azul de metileno y eosina.

En 1897, Ross descubrió como transmisor del paludismo, al díptero Anopheles y un año más tarde Bastianelli, Gignami y Grassi demostraron en un estudio experimental con mosquitos alimentados con sangre de enfermos de paludismo, todos los estadios de la esporogonia.

Mac Callum, el célebre anatomopatólogo, fué el primero en observar el fenómeno de la fertilización entre el microgameto y macrogameto para la posterior formación del cigoto, lo cuál permitió a Ross describir el ciclo vital del paludismo en el insecto transmisor lo que le valió el Premio Nobel.

En 1922, fué descubierto el Plasmodium ovale en Africa y en ese mismo año el paludismo ocupaba en México el segundo lugar como causa de defunción.

En 1948, Garnham describió la fase exoeritrocítica de Plasmodium vivax, en los hepatocitos humanos.

Etiología.

El agente etiológico de la malaria o paludismo es un parásito unicelular protozoo del género Plasmodium que cuenta con cuatro especies capaces de parasitar al hombre; P. malariae (Grassi y Feletti 1890), P. vivax (Grassi y Feletti 1890), P. falciparum (Welch 1897) y P. ovale (Stephens 1922).

En México únicamente existen las tres primeras especies;

P. vivax - es la especie que produce la enfermedad generalmente conocida como "Terciana benigna", debido a la tendencia de los paroxismos a presentarse cada tercer día y porque su curso no llega a tener una gravedad extrema (7).

P. falciparum - produce la enfermedad que se designa comúnmente como "Terciana maligna" cuyas formas perniciosas se caracterizan por su extrema gravedad (7).

P. malariae - en este caso la enfermedad se designa como "cuartana" ya que siendo la duración del ciclo esquizogónico del parásito de 72 hrs. los accesos se presentan cada 4 días (7).

P. ovale - presenta cuadros similares a los presentados por P. vivax y solo se le encuentra en el Viejo Mundo (7).

La hembra del mosquito perteneciente al género Anopheles es hematófaga por lo tanto solo ella es la transmisora.

En América Latina las especies de Anopheles más importantes son: A. albimanus, A. quadrimaculatus, A. pseudopunctipennis, siendo estos los vectores principales en México; A. aquasalis es el de mayor importancia en Centroamérica; A. darlingi en Sudamérica; el anofelino de mayor incidencia en Perú, Chile y Argentina es A. pseudopunctipennis (19).

Epidemiología.

La malaria presenta una amplia distribución mundial, principalmente en regiones tropicales.

Los factores epidemiológicos primarios de esta enfermedad están representados por los plasmodios, los anofelinos y el hombre sano.

La posible distribución geográfica del paludismo se encuentra delimitada por elementos ecológicos, tales como altura sobre el nivel del mar topografía del terreno, lluvia, salinidad, temperatura, humedad atmosférica y otras características de los criaderos, estos constituyen los factores epidemiológicos principales.

Los anofelinos transmisores más importantes en México son:

A. pseudopunctipennis - es el agente etiológico de mayor distribución geográfica, responsable de la transmisión del paludismo en las sierras y valles altos, es especie de hábitos domésticos.

A. albimanys - se presenta a lo largo de las zonas costeras tanto del Golfo de México como el Océano Pacífico en la región del Istmo y en la Península de Yucatán, es el principal transmisor en las planicies costeras y también es de hábitos domésticos.

Factores epidemiológicos secundarios.

La temperatura propicia para la transmisión de la enfermedad varían entre 16°C como mínimo y 38°C como máximo (7).

La altura sobre el nivel del mar es determinante.

La mayor endemicidad se encuentra a nivel del mar y disminuye progresivamente hasta desaparecer en las localidades situadas a más de 2000 mts. de altitud en México (7).

Los pantanos, lagunas, acequias de riego y otras colecciones de agua existentes en el área palúdica tienen una importancia definitiva ya que en ella es donde los anofelinos desarrollan su ciclo biológico (7).

Es necesario un alto grado de humedad relativa en la atmósfera para que se pueda efectuar en condiciones óptimas el desarrollo de los anofelinos, de los plasmodios y el ciclo de transmisión.

El modo de cultivar la tierra puede hacer retroceder la enfermedad en algunas localidades y favorecer su diseminación en otras.

La malaria puede ser transmitida también mediante transfusión sanguínea, por el uso inadecuado de jeringas no esterilizadas, se han relatado casos de transmisión transplacentaria, esta última al parecer se realiza en los últimos días del embarazo o durante el parto, por lo cuál es importante el estudio de la madre, ante una sospecha de paludismo en un recién nacido. También se ha transmitido en los trasplantes de órganos.

Un porcentaje significativo de niños entre 2 y 9 años presentan hepatoesplenomegalia, en zonas hiperendémicas.

Cabe señalar que es de suma importancia la valoración de la vivienda en general, determinando tamaño, ubicación, facilidades de comunicación, debido a que un mejor nivel económico incluye mejores casas, alimentación, mayor cantidad de medicamentos antipalúdicos y control de los criaderos de mosquitos, ayudando así a vencer el paludismo.

Se ha observado en los últimos años que la costumbre de "descansar" a la entrada de la vivienda durante las tardes, tiene gran importancia en la transmisión de la malaria.

El paludismo es una enfermedad delimitada en áreas endémicas que se encuentran entre los paralelos 45°N y 40°S.

Aparentemente la malaria fué introducida en América en el año 1519 por los conquistadores españoles (19).

En la población mexicana el paludismo fué la segunda causa de mortalidad entre 1922-1929 y la tercera entre 1930-1939, para ocupar el noveno lugar entre 1959 y desaparecer de las diez primeras causas de muerte en 1960 (19).

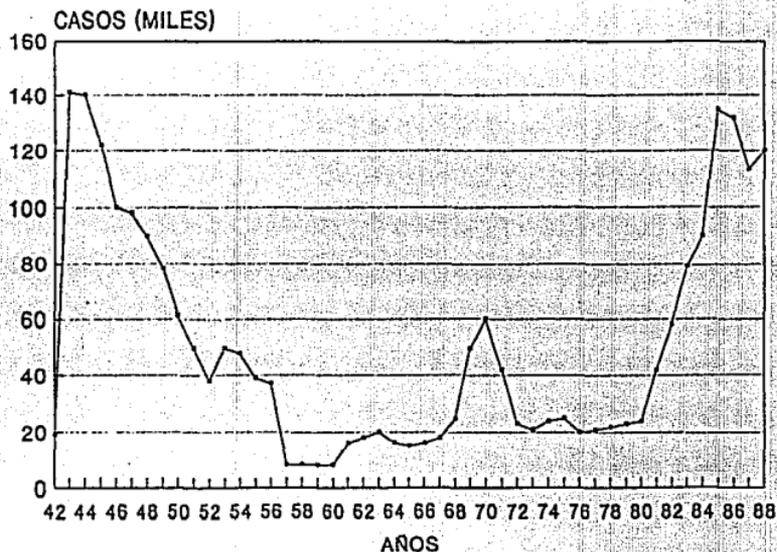
La evolución del paludismo en nuestro país a partir de la década de los 40 (1943) presenta una similitud con la situación actual registrada en 1985 (8) (Figura No. 1).

Plasmodium falciparum en el año 1957, causó el 12% del total de casos registrados para ir desapareciendo con 56 casos de 48 843 notificados en 1969 y 0 en 1976. En 1977 se introduce por el estado de Chiapas con 1 caso y para 1979 en México se reportan 1193 y 1425 en el año de 1985, disminuyendo así a 901 en 1986 (15).

Los estados afectados por P. falciparum en 1986 son Campeche, Chiapas, Oaxaca y Tabasco (15).

Debido a que las infecciones por P. vivax causan incapacidad para la elaboración de labores cotidianas del campesino, repercute en forma negativa en la economía familiar y del país, dentro de los casos de malaria en México se considerará que un 60% de estos se presenta en los grupos etáreos productivos, por lo tanto la principal causa de las pérdidas económicas ocurre en el período del año en donde se incrementa el número de casos de paludismo, que comprende los meses de verano y otoño, ocasionando que la producción de la tierra baje considerablemente debido a que nuestra agricultura depende principalmente del temporal.

CASOS DE PALUDISMO NOTIFICADOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 1942-1988



FUENTE: DIR. GRAL. DE EPIDEMIOLOGIA

FIGURA 1

Los campesinos tienden a abandonar las tierras férciles y húmedas lugar donde se asienta el problema perdiendo así, sus cosechas que son de vital importancia para su desarrollo.

Diez son los estados más afectados y son los responsables del 95% del total de casos notificados, entre estos tenemos: a Oaxaca que ocupó el primer lugar con 11 164 casos, el segundo Guerrero con 8 901 casos, Chiapas con 6 125, Michoacán con 5 770, Sinaloa con 1 468, Campeche con 1 026, Veracruz con 1 011, Quintana Roo con 818, Nayarit con 737 y finalmente Tabasco con 663 casos (5) (Figura No.2 y su representación gráfica en la Figura No. 3).

En 1988 se reportaron 116 230 casos de paludismo en el país comparando con los reportados en el año anterior se observa un aumento global del 12.9% (8).

Ciclo Biológico.

El hombre actuó como huésped intermediario y reservorio al desarrollarse en él, la fase asexual ó esquizogónica y en el mosquito que es el huésped definitivo y transmisor se realiza el ciclo esporogónico o sexuado. El ciclo esquizogónico comprende dos fases: la exoeritrocítica y la eritrocítica (3,10).

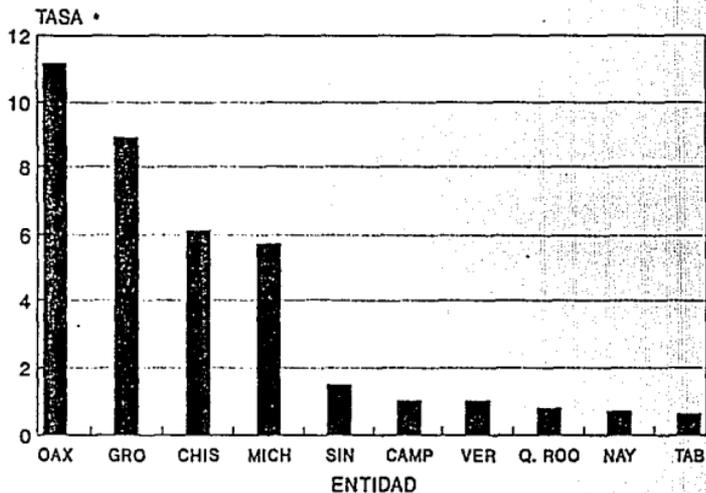
Esquizogonía - Los esporozoítos infectados que provienen de las glándulas salivales del mosquito infectado llegan a la corriente sanguínea del vertebrado, por la picadura. Al caso de 30 a 40 minutos estos parásitos delgados y móviles penetran a una célula parenquimatosa del hígado, iniciándose la fase exoeritrocítica, del ciclo vital, llamada así porque tiene lugar fuera del glóbulo rojo. En el hepatocito, el parasito se desarrolla y transforma en criptozoíto.

ENTIDADES FEDERATIVAS CON MAYOR
PREVALENCIA DE PALUDISMO EN MEXICO



FIGURA 2

MORBILIDAD POR PALUDISMO EN ENTIDADES FEDERATIVAS PRIORITARIAS. MEXICO 1989.



FUENTE: DIR. GRAL. DE EPIDEMIOLOGIA
• POR 100,000 HABITANTES

FIGURA 3

La división de este esquizonte criptozoico produce de 15 000 a 40 000 merozoítos criptozoicos en la célula hepática; este fenómeno requiere de 6 a 9 días según la especie de parásito. El hepatocito parasitado y debilitado se rompe y libera los merozoítos, los cuales son fagocitados y muertos por las células del huésped en una elevadísima proporción. De no ser así la especie humana habría desaparecido de las regiones tropicales, sin embargo, los merozoítos que se salvaron penetran de nuevo a las células hepáticas, donde se repite el ciclo de reproducción.

Debido a que todos estos fenómenos tienen lugar antes de que se infecten los glóbulos rojos, se habla de fase preeritrocítica del ciclo exoeritrocítico.

P. falciparum sólo posee una fase exoeritrocítica antes de invadir los eritrocitos y sus gametocitos tienen forma de arco o semiluna, en contraposición con las formas redondeadas de las otras especies, las cuales sí pueden continuar el ciclo exoeritrocítico durante años. Lo que explica las recaídas separadas por varios años.

Esporogonia - La hembra de Anopheles al succionar la sangre de un individuo parasitado ingiere gametocitos, los cuales por un proceso de maduración se transforman en gametos en su estómago (3,10).

El microgameto sufre una exflagelación, formando abundantes cuerpos filiformes muy móviles con funciones de espermatozoides, los cuales se dirigen al microgameto, llevando a acabo la fertilización formándose un cigoto, donde de 12 a 24 hrs. después de que el mosquito ha ingerido la sangre, el cigoto se transforma en ocineto, una forma alargada y móvil que atraviesa la pared del intestino del insecto dando lugar a un ocisto esférico.

Dentro del oocisto se desarrollan cientos o miles de esporozoitos, los cuales al romperse la pared del oocisto, quedan libres y emigran hacia las glándulas salivales del insecto. En este momento este queda listo para infectar a un nuevo huésped, por lo tanto al momento de picar al hombre los esporozoitos pasan a la sangre y a los tejidos, volviendo así a iniciar sus ciclos preeritrocíticos y eritrocítico.

El ciclo exoeritrocítico es el responsable de las recaídas, el ciclo eritrocítico da el cuadro clínico y el ciclo esporogónico da la transmisión (Figura No.4)

Sintomatología.

El período de incubación de la enfermedad se inicia cuando el mosquito infectado inocular los esporozoitos directamente en los capilares del huésped y termina cuando éste manifiesta síntomas clínicos, teniendo así una duración de 10 a 15 días, pero en ocasiones se prolonga por más de 6 meses (1).

La malaria adquirida en forma natural presenta un período de incubación que oscila de 7 días a 8 meses, dependiendo de la especie y cepa del parásito, cantidad de parásitos y exposición anterior a la malaria, sin embargo para el caso de malaria transmitida por medio de múltiples picaduras de diversos anofelinos, el período de incubación puede acortarse significativamente, siendo en algunos casos hasta de 7 días (1).

CICLO VITAL DEL PLASMODIUM

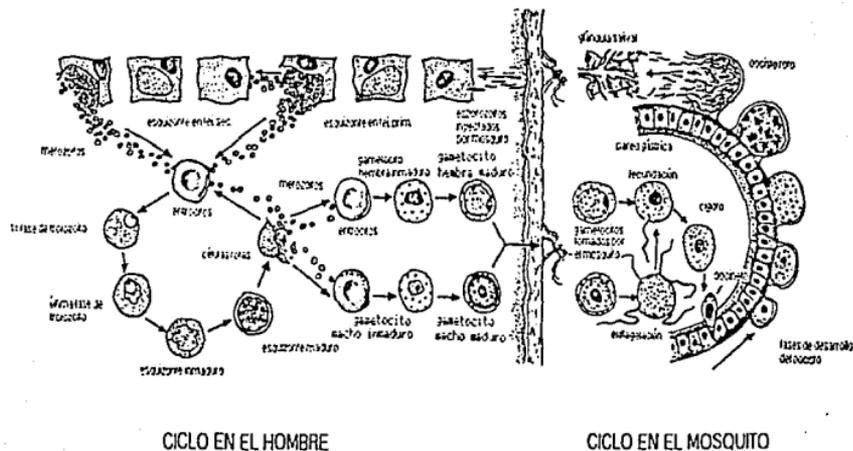


FIGURA 4

Diagnóstico.

El diagnóstico de paludismo se realiza por la identificación microscópica de los parásitos en frotis y gota gruesa, esta puede tomarse en cualquier momento, en las infecciones por P. vivax, P. malariae y P. ovale ya que durante todo el ciclo hay en la sangre periférica las diversas etapas del parásito. Es conveniente tomar la sangre unos minutos antes de que inicie el paroxismo palúdico debido a que en ese momento se van a encontrar esquizontes en un número elevado.

La serología de la malaria a progresado en alto grado ideándose así varias técnicas para el serodiagnóstico de esta enfermedad, tales como (6): - Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), introducida en 1962. Técnica sencilla y específica, presenta una sensibilidad del 95% y un porcentaje de falsas positivas del 1%, donde un título de 1:16 o mayor es considerado como positivo (14,21,22).

- Hemaglutinación Indirecta (HAI). Técnica sensible y relativamente específica para el diagnóstico de malaria humana, donde para aumentar la especificidad de esta prueba debe emplearse antígeno malarico humano (14,21).
- Precipitina en gel (18,21).
- Ensayo de inmoadsorbentes unidos a enzimas (ELISA). El inmunoensayo es una técnica muy efectiva para la medición o evaluación de antígenos y anticuerpos, es un método específico y sensible. En el caso de la malaria ha sido utilizado para la evaluación de valores de anticuerpos de malaria, obteniéndose así datos con valores epidemiológicos, sobre la transmisión de la malaria (4,14,20).

Aunque ninguno de estos ensayos determina específicamente la inmunidad individual, todos ellos son muy valiosos en la seroepidemiología de la malaria, sobre todo en las etapas avanzadas de los programas de lucha contra la enfermedad o para examinar posibles donantes de sangre.

Estas técnicas son muy útiles para confirmar clínicamente casos sospechosos de malaria en áreas endémicas, entre personas que han estado expuestas por cierto tiempo a la infección y han recibido una quimioprolaxis incompleta.

Tratamiento.

El tratamiento del paludismo se inició desde el descubrimiento de la actividad de la corteza de la quina y posteriormente de la quinina.

El primer medicamento antipalúdico empleado universalmente fue la mepscrina que presentaba una eficacia similar a la quinina pero mejor tolerada.

Durante las fases finales de la 2a. Guerra Mundial la cloroquina resultó ser el medicamento más eficaz. A partir de ésta se desarrollaron: la hidrocloroquina, la amodiaquina, la quimacrina; eficaces contra las formas eritrocíticas.

Existen fármacos supresivos que actúan sobre las formas eritrocíticas y suprimen el cuadro clínico, obteniéndose la llamada "cura supresiva", los más importantes de estos son: la quinina, cloroquina, hidrocloroquina, amodiaquina, quinacrina, cloroguanida, pirimetamina, sulfonamida y sulfonas.

Para el tratamiento contra las formas exoeritrocíticas se utiliza una combinación con la pirimetamina, primaquina y cloroguanida logrando la "cura radical" de las infecciones causadas por Plasmodium vivax y Plasmodium malariae.

El gametocida más efectivo es la primaquina.

Todos los medicamentos se administran por vía bucal, aunque en casos de urgencia se recurre a la vía parenteral hasta que sea necesario, cambiando a la vía bucal tan pronto sea posible.

Profilaxia.

Es preferible no utilizar en los bancos de sangre donadores que hayan padecido paludismo en los últimos años y en la actualidad es imprescindible realizar pruebas serológicas a los hemodonadores para excluir a los positivos.

Es recomendable la protección con telas de alambre en puertas y ventanas, sobre todo aplicar en paredes y muebles insecticidas residuales

En ocasiones se administra medicación supresiva, que por lo general no evita la infección, pero sí suprime el cuadro clínico, los medicamentos más utilizados son la cloriquina, la amodiaquina, la pirimetamina y el proguanil donde los tres primeros presentan ventaja de utilizarse en dosis semanales.

Malaria de los roedores.

Plasmodium berghei yoelii

DESCUBRIMIENTO.

En 1943 un equipo belga antimalaria empezó a trabajar en los mosquitos de ciertas áreas del bosque en el Congo Belga. El mosquito Anopheles durení, que tiene una distribución localizada (en las arboledas del Río Kinsanga) se encontró que frecuentemente succionaba sangre no humana y que mostraba un alto índice de esporozoítos. Esta sangre al ser examinada, daba reacciones positivas al suero antirrata, por lo que la sangre de los roedores de esta área fue investigada en busca de parásitos. Esto condujo al descubrimiento de una nueva especie de Plasmodium: Plasmodium berghei, en la sangre de la rata de árbol Thamnomys surdester surdester (Vinoke y Lipa). Este fue un descubrimiento de inmensa significación, ya que se encontró que era posible transmitir esta especie de malaria a algunos roedores de laboratorio, con el resultado de que las investigaciones de la malaria se facilitaron considerablemente.

VECTORES.

El huésped natural es el Anopheles durení, una especie de mosquito particularmente difícil de mantener en el laboratorio. Se han hecho muchos intentos para infectar otras especies más fácilmente conservables. No hay desarrollo en el mosquito común de laboratorio, Culex pipiens o Aedes aegypti, pero algunos resultados positivos se han obtenido con Anopheles maculipennis, Anopheles stephensi y Anopheles quadrimaculatus. La transmisión en el laboratorio puede ser, por supuesto, fácilmente efectuada mediante inyecciones intraperitoneales o intravenosas al ratón, pero la parasitemia pro-

ducida por la inoculación de sangre y la infección de los esporozoitos, pueden mostrar marcadas diferencias.

HUESPEDES DE LABORATORIO.

Los siguientes han sido infectados en mayor o menor grado: ratas, ratones, ratones de campo y ratas algodoneras. Los cobayos tienen una alta resistencia natural al igual que los conejos y en ambos, solamente se desarrolla una ligera parasitemia. En todos los huéspedes mencionados, la inmunidad se desarrolla con facilidad relativa, pero varía con la especie. Existen pruebas de que la inmunidad desarrollada por las ratas hembras puede ser transmitida a sus hijos por vía de la leche.

CICLO BIOLÓGICO.

El ciclo biológico sigue el patrón típico, Figura No. 4

Tanto la morfología como el ciclo fueron tratados en detalle por Sargent y Onet (1956) y Marcado y Costney (1951). Los siguientes puntos de interés pueden ser anotados en las infecciones de los ratones:

- (a) El ciclo preeritrocítico es probablemente de tres días. En las infecciones inducidas en la sangre, el período prepatente es de 3 a 6 días, el período patente es de 4 a 19 días, el período máximo de la parasitemia tiene lugar de los 3 a los 5 días, la mortalidad es del 100%.
- (b) Los trofozoitos tienen una definida predilección por los reticulocitos y hasta el 100% de éstos pueden estar infectados, en tanto que el porcentaje de infección de los eritrocitos maduros, puede ser aproximadamente del 100%. En contraste, los gametocitos se desarrollan en los eritrocitos maduros exclusivamente.

- (c) La exflagelación es rápida, requiriendo solamente de diez a treinta minutos.
- (d) El ciclo de esquizogonía es aproximadamente de 22 a 24 hrs y el número de merozoitos es de 6 a 16.
- (e) La ocurrencia de las fases exoeritrocíticas no ha sido confirmada completamente, pero puede ser similar a la del tipo de las aves y estar confinada al sistema reticuloendotelial.
- (f) Los gametocitos son propensos a desaparecer en pases en serie en los ratones, pero no en las ratas.

III. DIAGNOSTICO DE PALUDISMO POR EL LABORATORIO.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

FUNDAMENTO:

Técnica citoquímica utilizada para detectar anticuerpos específicos (2,9,21).

Ciertos compuestos al ser excitados por una luz de longitud de onda corta son capaces de adsorber energía luminosa y emitir a su vez luz de longitud de onda mayor. En algunos colorantes que tienen esta capacidad, la radiación de excitación se localiza en el campo ultravioleta y la luz emitida, en el espectro visible, estos son los llamados colorantes fluorescentes, ya que cuando se les somete a la luz ultravioleta suave producen luz brillante de tipo fluorescente. Se utilizan colorantes fluorescentes en luz ultravioleta, como los derivados de la fluoresceína, que dan fluorescencias (2).

- A. Las proteínas incluyendo los anticuerpos séricos tienen la capacidad de unirse a colorantes fluorescentes sin afectar sus propiedades biológicas e inmunológicas.
- B. Los anticuerpos específicos no conjugados (suero del paciente) reaccionan con el antígeno homólogo y las moléculas de anticuerpos se fijan in situ para formar complejos antígeno-anticuerpo.
- C. Los anticuerpos del paciente fijados (globulinas) pueden reaccionar con un conjugado anti-gamaglobulina humana para formar un complejo anti-gamaglobulina-anticuerpo-antígeno.

ELISA EN MANCHAS (DOT-ELISA)

FUNDAMENTO:

Este método depende de la conjugación de la enzima con el anticuerpo dirigido a su antígeno específico.

Las reacciones inmunoenzimáticas tienen como principio la fijación del antígeno por adsorción pasiva a una fase sólida (papel de nitrocelulosa), constando así de tres etapas (11):

PRIMERA ETAPA. El antígeno previamente adsorbido es puesto en contacto con una dilución apropiada del suero.

SEGUNDA ETAPA. Se adiciona el conjugado (anti-Ig humana) unida a una enzima.

TERCERA ETAPA. Se agrega el sustrato enzimático correspondiente, que da una coloración característica donde la intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de conjugado ligado al complejo antígeno-anticuerpo siendo así la concentración de anticuerpos presentes en el suero.

Las enzimas utilizadas generalmente son:

- la peroxidasa de rábano
- la fosfatasa alcalina
- glucosa-6 fosfato DH

las cuales se acoplan al anticuerpo através de enlaces cruzados, generalmente por glutaraldehido y demalefida.

IV. MATERIAL Y METODOS.

Se tomaron en forma aleatoria 72 sueros sanguíneos del estado de Oaxaca, 151 de Nuevo León, 73 de Guerrero, pertenecientes a población general y 27 de Sonora, estos últimos provenientes de estudiantes de la Universidad de dicho estado de ambos sexos con edades que oscilaron entre 21 y 28 años.

Las muestras provenientes de los estados de Oaxaca y Nuevo León fueron adquiridas através de la Encuesta Nacional Serológica y en el caso del estado de Guerrero, éstas pertenecieron a una región de dicho estado.

Dichos sueros fueron mantenidos en refrigeración durante su estudio para evitar una disminución importante en sus títulos que se pudiesen obtener en el resultado.

La cepa empleada en este experimento (Plasmodium berghei yoelii) fué donada por el Laboratorio de Malaria del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina UNAM.

Su mantenimiento se hizo por pases sucesivos en ratones, inoculando 5 roedores por semana (12).

La cúspide de la parasitemia suele alcanzarse de 6 a 8 días después de la inoculación, cuando la densidad de la parasitemia alcanza alrededor del 30 - 40% de eritrocitos infectados por esquizontes, tiempo que puede acortarse o alargarse por la edad de los ratones empleados o por variación en la cantidad del inóculo, este se realiza por vía intraperitoneal, utilizando solución salina isotónica (0.15M) en proporción 5 gotas de sangre por 1 ml de solución, inyectando así de 0.2 ml por cada animal (Figura No.5).

En cuanto a la cepa de Plasmodium vivax, utilizada como referencia para determinar el cruce antigénico entre dicha cepa y la mencionada anteriormente, fué obtenida de un enfermo previamente diagnosticado por medio de gota gruesa como paludismo.

I. OBTENCION DEL ANTIGENO.

Se sacrificaron 5 ratones de aproximadamente 20 gra. de peso sangrados por la vena marginal de la órbita, semanalmente (Figura No.5).

La sangre obtenida fué tomada con un anticoagulante: heparina contenida en tubo de vacutainer de 10 ml (B-D No. 4720 3200 U).

1.1 Sensibilización de láminas con antígeno para Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para Paludismo.

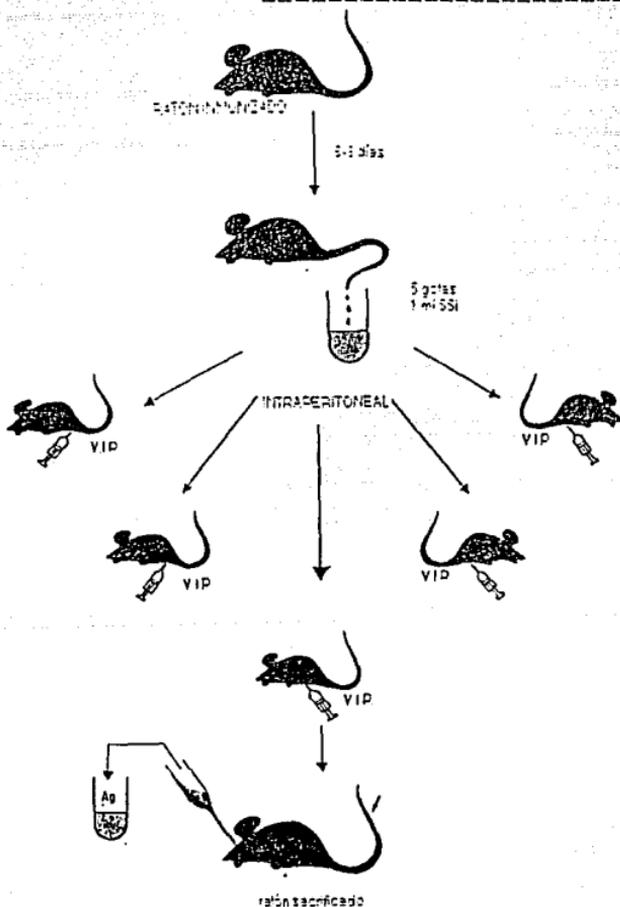
El antígeno consistió en una película delgada procedente de sangre parasitada con P. berghei yoelii y P. vivax sobre una laminilla de vidrio, que se dividió en 12 campos circulares en donde se colocó al antígeno (11,16,21,22).

Las preparaciones del antígeno deben contener las formas asexuales eritrocíticas maduras (esquizontes), lo que le confiere una mayor antigenicidad y sobre todo sensibilidad a la técnica (11,21,22).

Las laminillas con el antígeno fueron almacenadas a -20°C, hasta su uso posterior.

FIGURA 5

MANTENIMIENTO DE *Plasmodium berghei yoelii*.



1.2 Antígeno para ELISA en manchas (DOT-ELISA).

1.2.1 Preparación del antígeno.

La sangre parasitada con P. berghei yoelii y P. vivax para la técnica de DOT-ELISA fué sometida en 5 tratamientos para la obtención del antígeno (16,18).

a. Concentracion.

- En un vaso de precipitado se colocó la sangre parasitada con P. berghei yoelii por un lado y P. vivax por otro con agua destilada en una proporción 1:10,
- Se mantuvo en agitación constante durante 10 min.,
- Se decantó la solución del vaso en tubos de 13 x 100 y se prosiguió a centrifugar a 3 500 rpm durante 30 min.,
- El paquete obtenido fué sometido a 6 lavados consecutivos con SSI 0.15M, resuspendiendo en cada uno de ellos.

b. Separacion con Ficoll.

- La sangre parasitada fué centrifugada a 1500 rpm durante 10 min.,
- El paquete obtenido fué separado y lavado 3 veces con SSI 0.15M a 3 400 rpm durante 5 min.,
- Posteriormente fué tratado con FICOLL para separar células rojas de blancas.,
- El paquete obtenido se lavó 3 veces con SSI 0.15M a 3 200 rpm durante 15 min.

c. Congelacion - Descongelacion.

- La sangre parasitada fué congelada y descongelada en hielo seco - alcohol (v/v) 4 veces,
- Se separó el paquete por centrifugacion, el cuál fué lavado 3 veces con SSI 0.15M a 3 400-rpm durante 10 min.

d. Sonicado.

- La sangre parasitada fué llevada a una proporción 1:10 con PBS, manteniendo en agitaci6n constante durante 10 min.,
- Se sonicó 30 seg.,
- Se centrifugó a 3 400 rpm durante 30 min.,
- El paquete obtenido (Ag soluble) fué lavado con PBS 3 veces a 3 400 rpm durante 10 min. cada ocasion,
- El sedimento obtenido fué resuspendido en 0.5 ml de PBS.

e. Tratamiento con H2O2.

- La sangre parasitada se llevó a una proporción 1:10 con H2O2 0.1M con el objeto de lisar los globulos rojos y dejar libre los parásitos,
- Se agitó moderadamente durante 5 min, y se dejó reposar 5 min.,
- Se prosiguió a centrifugar a 1 500 rpm durante 5 min.,
- El sobrenadante obtenido se desechó y el paquete celular se resuspendió en PBS pH=7.4 (1 ml).

1.2.2 Sensibilización de discos de nitrocelulosa con antígeno para -
DOT-ELISA (ELISA en manchas).

1. Se utilizaron discos de nitrocelulosa de 5mm de diámetro de 0.45 umts. de poro (Millipore tipo HA), estos se manejaron con pinzas para evitar su posible contaminación. Fueron colocados con el lado opaco hacia arriba, marcándolos con un punto pequeño para evitar confusiones.
2. El antígeno previamente preparado a la concentración necesaria, fué descongelado para sensibilizar los discos hasta que este alcanzó la temperatura ambiente.
3. Los discos fueron sensibilizados con 1 ul de antígeno, utilizando una micropipeta (Hamilton).
4. Estos ya sensibilizados se colocaron en cada uno de los pozos de las placas de microtitulación.
5. Se incubaron a 37°C durante 15 min.
6. Se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente listos para iniciar el procedimiento de la reacción.

2. TECNICAS UTILIZADAS.

2.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

REACCION PROPIAMENTE DICHA:

1. De cada suero control positivo, negativo y problema se tomarón 10 ul, se les efectuó diluciones a partir de 1:8 hasta 1:64

- con solución amortiguadora de fosfatos PBS pH=7.2.
2. De cada dilución de los sueros tanto controles como problema (positivo, negativo, PBS) se colocaron 10 ul en cada pozo de las laminillas previamente preparadas con antígeno (P. berghei yoelii, P. vivax).
 3. Las laminillas fueron colocadas en una cámara húmeda, la cuál se introduce en una incubadora a 37°C durante 30 min.
 4. Al terminó de la incubación se debe cerciorar de que las gotas no se hayan mezclado, ni secado durante la incubación.
 5. Las laminillas fueron lavadas con PBS y colocadas en una caja de Koplín con solución amortiguadora durante 5 min. para eliminar exceso, posteriormente las preparaciones son bañadas 2 veces en agua destilada, con el objeto de eliminar sales provenientes del PBS ya que en un momento dado pueden originar que las gotas o muestras se mezclen.
 6. Se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente, prosiguiendo así a colocar 10 ul del conjugado, solución que consta de una anti-Ig específica marcada con fluoresceína y Azul de Evans (reactivo utilizado para reducir la fluorescencia inespecífica) diluido en PBS pH=7.4 a una dilución de 1:256.
 7. Se repitió el proceso de incubación, lavado y secado de la misma manera como se indicó en los pasos 3,4,5,6.
 8. Secas las laminillas se prosiguió al montaje, colocando 1 gota de glicerina y un cubreobjetos para observar el microscopio de epifluorescencia con el objetivo de 100X, estableciéndose así la positividad o negatividad de los sueros.

LECTURA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Se enfocó el campo de observación con el objetivo de 40X, prosiguiendo a colocar una gota de aceite de inmersión enfocando nuevamente, pero ahora con el objetivo de 100X.

Al enfocar el campo se comprueba la presencia de fluorescencia sobre las estructuras características de los parásitos. Tomando en cuenta la preparación del antígeno, estas formas se tratarán principalmente de formas asexuales maduras, por lo tanto en las formas bien conservadas y estructuradas se observará fluorescencia de membrana en estructuras tipo roseta, es decir, sobre las membranas de los merozoítos (11).

Para el caso de P. vivax sus estructuras son menos armónicas y más difusas.

CRITERIOS DE POSITIVIDAD.

La reacción de inmunofluorescencia se consideró positiva a partir de la dilución 1:32 (algunos autores consideran la dilución mínima reactiva específica de 1:40 (11)).

2.2 ELISA en manchas (DOT-ELISA).

REACCION PROPIAMENTE DICHA:

1. En cada uno de los pozos de la microplaca donde previamente se han colocado los discos sensibilizados con el antígeno, se colocaron 75 ul de una solución bloqueadora de ASB (Albumina Serica Bovina) fracción V ó bien Leche Sveltes (Nestlé Sveltes Leche descremada en polvo) al 0.5% (p/v), agitando moderadamente durante 1 min., incubandose así durante 15 min. a 37°C en cámara húmeda.
2. Al término de la incubación la solución bloqueadora fué aspirada por medio de una bomba de vacío y se prosiguió a lavar 2 veces con 150 ul de PBS - Tween 0.05% w/v, agitando durante 1 min. en el primer lavado y en el segundo dejando reposar de 4 a 5 min. antes de aspirar la solución de lavado.
3. Se agregó 75 ul de la dilución de los sueros (tanto problema como controles positivo, negativo, PBS y antígeno) los cuáles fueron diluidos con ASB - PBS ó Leche Sveltes - PBS al 0.1% (w/v) agitando moderadamente durante 1 min., incubandose a 37°C durante 30 min. en cámara húmeda.
4. Posteriormente la placa es lavada 3 veces con 150 ul PBS - Tween 20 al 0.05% (w/v) agitando durante 1 min. y en el último lavado dejando reposar la placa de 4 a 5 min. antes de aspirar la solución de lavado.
5. Se prosiguió a colocar 50 ul de conjugado (peroxidasa) diluida 1:250 en ASB - PBS ó Leche Sveltes - PBS al 0.1%, se agitó moderadamente y se incubó a 37°C por 30 min.
6. Los pozos fueron lavados de la misma manera que en el paso 4.
7. Se añadió 150 ul de sustrato preparado inmediatamente antes de su

uso; 0.003 mg de 4 Cloro 1 Naftol Sol. 1

10 ml de PBS + 800 ul de Sol. 1 + 5 ul de H2O2

se preparó en un frasco ambar para evitar contacto con la luz y se incubó a 37°C durante 30 min.

8. Finalmente se aspiró el sustrato y se lavo de la misma manera que en el paso 6, se dejó secar y se prosiguió a tomar la lectura (13).

LECTURA DE DOT-ELISA.

La presencia de una coloración café a morado en el centro de los discos de nitrocelulosa donde fué colocado el antígeno (Ag), se consideró como positiva, indicándose así el título al cual se presenta la muestra en estudio.

V. SOLUCIONES Y REACTIVOS.

Inmunofluorescencia Indirecta.

- . Solución Salina de Fosfatos (PBS) pH=7.2

a) Solución Madre (10X)

Fosfato disódico dihidratado

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$) 17 g

Fosfato monosódico monohidratado

($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$) 2.2g

Cloruro de sodio

(NaCl) 81.7g

Agua destilada c.s.p. 1000 ml

b) Solución de PBS de uso (1X)

De la solución madre se toman 100 ml y se lleva a un volumen final de 1000 ml con agua destilada.

- . Azul de Evans; solución al 1%
- . Conjugado (antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína).

En el comercio existen diversas marcas de esta reacción, presentando así una gran variedad de calidad, por lo cual es necesario controlar cada lote y titularlo. El título de la antigamaglobulina marcada depende de la fuente de iluminación y del sistema óptico a utilizar.

- . Líquido de montaje

Consiste de: 9 partes de glicerina destilada neutra

1 parte de buffer de fosfatos pH=8 0.1M

. **Sueros Controles**

Los sueros controles para las reacciones serológicas se obtienen de un "pool" de sueros de los cuales se conoce la positividad y/o negatividad para los mismos.

ELISA en manchas.

. **Solución Salina Amortiguada pH=7.0 - 7.2**

(PBS DOT - ELISA)

- NaCl	16 g
- Na2HPO4	2.3g
- KH2PO4	0.4g
- KCl	0.4g

Aforar con agua destilada a 2000 ml.

. **Leche Sveltes al 5% Sol. 1**

0.5 g de Leche Sveltes es disuelta en 10 ml de agua destilada

. **Leche Sveltes al 1% Sol. 2**

Se toman 2 ml de la Sol. 1 (Leche Sveltes al 5%) y se afora a 10 ml con PBS DOT-ELISA pH=7.0 - 7.2

. **Solución PBS - Tween 20 (0.05%)**

En 50 ml de PBS DOT-ELISA se disuelven 25 ul de Tween 20.

. **Conjugado de Peroxidasa**

Antigamaglobulina unida a una enzima (peroxidasa), la dilución a utilizar se debe determinar para cada partida de conjugado.

. Sustrato 4Cloro1Naftol (4C1N)

0.003mg de 4C1N es disuelto en 2 ml de MeOH absoluto, se toman de esta solución 800 ul y se lleva a 10 ml con PBS DOT-ELISA, agregando 5 ul de H2O2.

. Sueros Controles

Los sueros controles para las reacciones serológicas se obtienen de un "pool" de sueros de los cuales se conoce la positividad y negatividad para los mismos.

VI. RESULTADOS.

A) Los resultados de los cinco tratamientos realizados para la obtención del antígeno (Ag) para ELISA en manchas (DOT-ELISA), fueron los siguientes:

A.1) Concentración.

El paquete obtenido finalmente, tomó una coloración café-negrusco de apariencia compacta en forma de partículas sumamente difíciles de resuspender.

Se realizó frotis directo de la suspensión y se observaron membranas de eritrocitos y pigmento palúdico.

A.2) Separación con FICOLL.

El paquete tomó una coloración más clara en comparación con el del procedimiento anterior, pero de apariencia similar, en cuanto al frotis directo se observó únicamente membranas de eritrocitos.

A.3) Congelación - Descongelación.

El paquete nuevamente tomó una coloración café, pero difícil de resuspender, en frotis directo se observaron membranas de glóbulos rojos y pigmento palúdico.

A.4) Tratamiento con H2O2.

Al ser resuspendido el paquete en PBS (1 ml), este tomó una coloración café, en frotis directo se observaron parásitos en su fase madura (esquizontes) y membrana de eritrocitos, los cuales se trataron de eliminar através de una serie de lavados, corriéndose el riesgo de perder los parásitos.

El antígeno fué fijado con formol al 1% para ser utilizado posteriormente para sensibilizar los discos de nitrocelulosa para la técnica de DOT-ELISA.

A.5) Sonicado.

A la suspensión obtenida finalmente se le efectuó frotis directo observándose pigmento palúdico y membranas de eritrocito.

B) Las 323 muestras procesadas provenientes de diferentes estados de la república fueron estudiadas por las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA en manchas (DOT-ELISA).

B.1) INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

En el Cuadro No.1 observamos que del total de muestras 323, 82 resultaron positivas a Plasmodium vivax, lo cuál nos da una prevalencia del 25.38%, en cambio 79 lo fueron a Plasmodium berghei yoelii que equivale a 24.45%. Es importante señalar que de las 82 muestras positivas a P. vivax, 79 también lo fueron a P. berghei yoelii, lo cuál nos muestra la similitud entre ambas cepas, ya que la diferencia en cuanto a prevalencia es de un 0.93%.

El Cuadro No.2 corresponde a la procedencia de las muestras en estudio, la positividad y prevalencia frente ambos

antígenos (P. vivax y P. berghei yoelii).

Los Cuadros No.3 y 4 nos muestran los resultados serológicos con el título de anticuerpos correspondientes a cada cepa, haciendo incapie en la procedencia de las muestras.

El criterio de positividad utilizado fué a partir de la dilución 1:32, donde en el Cuadro No.5 y su representación gráfica en la Figura No.6, muestran la similitud entre ambos antígenos, es decir, comprobando así su elevado cruce antigénico.

La cepa de Plasmodium berghei yoelii resultó ser útil a la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta para diagnóstico serológico de paludismo humano.

B.2) ELISA en manchas (DOT-ELISA)

El antígeno que requiere la técnica de DOT-ELISA debe ser un reactivo sumamente purificado, por lo que el obtenido en este estudio debido a la presencia de hemoglobina (Hb), interfirió en la lectura de la placa al manchar de igual manera al disco de nitrocelulosa, en el cuál se "corrió" dicha reacción. Los tratamientos previos elaborados al reactivo antigénico no resultaron satisfactorios debido a la presencia de la hemoglobina (Hb), que siempre interfirió.

CUADRO 1

RESULTADO DE LAS 323 MUESTRAS ESTUDIADAS.

Antígenos	POSITIVAS	
	Número #	Porcentaje %
<u>Plasmodium vivax</u>	82	25.38
<u>Plasmodium berghei</u> <u>yoelii.</u>	79	24.45

CUADRO 2

PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.

Procedencia	No. Muestras	POSITIVAS		PORCENTAJE	
		P. vivax #	P. berghei #	P. vivax %	P. berghei %
Nvo. León	151	8	13	5.29	8.6
Oaxaca	72	26	23	36.11	31.94
Sonora	27	4	-	14.81	-
Guerrero	73	44	43	60.27	58.9
TOTAL	323	82	79	25.38	24.45

CUADRO 3

RESULTADOS SEROLOGICOS UTILIZANDO COMO ANTIGENO

Plasmodium vivax.

Procedencia	TITULOS					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Nvo. León	8	8	8	8	8	7
Oaxaca	27	27	26	26	26	26
Sonora	4	4	4	4	4	3
Guerrero	45	45	44	44	44	44

CUADRO 4

RESULTADOS SEROLOGICOS UTILIZANDO COMO ANTIGENO

Plasmodium berghei yoelii.

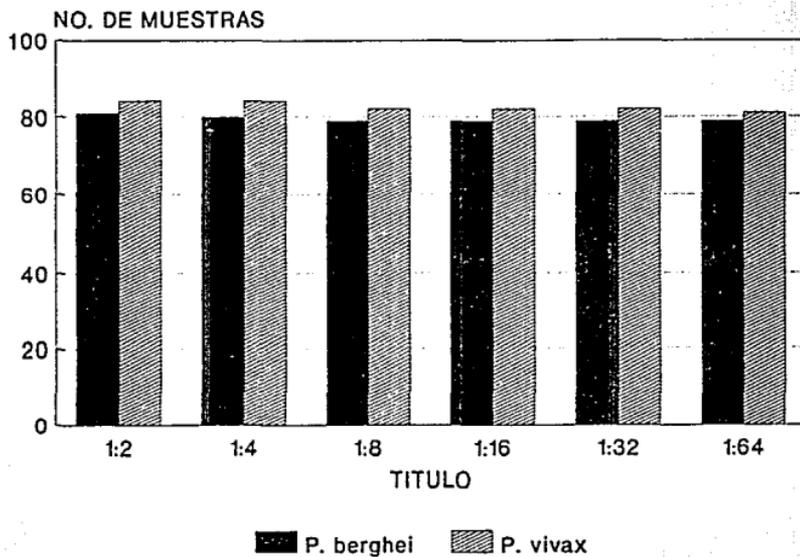
Procedencia	TITULOS					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Nvo. León	14	14	13	13	13	13
Oaxaca	23	23	23	23	23	23
Sonora	-	-	-	-	-	-
Guerrero	44	43	43	43	43	43

CUADRO 5

RESULTADOS SEROLOGICOS EMPLEANDO DOS CEPAS DE PALUDISMO

Titulo	No. Muestras	
	P. berghei	P. vivax
1:2	81	84
1:4	80	84
1:8	79	82
1:16	79	82
1:32	79	82 ⁺
1:64	79	81

RESULTADOS SEROLOGICOS EMPLEANDO DOS CEPAS DE PALUDISMO



UTILIZANDO LA TECNICA DE IFI

FIGURA 6

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V. CONCLUSIONES.

La técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), resultó ser sencilla y específica con ambos antígenos, comprobándose así el elevado cruce antigénico sospechado previamente entre Plasmodium vivax y Plasmodium berghei yoelii (25.3% VS 24.45%).

Por otro lado, la técnica de ELISA en manchas (DOT-ELISA) no funcionó en este caso por requerirse de un antígeno sumamente purificado, ya que debido a la gran sensibilidad de la técnica la hemoglobina residual da falsos positivos, al manchar el papel del mismo color de un DOT-ELISA positivo.

El inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos antimalaria tiene ciertas limitaciones puesto que la positividad del suero no necesariamente indica enfermedad actual.

Estas técnicas (IFI, HAI, ELISA, etc.) proporcionan sin duda una importante ayuda en el diagnóstico de una enfermedad activa, particularmente cuando se aplica a grupos de paciente como; centros de transfusión sanguínea y encuestas seroepidemiológicas e incluso en individuos negativos a la gota gruesa, pero que el transfundir a pacientes con su sangre han enfermado de paludismo. Por lo tanto la importancia de estas técnicas es su utilidad en la vigilancia epidemiológica de la malaria y el evitar el riesgo de infección por hemotransfusión.

Otras ventajas de las técnicas para la detección de anticuerpos antimalaria son la del bajo costo (relativo), la sensibilidad y simplicidad, sin embargo su estandarización a veces no es nada fácil.

En cuanto a los resultados de los diferentes grupos estudiados, observamos que son lógicos ya que la mayor positividad del estado de Guerrero con respecto a Oaxaca es el esperado si tomamos en cuenta que las muestras de Guerrero fueron tomadas durante un brote epidémico, en cambio las de Oaxaca fueron de población abierta en un tiempo normal.

Respecto a Sonora la positividad del 14.8% a Plasmodium vivax se explica por la anterior procedencia de los estudiantes a quienes se les tomó la muestra sanguínea. En este caso el cruce Plasmodium vivax VS Plasmodium berghei yoelii fué inexistente.

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. Antuñano, Fco. J., G. Schmunis.
Diagnóstico de Malaria. Publicación Científica No.512 Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. 1988.
2. Bach, J.F., Ph. Lesavre.
Inmunología. Ed. Masson, S.A. 1983
3. Biagi. Enfermedades Parasitarias. Malaria. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F., 1974.
4. Bidwell, D.E., Voller, A.
Malaria diagnosis by enzyme-linked immunosorbent assays. Brit. med. J. 1741 - 1748; 1981.
5. Boletín Mensual de Epidemiología.
Sist. Nacional de Salud Vol 4 (11) 1989.
6. El Control de la Malaria en las Americas.
Informe de un grupo de estudio convocado por el director de OPS/OMS 12 - 15 abril, 1977. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 1977.
7. Epidemiología del Paludismo en México.
Escuela de Salud Pública de México 1979.

8. Evolución del Paludismo en México.
Análisis Epidemiológico. Dirección General de Epidemiología. Dirección General de Medicina Preventiva. Salud Pública México.
1989.
9. Fudenberg H.H., D.P. Stites, J.L. Caldwell, J.V. Wells.
Inmunología Básica y Clínica, 4a. Ed. El Manual Moderno, S.A.
1983.
10. Hunter, Frye, Swartzwelder.
Manual de Medicina Tropical. La Prensa Médica Mexicana, 3a. Ed.
México, D.F.
11. Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas. "Dr. Mario Fatala Chaben". Parasitosis Humanas Producidas por protozoos, Malaria 1989.
12. Malagón, F.
Cultivo axénico continuo de plasmodios de mamífero.
I. Plasmodium berghei. Rev. Lat-amer. Microbiol 19:233-240, 1977.
13. Pappas, M.G; Hajkowski, R; Cannon, L.T. Sr.
Hackmeyer, W.T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol 14 (3-4): 239-49. 1984.

14. Perrin, L; Perez, A; Chizzolini, C.
Malaria: immunity, vaccination and immunodiagnosis. *Experientia*
40(12): 1343-50. 1984.
15. Sanchez, B.B: Repercusiones clinicas y socioeconomicas de la Ma-
laria por Plasmodium vivax en el Municipio de Iguala, Gro. Tesis
de Especialidad, Facultad de Medicina. División de Estudios Su-
periores. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
1987.
16. Schapira, A; Fogh, S; Pedersen, N.S.
Detection of antibodies to malaria: comparison of results with
ELISA, IFAT and crossed immunoelectrophoresis. *Acta Pathol Micro-
biol Immunol Scand (b)* Dec:92(6);299-304; 1984.
17. Smith, J.D.
Introducción a la Parasitología Animal. Compañía Editorial Con-
tinental, S.A. México.
18. Tosta, C.E: et al.
Plasmodium yoelii and Plasmodium berghei: isolation of infected
erythrocytes from blood by colloidal silica gradient centrifuga-
tion. *Exp Parasitol* 50:7-15, 1980.
19. Velasco, C.O., J. Tay, R. Lara, M. Gutierrez.
Parasitología Médica. Ed. Mendez Cervantes. México, 1985.

20. Voller, A; Illenit.

Serological testing in malaria. Bull World Hlth Org.;47. 357-372
1972.

21. Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D.E. (1976)

Enzyme immunoassays for diseases. Trans Royal Soc Trop Med Hyg,
70; 98-106

22. Waiki, S; Suzuki, M.

Development and decline of antiplasmodial indirect fluorescent
antibodies in mice infected with Plasmodium berghei (NK 65) and
treated with drugs. Bull World Hlth Org. 1974;50,521-526.