



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

9
2oj-

UNIVERSIDAD NACIONAL ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
AVENIDA DE MEXICO "ZARAGOZA"

DETERMINACION DE IgA ESPECIFICA A
Toxoplasma gondii EN SALIVA POR
MEDIO DEL INMUNOENSAYO LIGADO A
ENZIMA (ELISA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S :
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
LETICIA ORALIA CINTA MADRID



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.

CONTENIDO

INTRODUCCION.	1
TOXOPLASMOSIS.	3
CARACTERISTICAS ANTIGENICAS DEL <u>Toxoplasma gondii</u> .	9
RESPUESTA INMUNE.	12
PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y BIOLOGICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.	15
METODOS INMUNOENZIMATICOS.	22
FUNDAMENTACION DEL TEMA.	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	39
OBJETIVOS E HIPOTESIS.	41
MATERIAL Y METODOS.	42
RESULTADOS.	51
ANALISIS DE RESULTADOS.	56
CONCLUSIONES.	71
BIBLIOGRAFIA.	73

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	CICLO DE <u>Toxoplasma gondii</u> .	7
FIGURA 2	TROFOZOITO DE <u>Toxoplasma gondii</u> .	8
FIGURA 3	ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO O INMUNOGLOBULINA	19
TABLA 1	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS	20
FIGURA 4	PAPEL DE LA IgAs EN LA PROTECCION DE LA SUPERFICIE MUCOSA	21
FIGURA 5	PRINCIPIO DEL INMUNOENSAYO HOMOGENEO	23
FIGURA 6	EMIT	23
FIGURA 7	ELISA COMPETITIVO	25
FIGURA 8	INMUNOENSAYO ELISA SANDWICH	30
FIGURA 9	ELISA DOBLE SANDWICH	31
FIGURA 10	ELISA INDIRECTO	32
FIGURA 11	METODOS DE CONJUGACION (NAKANE)	33
FIGURA 12	METODOS DE CONJUGACION (AVRAMEAS)	33
TABLA 2	ENZIMAS EMPLEADAS EN LA OBTENCION DE CONJUGADOS	34
TABLA 3	VENTAJAS DEL METODO ELISA	35
TABLA 4	RESULTADOS	53
TABLA 5	RESULTADOS	54
GRAFICA 1	ELISA	59
GRAFICA 2	ELISA/IFA = 0	60
GRAFICA 3	ELISA/IFA = 1:64	61
GRAFICA 4	ELISA/IFA = 1:128	62
GRAFICA 5	ELISA/IFA = 1:256	63
GRAFICA 6	TOXOPLASMOSIS EN NIÑOS	64
GRAFICA 7	TOXOPLASMOSIS EN NIÑAS	65

GRAFICA 8	TOXOPLASMOSIS EN ADULTO MASCULINO	66
GRAFICA 9	TOXOPLASMOSIS EN ADULTO FEMENINO	67
GRAFICA 10	CORRELACION IgAs/(IgM, IgG, IgA) POSITIVO	68
GRAFICA 11	CORRELACION IgAs/(IgM, IgG, IgA) NEGATIVO	69
GRAFICA 12	CORRELACION IgAs/(IgM, IgG, IgA) POS.-NEG.	70

INTRODUCCION

Las infecciones parasitarias de importancia para el hombre se pueden incluir en dos grupos dependiendo del agente etiológico que las originen, así tenemos (27) :

I.- Infecciones causadas por helmintos, que pueden ser por:

- a) Nemátodos: ej. Ancylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides
- b) Tremátodos: ej. Schistosoma mansoni
- c) Céstodos: ej. Taenia saginata, T. solium

II.- Infecciones causadas por protozoarios, que incluyen:

- a) Flagelados: ej. Trichomonas vaginalis, Trypanosoma cruzi
- b) Rhizópodos: ej. Entamoeba histolytica, E. gingivalis
- c) Esporozoarios: ej. Eimeria, Toxoplasma gondii, Plasmodium
- d) Ciliados: ej. Balantidium coli

Las infecciones parasitarias, a menudo tienden a ser crónicas, con pocos síntomas o ninguno y la persona infectada puede transformarse en portador sin mostrar signos clínicos.

Dentro de las enfermedades parasitarias que afectan a la población mundial se encuentran las producidas por protozoarios, éstas son especialmente importantes debido a que en África y otros países con clima tropical la tripanosomiasis y el paludismo son las más importantes causas de morbilidad y mortalidad, también la amibiiasis asintomática y la toxoplasmosis se encuentran diseminadas en todo el mundo.

El uso de medicamentos inmunosupresores para el control de las neoplasias y rechazo de trasplantes ha provocado la

incidencia de infecciones causadas por protozoarios que anteriormente eran subclínicas, como la toxoplasmosis, la cual es la principal causa de muerte en pacientes que presentan inmunosupresión. La infección por toxoplasma en el hombre generalmente es asintomática y da por resultado la producción de anticuerpos IgA, IgG e IgM que pueden demostrarse por diversas técnicas como la inmunofluorescencia indirecta y los métodos inmunoenzimáticos.

TOXOPLASMOSIS

Agente etiológico : Toxoplasma gondii

Características : Parásito de distribución cosmopolita, perteneciente a la clase Sporozoa, a la subclase Coccidia y a la subfamilia Toxoplasmatinae (46), aislado del roedor Ctenodactilis gondii por Ch. Nicolle y L. Manceaux. Puede desarrollarse en una gran variedad de huéspedes vertebrados aunque su huésped definitivo es el gato casero y otros animales de la familia Felidae (29); se reproduce por división binaria llamada Endodiogenia, en la cual primero se divide el núcleo, después replica el conoide y las demás estructuras, posteriormente por una especie de gemación interna se individualizan los dos parásitos hijos; este ciclo se realiza extraintestinalmente en tejidos humanos y de otros mamíferos. También presenta un ciclo sexual (Esquizogónico) en las células de la mucosa del intestino del gato en donde madura para producir esquizontes, gametocitos y finalmente oocistos que son expulsados en las heces (fig. 1) (5,29). Cada oocisto está constituido en su interior por dos esporocistos, los cuales se componen de cuatro esporozoitos alargados y encorvados. Los oocistos en heces fecales de gato se vuelven infectivos de 1 a 5 días y pueden permanecer viables por un año. Los trofozoitos de toxoplasma pueden encontrarse en ganglios linfáticos, mesentéricos y en otros órganos del gato, éstas formas no intestinales son las únicas que se ven en vertebrados; pueden multiplicarse con rapidez (taquizoitos) (fig. 2), los cuales son los causantes de

la diseminación inicial de la infección y destrucción de los tejidos, o multiplicarse con más lentitud (bradizoitos) que son los que forman los quistes. El toxoplasma puede parasitar muchos tejidos, principalmente pulmón, corazón, órganos linfoides y células del sistema nervioso central (5, 15, 16, 29, 46).

Patogénesis en el hombre: El hombre se contagia de los gatos, perros, ovejas y otros animales, la infección puede ser adquirida por 5 rutas diferentes: ingestión de oocistos en material contaminado por heces de gato, ingestión de quistes tisulares en carne cruda o mal cocida, vegetales y frutas sin pelar y mal lavados, paso trasplacentario de trofozoitos, transfusión de sangre conteniendo leucocitos infectados y trasplante de un órgano infectado (16, 19, 26, 46). Los parásitos son fagocitados en el íleon o entran a células del cuerpo. alrededor se forma una zona de necrosis, son destruidos por monocitos y neutrófilos, pero los taquizoitos permanecen vivos en macrófagos y difunden por la circulación.

La toxoplasmosis puede ser :

I.- Aguda : es asintomática del 80 al 90% de los casos, puede presentar linfadenopatía cervical, fiebre, malestar, sudoración nocturna, inflamación de la garganta, erupción maculo papular. hepatoesplenomegalia o aparición de linfocitos atípicos. En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida es el caso más común de infección oportunista del Sistema Nervioso Central, causando abscesos, encefalitis u otra encefalopatía, deterioro

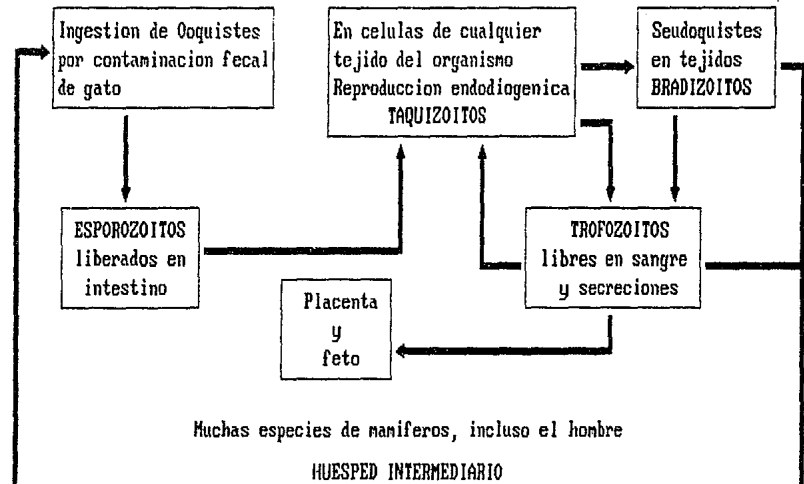
cognoscitivo, dolor de cabeza, coriorretinitis y manifestaciones sistémicas (26).

II.- Congénita : ocurre cuando una mujer es infectada durante el embarazo, solo cerca del 10 % de las mujeres infectadas demuestran síntomas y por consiguiente la enfermedad no es usualmente detectada sin un análisis serológico. La infección en el primer trimestre de embarazo produce los más severos efectos sobre el feto, puede resultar un aborto o nacimiento del producto muerto, los niños que logran sobrevivir pueden presentar hepatoesplenomegalia, convulsiones, ictericia, hidrocefalia, coriorretinitis, sordera, retraso mental, fiebre, microcefalia, linfadenopatía, trombocitopenia, vómito, diarrea, cataratas, erupción, hipotermia y neumonitis. La mayoría de los niños afectados son asintomáticos al nacer pero demuestran evidencia del daño cuando son observados varios meses o años después (15, 19, 26, 41).

DIAGNOSTICO : La infección por Toxoplasma gondii induce la producción de inmunoglobulinas del tipo IgA, IgG e IgM, en algunos casos los títulos altos permanecen por largos periodos, sobre todo la IgG, esto dificulta la interpretación de las pruebas serológicas. La caracterización antigénica del parásito unido a técnicas como ELISA, aglutinación inmunoabsorbente (ISAGA), inmunoblot, ELIFA (Enzyme Linked Immune Filtration), inmunocaptura y el uso de anticuerpos monoclonales ha permitido establecer el tipo de inmunoglobulina predominante en las

diversas etapas de la enfermedad permitiendo hacer un diagnóstico más certero del transcurso de la enfermedad (8, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45, 48). Dependiendo del método usado son los tipos de inmunoglobulinas específicas a Toxoplasma gondii que se identifican, coincidiendo la mayoría en que la IgM e IgG se detectan en la fase aguda de la enfermedad; el método ELIFA y ELISA en la fase temprana de la toxoplasmosis congénita detectan IgM, IgG e IgA, el ELISA también las detecta en la toxoplasmosis crónica; en el Inmunoblot se detecta en mayor título IgA en la etapa temprana y posteriormente IgG e IgM. Pinnon JM et al. (1990) empleando el método de inmunocaptura encuentra que en la infección aguda se detecta IgE cuando IgG es negativa y los niveles de IgM e IgA no son significativos (36) . Los métodos antes mencionados son alternativos para usarlos en lugar de los métodos clásicos del diagnóstico de esta enfermedad.

CICLO PARENTERAL



Muchas especies de mamíferos, incluso el hombre

HUESPED INTERMEDIARIO

HUESPED DEFINITIVO

Gatos y algunas otras especies de felinos

CICLO
SEXUADO

CICLO
ESQUIZOGONICO

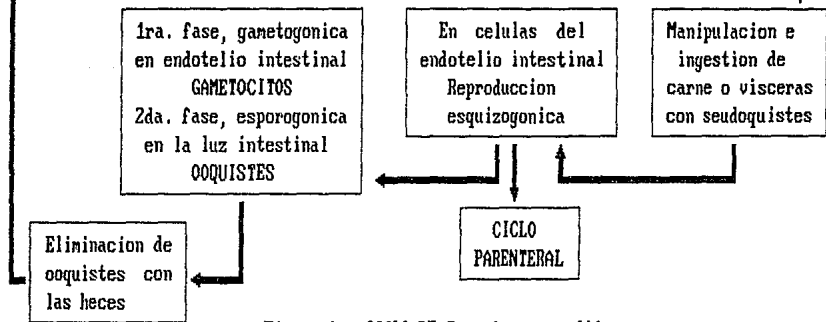


Figura 1 CICLO DE *Toxoplasma gondii*

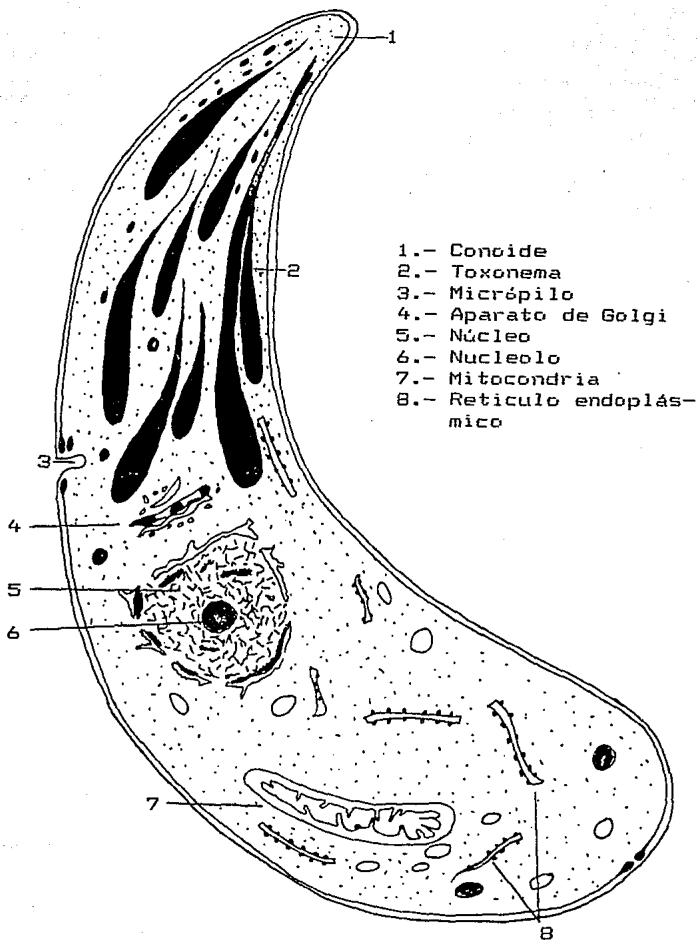


Figura 2 TROFOZOITO DE Toxoplasma gondii

CARACTERISTICAS ANTIGENICAS DEL Toxoplasma gondii

La aplicación de los anticuerpos monoclonales para detectar antígenos de parásitos aunado a técnicas como inmunoensayo enzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), electroforesis e inmunoprecipitación han permitido la identificación y localización de los constituyentes antigénicos del Toxoplasma gondii (1, 10, 11, 20, 21, 23, 36). Handman E et al en 1980 (21) marcaron radioactivamente a taquizoitos del parásito con ^{125}I y ^{35}S , solubilizan las proteínas de membrana e identifican por electroforesis cuatro proteínas con PM de 43, 35, 27 y 14 KDa, las cuales también fueron detectadas por anticuerpos monoclonales. Araujo et al (1) desarrollan cuatro anticuerpos monoclonales y por medio de un método ELISA detecta tres antígenos de membrana y uno citoplásmico. Estudios realizados por Johnson et al en 1983 (23) establecen la existencia de otro componente antigénico de 98 KDa sugiriendo que se trata de un componente soluble del citoplasma.

En 1988 Decoster et al (11) realizan estudios donde observan la respuesta inmune hacia los antígenos excretados y segregados (ESA) por los taquizoitos en diversas etapas de la infección, demostrando que los ESA son más intensamente reconocidos que los antígenos de membrana y citoplásmicos; encuentran que existen diferentes antígenos en cada fase de la infección y que pueden servir como marcadores para el diagnóstico. Así tenemos que en la fase aguda primero se detectan antígenos de 43 o 30 KDa

reconocidos por una IgM, también se observan anticuerpos a ESA de 69 y 97 KDa; con anticuerpos contra membrana se reconocen antígenos de 43, 35 y 30 KDa, en la fase crónica se reconocen cerca de 20 antígenos en ESA y 4 de membrana, los antígenos de ESA que detectan son de 108, 97, 86, 69, 60, 57, 42, 39 y 28.5 KDa, consideran como marcadores de ésta fase a los antígenos de 108 y 28.5 KDa, y en la toxoplasmosis congénita detectan anticuerpos IgM contra antígeno de 97 KDa tomándolo como buen marcador de éste tipo de infección.

En 1990 Charif et al (10) caracterizan y localizan los antígenos secretados por taquizoitos empleando técnicas como los anticuerpos monoclonales, ELISA, IFA, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), inmunoprecipitación, inmunoelectrotransferencia, microscopía inmunoelectrónica y encuentran que los antígenos secretores son los que predominantemente circulan en el inicio de la infección (Hughes y Van Knapen 1982). Los antígenos 21, 27 y 28.5 KDa se encuentran en los gránulos densos así como en los elementos de Golgi, el antígeno 28.5 predomina sobre los túbulos vesiculares de la red de Golgi, los antígenos 21 y 28.5 KDa también se encuentran en la superficie del taquizoito principalmente en el complejo de la membrana interna, reportan que los componentes secretados por el Toxoplasma gondii están implicados en el estado invasivo del parásito a las células hospederas (Lycke et al 1975, Nicholes et al 1983, Sadak et al 1988); confirman que antígenos de 60 y 43 KDa influyen en la penetración a la célula. La localización de los antígenos 21, 27,

28.5 y 32 KDa en los gránulos densos y en las vacuolas del parasitóforo sugieren un papel significativo en el mecanismo de escape a la multiplicación del parásito y que la resistencia de los fagosomas con toxoplasma a la digestión endocítica se debe a modificaciones morfológicas celulares inducidas por la secreción de algún componente superficial o citoplásmico (Porchett y Torpier, 1983; Sibley et al, 1986; Sibley y Krahenbuhl, 1988).

El papel de los antígenos secretores no está bien estudiado, pero se postula su posible papel en la protección a la infección. ESA induce anticuerpos dependientes (Darcy et al 1988) y mediados por células (Redel et al 1988) contra toxoplasma en ratones Nu/Nu(10).

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune resulta de las interacciones de varios elementos:

- 1.- La captación, procesamiento y presentación del antígeno a células B y T es realizado por células presentadoras de antígeno (APCs), éstas estimulan las células T cooperadoras (T_H). Las interacciones entre células T_H y las células efectoras (macrófagos, células B y células T citotóxicas) puede efectuarse por interacción celular directa o mediada por factores solubles (linfocinas y monocinas).
- 2.- Las células T_H estimulan a las células B para producir anticuerpos por interacción directa o a través de un puente antigénico o por aumento de factores que actúan primero enlazando a APCs.
- 3.- La respuesta celular involucra cooperación entre células T_H y células efectoras (macrófagos y células T citotóxicas).

El nivel y tipo de respuesta es regulada por células T supresoras, APCs, células T_H y anticuerpos, finalmente el sistema inmune interactúa con otras células como granulocitos, fibroblastos y con el sistema enzimático sérico para producir reacciones inflamatorias dirigidas a eliminar el origen del antígeno (29).

En enfermedades parasitarias el reconocimiento inmune es complejo debido a su diversidad antigénica y ciclos de vida. Los organismos que se desarrollan intracelularmente pueden dividirse en dos grupos dependiendo del tipo de células que

infecten: 1) infección células fagocíticas (ej. Mycobacterium tuberculosis; 2) infección primaria de células no fagocíticas. En el primer grupo las células hospederas infectadas expresan el antígeno en asociación con moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y por lo tanto la infección es controlada primariamente por linfocitos T efectores CD4+, en el segundo grupo el antígeno es expresado en asociación con moléculas clase I del MHC y la infección es controlada por linfocitos T CD8+ (18).

El Toxoplasma gondii infecta una gran variedad de células, muchas de ellas son no fagocíticas por lo que la respuesta inmune primaria es a través de células T CD8+. Estas células evitan la formación de quistes por lisis de células infectadas, haciendo al parásito más accesible a otras células efectoras (macrófagos activados, células T citolíticas, anticuerpos específicos, sistema de complemento) capaces de lisar al parásito extracelular (6, 18, 25). Khan IA et al (1990) reportaron que células CD4+ y CD8+ son parasiticidas a T. gondii extracelulares y presentan citotoxicidad independiente de la opsonización, secreción de linfocinas, actividad de células NK y restricción de MHC; también establecen que la proteína mayor (P30) del T. gondii es responsable de la inducción de células T citotóxicas antígeno específicas (25). Gazzinelli R et al (1990) realizan estudios in vivo e in vitro usando una vacuna de T. gondii atenuado; estimula células esplénicas y células del nodo linfático encontrando que se produce altos niveles de γ IFN e IL2,

que las células T CD4+ producen más γ IFN que los linfocitos T CDB+ pero que es inactivo y que para que células T CDB+ produzcan γ IFN activo necesita de factores auxiliares producidos por CD4+. El mecanismo de acción de γ IFN en la inmunidad de Toxoplasma gondii no está bien definido pero se piensa que activa macrófagos por muerte intracelular del parásito o por la habilidad de la citocina a inhibir la multiplicación del parásito en células no fagocíticas (18).

El hecho de que células T CDB+ tengan un importante papel en la protección contra el Toxoplasma gondii explica la alta incidencia de toxoplasmosis en pacientes con SIDA en la fase latente de la enfermedad, que es cuando hay deficiencia en la función de las células CDB+. Erbe DV & Pfefferkorn (1991) demostraron que existen diferentes receptores Fc para IgG sobre células como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células B, células NK y monocitos, las cuales contribuyen a la muerte del parásito (13).

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y BIOLOGICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son un grupo de glicoproteínas presentes en la fracción γ del suero y en fluidos tisulares, pueden ser secretadas o encontrarse sobre la superficie celular y ambas pueden tener la misma especificidad antigénica (39). Cada inmunoglobulina está constituida por dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas y dos ligeras idénticas, unidas entre sí por enlaces disulfuro y por interacciones secundarias (fig. 3), poseen una característica bifuncional, una región de la molécula se enlaza con el antígeno y otra se une a la superficie tisular del hospedero, incluyendo varias células del sistema inmune, algunas células fagocíticas y el primer componente del sistema de complemento (C1q) (29, 39).

Las inmunoglobulinas se agrupan en clases y subclases, diferenciándose por su tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidrato, presentando diversas propiedades (tabla 1) (39).

IgM : comprende cerca del 10% del total de las inmunoglobulinas, tiene estructura pentamérica, es el primer anticuerpo en aparecer sobre la superficie de células B, es el componente mayor de la respuesta inmune primaria y la más eficiente fijadora de complemento (17, 29).

IgG : es la más abundante de las inmunoglobulinas, comprende del 70 - 75 % del total, proteína monomérica distribuida intra y extravascularmente, es el mayor anticuerpo de la

respuesta inmune secundaria y la única clase antitoxina capaz de adaptar moléculas, las cuales permiten poner en juego otros efectores inmunes (39); es la más efectiva clase de inmunoglobulina de objetivos sensibilizados para citotoxicidad anticuerpo-dependiente, como por ejemplo la muerte de esquistosomas por eosinófilos, la cual se realiza por enlace de los eosinófilos a la región Fc de la IgG sobre la esquistosoma blanco (29).

IgD : corresponde menos del 1% de las inmunoglobulinas totales, se localiza en grandes cantidades sobre la membrana de muchos linfocitos B circulantes, se encuentra en forma monomérica, su papel biológico es controversial, algunos inmunólogos establecen que juega un papel esencial en el desarrollo y diferenciación de las células B y en el establecimiento del estado inmunidad/tolerancia a antígenos particulares, otros la consideran un vestigio evolucionario (17,29).

IgE : comprende solo el 0.004% del total de las inmunoglobulinas séricas, es de forma monomérica, se encuentra sobre la membrana de basófilos, se agrega con gran facilidad a células cebadas a través de receptores Fc y ésto provoca un eslabón entre el sistema inmune y el sistema inflamatorio efector. La IgE proporciona un ejemplo notorio de la naturaleza bifuncional de las inmunoglobulinas, fija el antígeno mediante la porción Fab y se une a las células

cebadas de los tejidos y basófilos por la porción Fc (17, 29, 39).

IgA : representa del 15- 20% de las inmunoglobulinas séricas, es el mayor componente de las secreciones mucosas como saliva, secreciones traqueobronquiales, calostro, leche y secreciones genitourinarias (17, 22). Se encuentra principalmente como monómero en el suero, con un 10 - 15% en forma polimérica y en las secreciones externas está como dímero (17, 29, 39).

La IgA secretoria (IgAs) está compuesta de un dímero de IgA, una molécula de componente secretorio (PM. 70,000) y una molécula de cadena J (PM. 15,000); es una molécula con un coeficiente de sedimentación de 11S, PM. 400,000. Pequeñas cantidades de IgAs se encuentra en suero normal y puede aumentar en ciertas enfermedades donde se ve afectada la mucosa (17).

Existen dos subclases de IgA (IgA₁ e IgA₂) en suero y secreciones, IgA₁ representa el 90% del total de IgA sérica y una porción semejante de IgA de células plasmáticas de la médula ósea y la IgA₂ comprende hasta el 60% del total de IgA, éstas subclases difieren antigénicamente en su contenido de glucosamina, en la región de bisagra, en el número de enlaces disulfuro intercadena y en sus propiedades metabólicas.

La IgA llega a las secreciones por trasudación del suero y por síntesis local en la lámina propia de la mucosa, la

IgA dimérica es transportada a través del epitelio del intestino y glándulas salivales por un sistema de transferencia que involucra enlace con el componente secretorio, la IgA dimérica se une al receptor poli-Ig expuesto sobre el lado seroso del epitelio glandular, el complejo receptor/IgA es introducido al epitelio y transportado a la superficie de la mucosa donde es puesto en libertad. La porción del receptor unida a la IgA forma la pieza secretora la cual está unida por enlaces disulfuro y protege a la IgA de la degradación en las secreciones mucosas (fig. 4) (39).

FUNCIONES . La IgA tiene acción neutralizante en las enfermedades virales, por ejemplo la vacunación oral contra la poliomielitis induce producción de IgAs, la cual previene la duplicación y penetración del virus.

tiene actividad antibacteriana, se une a los componentes antigénicos de la superficie de la bacteria evitando su adherencia y colonización a las células epiteliales (17). Investigaciones realizadas por inmunoblot en el estudio de la respuesta inmune sugieren que la IgM e IgA son unas de las importantes estructuras que intervienen en la protección contra la infección (35).

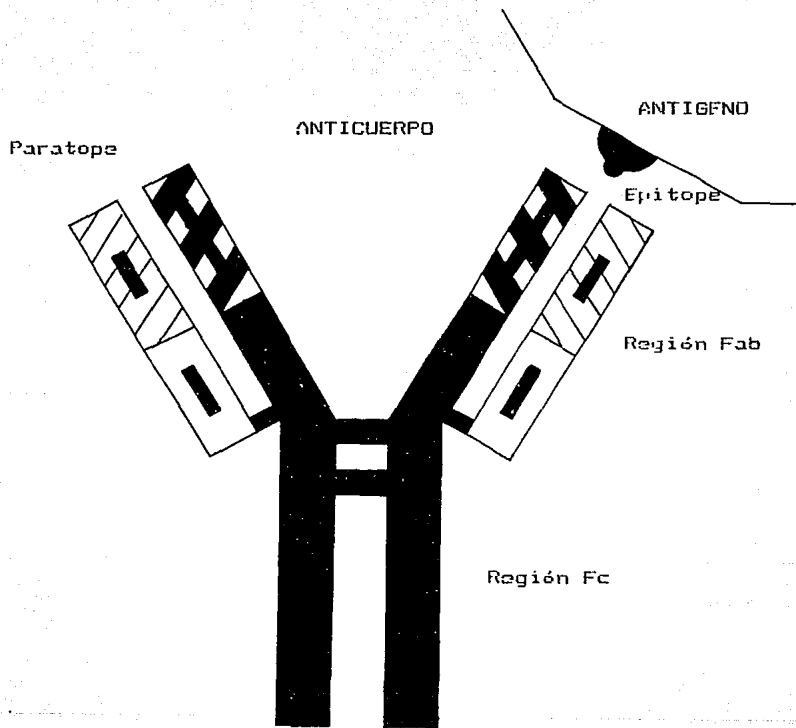


Fig 3 Estructura de un anticuerpo o inmunoglobulina.

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Inmunoglobulina	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgAs	IgD	IgE
Cadena pesada	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	α_1 o α_2	δ	ϵ
Concentración media serica (mg/ml)	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.05	0.03	0.00005
Constante de sedimentación	7S	7S	7S	7S	19S	7S	7S	11S	7S	8S
Peso molecular	146,000	146,000	170,000	146,000	970,000	160,000	160,000	385,000	184,000	188,000
Numero de cadenas pesadas dominantes	4	4	4	4	5	4	4	4	4	5
Carbohidratos (%)	2-3	2-3	2-3	2-3	12	7-11	7-11	7-11	9-14	12
Fijación del complemento	++	+	+++	-	+++	-	-	-	-	-
Transferencia placentaria	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 1

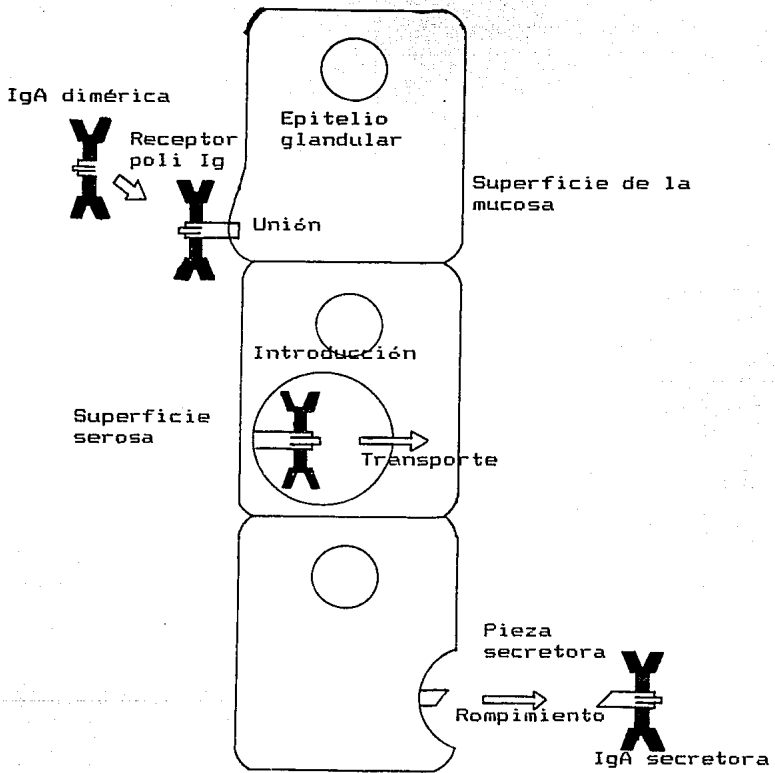


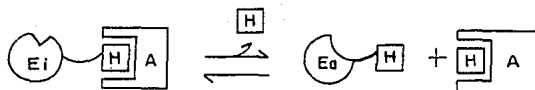
Fig 4 Papel de la IgAs en la protección de la superficie mucosa.

METODOS INMUNOENZIMATICOS

Este grupo de técnicas emplea antígenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima; se basan en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad del sistema indicador (2, 32, 48). Existen dos tipos de inmunoensayos: homogéneos y heterogéneos.

INMUNOENSAYO HOMOGENEO (31, 48, 51): Se basa en los cambios de la actividad enzimática, un hapteno es unido a la enzima de tal forma que altera su actividad cuando el hapteno se une al anticuerpo (fig. 5). Se emplea en la detección de abuso de drogas (opiáceos, barbitúricos, anfetaminas, etc.), en la medición de niveles terapéuticos de drogas (digoxina, lidocaina, fenobarbital, teofilina) y en la determinación de T4.

Existen varios tipos de EIAs homogéneos (31), en cada uno de ellos la interacción antígeno-anticuerpo modula la actividad de la enzima. La compañía Syva, en California E.U.A., ha desarrollado un EIA con el nombre de EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) para la mayoría de drogas antiepilépticas, drogas cardioactivas, antiasmáticas, antineoplásicas y el abuso de drogas (31). En este sistema, el anticuerpo al unirse con el conjugado hapteno-enzima inhibe la actividad enzimática, el hapteno libre en los estándares o muestras reduce la inhibición por competición por el anticuerpo, de esta manera, en presencia de anticuerpo, la actividad de la enzima es proporcional a la concentración del hapteno libre (fig. 6) (31).



Ei - Enzima inhibida
 Ea - Enzima activada
 H - Hapteno
 A - Anticuerpo

Fig. 5 Principio del inmunoensayo homogéneo.

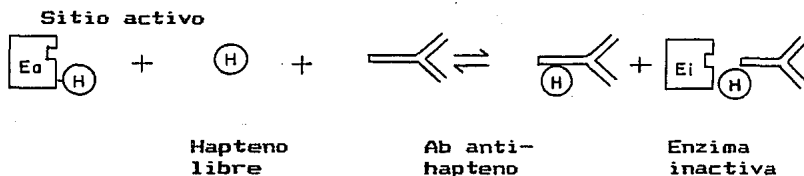


Fig. 6 Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)

Ventajas: ensayos específicos, sensibles, de amplia aplicación, equipo requerido relativamente barato y ampliamente disponible, reactivos baratos y de vida media larga, no requiere etapas de separación, potencial para automatizar, no tiene peligro de radiación.

INMUNOENSAYO HETEROGENEO (31, 34, 49): llamado también ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), combina las ventajas de la inmunofluorescencia y el radioinmunoensayo, superando muchas de las ventajas de otros métodos. Este tipo de pruebas es adecuado para la determinación y medición de sustancias con PM arriba de 10,000; Engval et al y VannWeemen realizaron los primeros trabajos sobre estas técnicas, en la cual se pega un antígeno soluble o anticuerpo a una fase sólida insoluble sin perder su propiedad inmunológica. Las técnicas ELISA pueden ser competitivas, no competitivas e indirectas (31).

ELISA COMPETITIVO: puede usar como conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, cuando el conjugado es antígeno-enzima el anticuerpo específico se adsorbe física o covalentemente a una fase sólida después el conjugado es incubado en presencia de un antígeno estándar o la muestra a ser analizada y competirán por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado (fig. 7). En esta técnica la concentración de los productos del sustrato son inversamente proporcionales a la concentración del estándar o del antígeno en la muestra. Se aplica a una gran variedad de sustancias como IgG, gonadotropina coriónica y ATP.

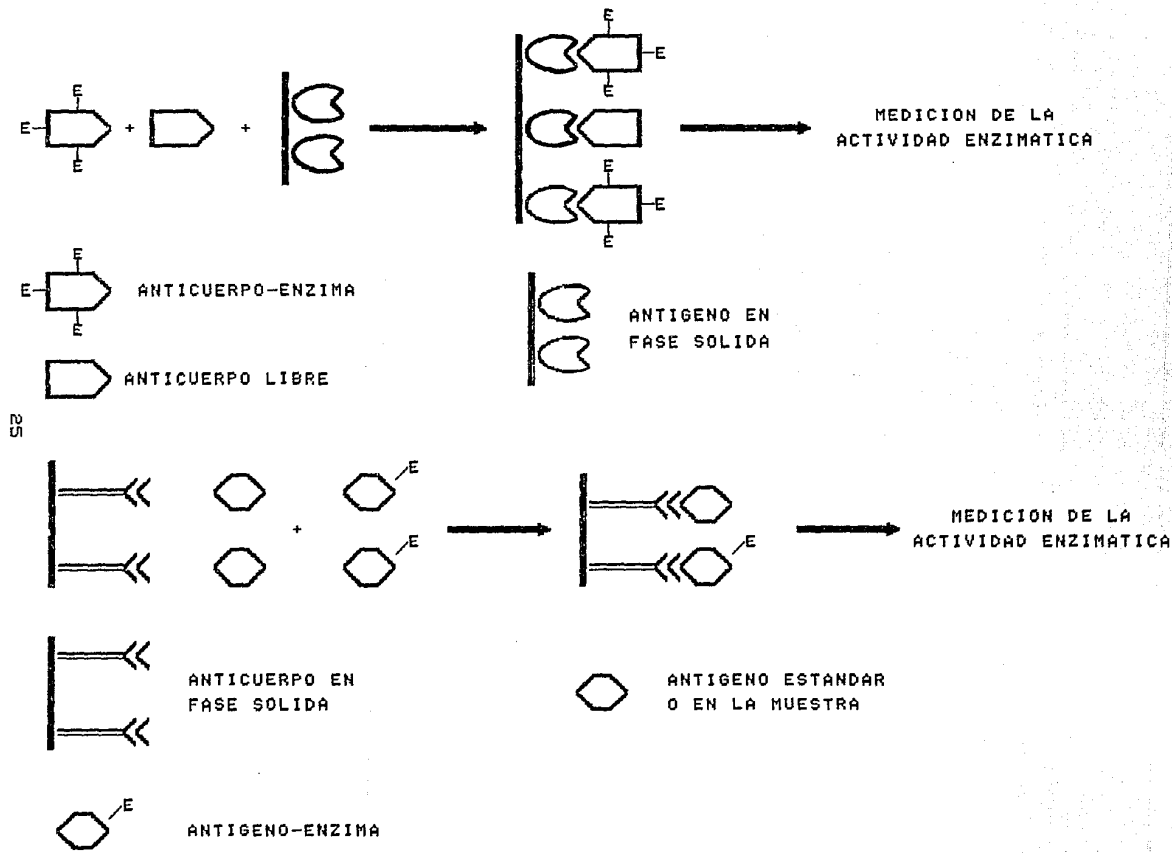


Fig. 7 ELISA competitivo usando antígeno o anticuerpo marcado.

ELISA NO COMPETITIVO (31): llamados también ensayos inmunoenzimométricos o ELISA sandwich (fig. 8), en ésta técnica el antígeno reacciona con un exceso estequiométrico de anticuerpo y la reacción antígeno-anticuerpo es medido en un segundo paso. Se usan antígenos bi o polivalentes y sigue los siguientes pasos:

- 1.- El anticuerpo específico se inmoviliza en la fase sólida, el anticuerpo no pegado se elimina por lavado.
- 2.- La solución conteniendo el antígeno se incuba con la fase sólida sensibilizada, se elimina por lavado el antígeno que no reacciona.
- 3.- El complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado se incuba con un exceso de un segundo anticuerpo unido a la enzima, se elimina por lavado lo que no reacciona.
- 4.- Se adiciona el sustrato y el cambio de color es proporcional a la cantidad del antígeno presente en la muestra.

El ELISA sandwich se usa en la cuantificación de marcadores tumorales como antígenos carcinoembrionicos, α -fetoproteína y otros antígenos como proteínas, virus, etc.

También existe el ELISA doble sandwich modificado para la detección y medición de antígenos. en éste se emplea dos anticuerpos obtenidos en diferente especie animal (fig. 9).

ELISA INDIRECTO: se usa para medir la concentración de anticuerpos en muestras de fluidos biológicos; el antígeno inmovilizado reacciona con el anticuerpo de la muestra y posteriormente reacciona con un segundo anticuerpo unido a la enzima (fig. 10).

Las características de los elementos que se emplean en la realización de un método ELISA son:

FASE SOLIDA: se han usado glóbulos de poliestireno, tubos de polivinilo, policarbonato, partículas de agarosa y poliacrilamina, y placas plásticas microtituladoras (34, 47, 49). La inmovilización del antígeno o anticuerpo en la fase sólida es por enlace covalente o por adsorción continua de interacciones no covalentes, altas concentraciones de antígeno o anticuerpo reducen los enlaces no específicos y mejora los específicos, la adsorción no específica se reduce adicionando al buffer de revestimiento un detergente como Tween 20 y/o proteína como gelatina o suero albúmina bovina (31); la adsorción depende también del tiempo, temperatura y pH, un revestimiento uniforme se logra a 4°C, pH 9.6 durante toda la noche (47, 49). Se debe determinar la concentración óptima de revestimiento para cada ensayo.

ETAPAS DE LAVADO: deben realizarse con una solución de buffer fosfato salino-Tween 20 (PBS-Tween 20) después de revestir la fase sólida, después de la incubación de la muestra y de la incubación con el conjugado, esta fase es importante ya que pueden quedar residuos de material que reaccionen y alteren los resultados (48).

MUESTRA A ENSAYAR: algunas contienen sustancias de PM elevado que pueden pegarse de manera inespecífica a la fase sólida, este problema se reduce si la muestra se diluye en PBS conteniendo un agente detergente (49).

ANTIGENO: para cada ensayo es necesario determinar la concentración óptima del antígeno, la cual se establece por titulación en "tablero de ajedrez" (50).

CONJUGADO (31, 47, 49, 52): para la obtención del conjugado se debe considerar:

a) Preparación de la inmunoglobulina:

i) Tipo de inmunoglobulina usada para inmunización.

ii) Especie del animal empleado en la inmunización (oveja, cabra, conejo).

b) Tipo de enzima: esta debe ser económica, de alto grado de pureza, elevada actividad específica, estable al almacenamiento, soluble, no dar enlaces cruzados. Las más empleadas son la Peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina, pero existen otras como se muestra en la tabla 2 (3, 4).

c) Método de acoplamiento o conjugación (24, 31, 32, 49, 52): éstos métodos se basan en la reacción entre los grupos amino presentes en el anticuerpo y los grupos carbohidrato de la enzima con ayuda de un reactivo bifuncional como glutaraldehído, benzoquinona, etc.. Existe dos métodos para su obtención:

1.- Método Nakane: en esta técnica los grupos hidroxilo en las cadenas carbohidratos de la enzima son oxidados por periodato. Antes de la oxidación los grupos amino deben protegerse para prevenir la formación de homopolímeros o interenlaces, esto se consigue por acción del dinitrofluorobenceno o bajando el pH a 4, después de la oxidación los grupos aldehídos reaccionan con los grupos amino de la inmunoglobulina formando una base de Schiff a

pH 9, ésta es reducida y estabilizada con borohidruro de sodio dando como resultado un conjugado con un grado de polimerización bajo (fig. 11).

2.- Método Avrameas: emplea como reactivo bifuncional el glutaraldehído, puede realizarse en uno o dos pasos.

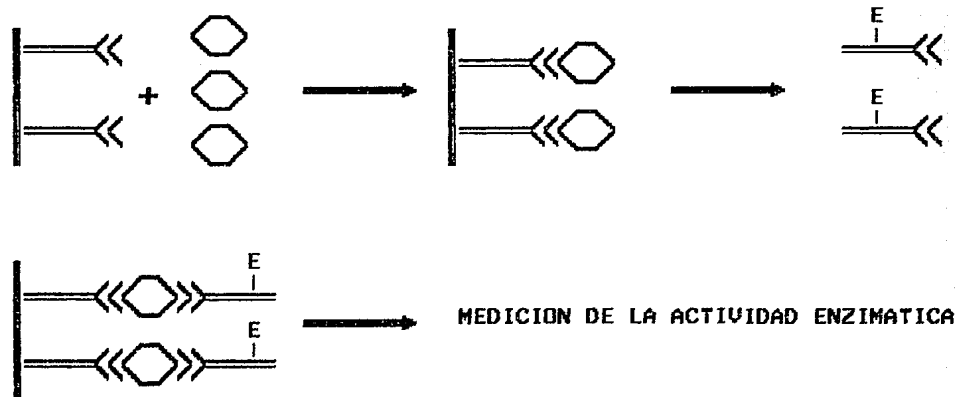
UN PASO: se mezclan la enzima y el anticuerpo en presencia de glutaraldehído. En este método se forman polímeros de alto y bajo peso molecular de enzima y anticuerpo. No es satisfactorio para la Peroxidasa.

DOS PASOS: es adecuado para Peroxidasa y produce conjugados homogéneos. En el primer paso la Peroxidasa es activada formándose grupos aldehído que reaccionan en un segundo paso con los grupos amino libres del antígeno o anticuerpo formando una base de Schiff, el producto se insolubiliza por adición de aminoácidos como lisina, histidina y glicina (fig. 12).

d) Purificación (49, 50): se realiza por precipitación con sulfato de amonio o por filtración en gel (Sephacryl 200, Ultragel Ac-A-44, etc.). Los conjugados con Peroxidasa duran mucho tiempo almacenados en forma liofilizada, sin perder su actividad.

SUSTRATO (49): debe ser barato, soluble y de fácil uso. Para la Peroxidasa hay una amplia variedad de sustratos oxidados por peróxido de hidrógeno pero presentan problemas de solubilidad, siendo el más adecuado la o-fenilendiamina (OPD).

VENTAJAS: en la tabla 3 se muestra un análisis comparativo de las ventajas y desventajas del método ELISA con el radioinmunoensayo (RIA) e inmunofluorescencia (IFA) (47).





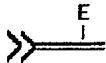
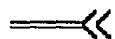
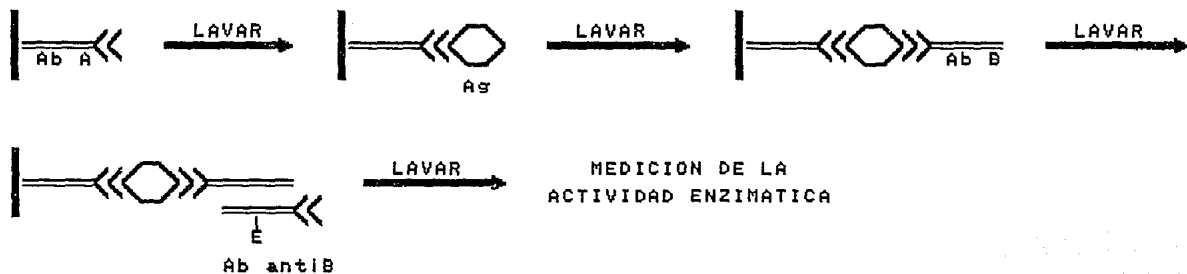
-  Anticuerpo
-  Antigeno
-  Anticuerpo-enzima

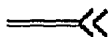
Figura 8 Inmunoensayo ELISA sandwich



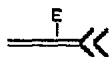
ANTICUERPO ESPECIFICO (EJ. DE CONEJO) (Ab A)



ANTIGENO ESPECIFICO EN LA MUESTRA



ANTICUERPO ESPECIFICO DE DIFERENTE ESPECIE (EJ. DE CABRA) (Ab B)



GLOBULINA antiB-ENZIMA (EJ. Ig ANTICABRA)

HIDROLISIS DEL SUSTRATO IGUAL A LA CANTIDAD DE Ab PRESENTE

Fig. 9 ELISA doble sandwich modificado

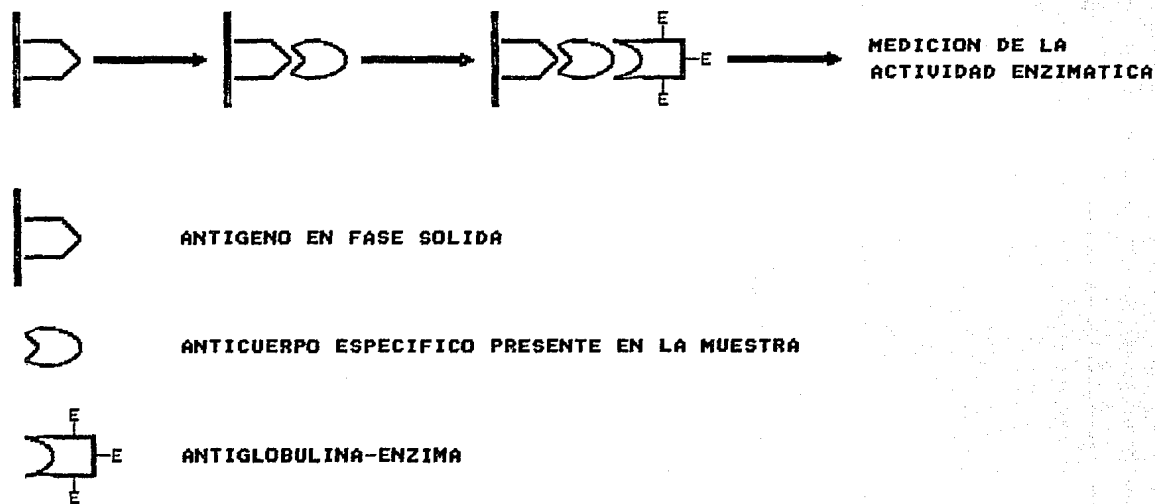


Figura 10

ELISA indirecto

METODOS DE CONJUGACION

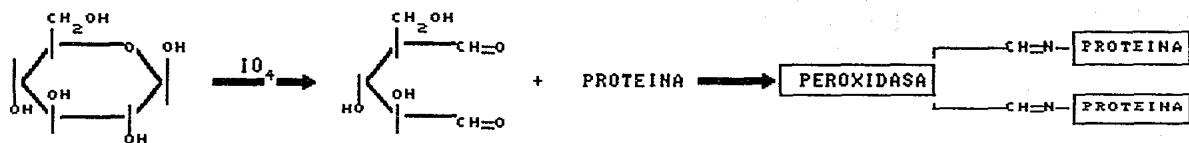


Figura 11 METODO NAKANE



Figura 12 METODO AURAMEAS

ENZIMA**FUENTE**

Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	<u>Leuconostoc mesenteroides</u>
Malato dehidrogenasa	Corazón de puerco, mitocondria
Glucosa oxidasa	<u>Aspergillus niger</u>
Acetilcolinesterasa	Anguila electrica
Glucosa-amilasa	<u>Rizopus nivens</u>
Lisozima	Albúmina de huevo
β -galactosidasa	<u>Escherichia coli</u>
Fosfatasa alcalina	Mucosa intestinal de ternera y <u>E. coli</u>

Tabla 2 ENZIMAS EMPLEADAS EN LA OBTENCION DE CONJUGADOS

CRITERIO**ELISA****RIA****IFA****SENSIBILIDAD
ESPECIFICIDAD**Alta
Depende de la preparación
del antígeno

Alta

Usualmente baja
Alta**REPRODUCIBILIDAD**

Aceptable

Aceptable

Aceptable

LECTURA

Objetiva

Objetiva

Usualmente subjetiva

PREPARACION DEL

Puede ser

Puede ser

Fácil

ANTIGENO

complicada

complicada

REALIZACION EN

Fácil

Difícil

Fácil

EL CAMPO**MECANIZACION**

Posible

Posible

Difícil

COSTO

Bajo

Alto

Alto

VIDA MEDIA DE

Largo

Corto

Largo

REACTIVOS**PELIGRO DE SALUD**

Menor o

Presente

Menor o

PARA EL PERSONAL

Ninguno

Ninguno

Tabla 3

VENTAJAS DEL METODO ELISA

FUNDAMENTACION DEL TEMA

La búsqueda de nuevas técnicas para el diagnóstico en los últimos años a dado mayor importancia a la aplicación de la Inmunología al diagnóstico médico y a la creación de un nuevo grupo de pruebas conocidas como inmunoensayos. Estos combinan la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo con la sensibilidad de un sistema indicador (49).

La introducción de los análisis inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) en el diagnóstico de las enfermedades parasitarias abre nuevas posibilidades para realizar pruebas tempranas y rápidas que ayuden a confirmar determinados padecimientos. El diagnóstico de la toxoplasmosis se puede realizar por la prueba tintoreal de Sabin-Feldman, anticuerpos indirectos fluorescentes, fijación de complemento y hemaglutinación, técnicas que presentan varias desventajas con respecto al método ELISA (5, 27, 30).

La prueba tintoreal de Sabin-Feldman tiene la desventaja de requerir el parásito "in vitro", el cual al estar en contacto con el suero problema, si éste tiene anticuerpos específicos, el parásito pierde su afinidad por el colorante: en algunos casos puede dar resultados negativos o positivos a título poco significativo, dado que puede tratarse de infecciones antiguas y en estos casos la prueba tintoreal por si sola muchas veces no permite descartar ni confirmar el diagnóstico (5, 9).

La hemaglutinación emplea glóbulos de carnero con

antígeno soluble de Toxoplasma gondii y ofrece resultados semejantes a la prueba tintoreal (5, 9).

La fijación de complemento es positiva en la cuarta semana de infección y se negativiza pronto, después del tratamiento clínico (5,9).

La determinación indirecta de anticuerpos fluorescentes es la más satisfactoria, pero requiere de equipo costoso y mucha experiencia para obtener reproducción en la lectura (5).

El análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas es una técnica de menor costo, rápida, con alto nivel de especificidad y sensibilidad. Se han reportado resultados hechos por ELISA que pueden equipararse a los que se obtienen con los anticuerpos indirectos fluorescentes. El ELISA requiere de reactivos de bajo costo, dentro de los que se incluye conjugados proteicos que pueden elaborarse con relativa facilidad en el laboratorio. en este proyecto se emplearan anticuerpos anti IgA, anti IgM y anti IgG unidos a Peroxidasa (sistema indicador) (5, 34, 49, 52).

La infección por Toxoplasma gondii da por resultado la producción de anticuerpos específicos, los cuales pueden demostrarse mediante técnicas inmunoenzimáticas. Anteriormente las pruebas de elección para su diagnóstico eran la prueba tintoreal de Sabin-Feldman y la determinación de anticuerpos indirectos fluorescentes, las cuales presentan desventajas ya antes mencionadas, ésto dio origen a la investigación de pruebas diagnósticas que dieran resultados más satisfactorios, llevando así a la aplicación de los métodos inmunoenzimáticos para

determinar anticuerpos específicos a Toxoplasma gondii. La determinación de IgM da resultados falsos positivos cuando está presente el factor reumatoide o anticuerpos antinucleares, lo cual no se ha detectado cuando se hacen determinaciones de IgG e IgA (33).

Algunos autores no consideran de valor diagnóstico la determinación de IgA pero investigaciones realizadas por Decoster et al (1988) y Stepick-Biek (1990) demuestran que la determinación temprana de IgA puede ser importante para el diagnóstico de la toxoplasmosis aguda, especialmente durante el embarazo y tal vez en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia (12, 26, 43).

El presente trabajo trata de proporcionar una nueva alternativa para el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis, la cual además de presentar las ventajas del método ELISA, también tiene la de la obtención de la muestra a analizar (saliva). La IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones como resultado de la trasudación del suero y su producción local en las mucosas. Las secreciones externas se caracterizan por el predominio de la IgA, es por esto que podemos detectar niveles significativos de IgA específica a Toxoplasma gondii (17, 22).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita que puede desarrollarse en un gran número de huéspedes vertebrados, siendo el huésped definitivo el gato casero y otros animales de la familia Felidae. La infección por Toxoplasma gondii habitualmente ocurre a través del sistema digestivo, los protozoarios pueden penetrar y proliferar en todas las células del cuerpo formando quistes que permanecen viables por largo periodo. El hombre no posee importancia de consideración como fuente de difusión de la enfermedad con excepción de las mujeres embarazadas en donde puede presentarse una transmisión trasplacentaria al feto, la cual se traduce en lesiones a diversos tejidos, principalmente en Sistema Nervioso Central y órganos de la vista. Los niños que logran sobrevivir presentan trastornos irreversibles en el sistema nervioso, vísceras y esqueleto, que a su vez conducen a graves alteraciones del estado físico y psíquico. En la ciudad de México se estima que hay aproximadamente 2000 deficientes mentales por año a causa de la toxoplasmosis y en estudios realizados por Fernández Torrano et al, en el oriente del estado de Tabasco, revelan que la toxoplasmosis es una de las causas principales de aborto en ésta región de la República Mexicana (14).

Siendo ésta una enfermedad asintomática en el adulto, es necesario crear nuevas técnicas que colaboren a su diagnóstico temprano e implementar éstas como rutinarias en mujeres

embarazadas, realizando pruebas en diferentes etapas de gestación. Las actuales pruebas diagnósticas presentan muchas desventajas, por ejemplo la prueba tintoreal de Sabin-Feldman o la determinación indirecta de anticuerpos fluorescentes, por lo que la aplicación de los inmunoensayos representa un gran avance para el diagnóstico temprano de esta enfermedad.

OBJETIVOS

Implementar una nueva prueba diagnóstica para la toxoplasmosis, determinando IgA específica a Toxoplasma gondii en saliva.

Establecer la relación de los valores encontrados por esta metodología con los niveles séricos.

Establecer si existe relación con la positividad o negatividad encontrada en la determinación de IgM, IgG e IgA sérica.

HIPOTESIS

Se espera encontrar niveles de IgA en saliva equiparables a los niveles séricos, así como la existencia de una buena correlación con los resultados clínicos y los obtenidos en la determinación de IgM, IgG e IgA sérica, pudiendo de esta manera realizar el diagnóstico en saliva y no en suero como actualmente se realiza.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Inmunoglobulinas anti IgA, anti IgM y anti IgG unidas a
Peroxidasa de rábano picante.

Saliva humana

Suero humano

REACTIVOS

Acido cítrico. Merck

Agua bidestilada

Albúmina sérica bovina. Merck

Carbonato ácido de sodio. Baker

Carbonato de sodio anhidro. Baker

Cloruro de potasio. Monterrey

Cloruro de sodio. Monterrey

Fosfato dibásico de sodio anhidro. Técnica Química

Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado. Baker

Fosfato monobásico de potasio. Baker

Glutaraldehido. Sigma

Hidróxido de sodio. Técnica Química

Lisina. Sigma

o-fenilendiamina. Sigma

Peroxidasa de rábano picante. Sigma

Peróxido de hidrógeno. Monterrey

Reactivo Folin-Ciocalteau. Sigma

Sephadex G-25. Sigma

Sulfato de amonio. Quimica Dinámica

Sulfato de cobre pentahidratado. Baker

Tartrato de sodio o potasio. Baker

Tween 20. Sigma

MATERIAL

Algodón

Anillo de hierro

Celda para espectrofotómetro B & L

Espátula de acero inoxidable

Jeringa desechable 3, 5 ml. Plastipak

Matraz erlenmeyer 125, 500, 1000 ml. Pyrex

Matraz volumétrico 50, 100 y 1000 ml. Pyrex

Mechero bunsen

Membrana para diálisis

Pinzas de tres dedos

Pipeta de émbolo 20 a 100 μ l. Brand

Pipeta graduada 1, 10 ml. Pyrex

Pizeta 500 ml.

Placa de microtitulación 12.7 x 9.5 cm 129A. Dynatech Labs.

SopORTE universal

Termómetro -10 a +260°C. Taylor

Tubo de ensaye 13x100 mm. Pyrex

Vaso de precipitado 100 ml. Pyrex

EQUIPO

Agitador de placas de microtitulación. Bellco Glass Inc.

Agitador magnético. Thermolyne

Agitador vortex genie. Scientific Industries Inc.

Balanza analítica. Mettler H80

Baño de agua con temperatura controlada. Precision

Centrifuga. Solbat

Equipo de destilación 2000 ml. Pyrex

Espectrofotómetro ELISA. Dynatech MR 250

Espectrofotómetro Spectronic 20. Bausch & Lomb

Incubadora. Riossa EC

Potenciómetro. Sargent Welch PBL 400

Refrigerador. Philips 127-VA

METODOLOGIA

- 1.- Elaboración del conjugado usando inmunoglobulinas anticadenas α , τ , o μ humanas y Peroxidasa de rábano picante por el método de acoplamiento de dos pasos con glutaraldehido y posterior purificación.
- 2.- Determinar las concentraciones adecuadas de antígeno y conjugado para el sistema, por medio de titulación por tablero de ajedrez.
- 3.- Tomar muestras de saliva sin estimulación y sangre a niños de 2 a 15 años con parálisis cerebral y al personal que labora en APPAC.
- 4.- Descomplementar salivas y suero para evitar fijación de complemento y almacenarlas a -20°C para su posterior uso.
- 5.- Determinar anticuerpos específicos a Toxoplasma gondii en saliva y suero por el método ELISA (sandwich).
- 6.- Análisis de resultados.

TÉCNICAS

I.- PREPARACION DE CONJUGADOS (32, 49, 50)

a) Obtención de Inmunoglobulina

La fracción de inmunoglobulina se prepara por precipitación con sulfato de sodio o amonio.

1.- A 1 ml de antisuero adicionar 1 ml de amortiguador de fosfatos salino pH 7.4, después adicionar 2 ml de sulfato de amonio al 36%. Agitar por 30 minutos a temperatura ambiente.

2.- Centrifugar a 3000g por 10 minutos y lavar el precipitado dos veces con sulfato de amonio al 18%.

3.- Redissolver el precipitado en 1 ml de PBS (amortiguador de fosfatos salino) y remover el sulfato de amonio por diálisis o por medio de una columna de Sephadex G-25.

4.- Determinar la concentración de proteína por el método Lowry.

b) Conjugación de la inmunoglobulina con Peroxidasa de rábano picante

Acoplamiento con glutaraldehído de dos pasos.

1.- Disolver 10 mg de Peroxidasa en 0.2 ml de amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 6.8, conteniendo 1.25% de glutaraldehído. Dejar 18 horas o durante la noche a temperatura ambiente.

2.- Dializar contra solución salina normal o pasar a través de una columna de Sephadex G-25 para eliminar el glutaraldehído libre.

3.- Concentrar si es necesario a 1 ml, adicionar 1 ml de salina normal que contenga 5 mg de anticuerpo y 0.1 ml de amortiguador

carbonato-bicarbonato de sodio 1M pH 9.5.

4.- Dejar 24 horas a 4°C y adicionar 0.1 ml de lisina 0.2M.

5.- Dejarla 2 horas a temperatura ambiente y dializar extensivamente contra amortiguador de fosfatos salino pH 7.2 a 4°C.

c) Purificación del conjugado

1.- Adicionar un volumen igual de sulfato de amonio saturado, frío y neutro, gota a gota, con agitación.

2.- Centrifugar a 3000 g 10 minutos. Lavar el precipitado 2 veces con sulfato de amonio a la mitad de saturación (volumen igual de sulfato de amonio y PBS) frío y neutro.

3.- Centrifugar y redissolver el precipitado en PBS.

4.- Dializar contra PBS para remover el sulfato de amonio o pasar a través de una columna de Sephadex G-25.

II.- TITULACION DEL CONJUGADO (50).

Antígeno (IgG humana) para sensibilizar la placa a una concentración de 1 mg/ml en solución salina.

1.- Diluir 1:500 la Ig humana (1 mg/ml) con amortiguador de recubrimiento.

2.- Colocar en una gradilla 7 tubos de ensaye etiquetados de la A a la G.

3.- En el tubo A colocar 3 ml de la dilución 1:500 y en los tubos de la B a la G se hacen diluciones al doble con volúmenes de 1.5 ml de amortiguador de carbonatos, mezclando bien cada tubo.

4.- En una placa de microtitulación de 96 pozos colocar 100 µl

del tubo A en la fila A, hacer lo mismo con el resto de los tubos. La fila H se llena con 100 µl del diluyente (testigo negativo del antígeno).

5.- Tapar la placa y dejar en cámara húmeda 18 horas a 4°C.

6.- Tirar el sobrenadante y bloquear con 200 µl de albúmina sérica bovina al 1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7.- Tirar el sobrenadante y lavar 4 veces con PBS-Tween, dejándolo actuar 1 minuto.

8.- Tomar 11 tubos de ensayo y hacer diluciones al doble del conjugado Peroxidasa-anti IgG humana, usando volúmenes de 1 ml.

9.- Colocar 100 µl del tubo 1 en los pozos de la hilera 1, hacer lo mismo con el resto de los tubos. La hilera 12 solo lleva PBS-Tween (testigo negativo de conjugado). Tapar la placa y dejar 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

10.- Tirar el sobrenadante y lavar como se indica en el paso 7.

11.- Adicionar 100 µl de sustrato y dejar a 37°C 15 minutos.

12.- Leer la densidad óptica a 490 nm.

III.- OBTENCION DEL ANTIGENO.

Este método fué realizado por el departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la UNAM, a cargo del Dr. Manuel Gutiérrez Quiroz.

IV.- DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO LOWRY (7).

1.- A 1 ml de la muestra agregar 3 ml del reactivo C, agitar y

reposar 10 minutos.

2.- Adicionar 0.1 ml del reactivo Folin Ciocalteau, agitar y reposar 30 minutos.

3.- Leer la densidad óptica a 600 nm.

Reactivo A: 20 g carbonato de sodio anhidro y 4 g de hidróxido de sodio aforado a 1000 ml.

Reactivo B 1 : 2 g tartrato de sodio o potasio aforado a 100 ml.

Reactivo B 2 : 1 g de sulfato de cobre pentahidratado aforado a 100 ml.

Reactivo C : 1 ml del reactivo B 1 + 1 ml del reactivo B 2 + 100 ml del reactivo A.

V.- OBTENCION DE MUESTRAS

1.- Se toman aproximadamente 2 ml de muestra de saliva a niños y adultos, sin estimulación para su producción, en tubos de ensaye estériles.

2.- Filtrar la saliva en una jeringa usando algodón como medio filtrante.

3.- Colocar el filtrado en tubos de poliestireno estériles y ponerlos a baño maría a 52°C durante 30 minutos.

4.- Congelar las muestras a -20°C hasta su uso.

5.- Las muestras de suero fueron proporcionadas por el Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, UNAM.

VI.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS POR EL METODO ELISA (SANDWICH) (50, 51).

- 1.- Colocar en una placa microtituladora 100 µl de antígeno de Toxoplasma gondii en cada pozo.
- 2.- Tapar la placa e incubar en cámara húmeda 18 horas a 4°C.
- 3.- Tirar el sobrenadante y bloquear con 200 µl de albúmina sérica bovina al 1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Tirar el sobrenadante y lavar 4 veces con PBS-Tween, dejando actuar 1 minuto la solución de lavado.
- 5.- Agregar 100 µl de la muestra a los pozos correspondientes (suero 1:50 o saliva 1:5 en PBS).
- 6.- Tapar la placa e incubar 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 7.- Tirar el sobrenadante y lavar como en el paso 4.
- 8.- Colocar a todos los pozos 100 µl del conjugado, para IgA e IgG diluido 1:1000 y para IgM 1:500.
- 9.- Incubar 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 10.- Tirar el sobrenadante y lavar como en el paso 4.
- 11.- Adicionar a todos los pozos 100 µl del sustrato e incubar 15 minutos a 37°C.
- 12.- Determinar la densidad óptica a 490 nm.

RESULTADOS

1.- El antígeno de Toxoplasma gondii fué proporcionado por el Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina. Se determinó su concentración y se diluyó con PBS hasta tener 4 µl/ml para emplearse en el método ELISA.

2.- Se tomaron 60 muestras de saliva y sangre; salivas y sueros fueron descomplementados y congelados hasta su uso. Las muestras fueron de niños y adultos de ambos sexos, los niños con una edad de 1 a 17 años, presentando parálisis cerebral, pertenecientes a la Asociación pro persona con parálisis cerebral (APPAC) y los adultos de 20 a 47 años, trabajadores de la misma institución.

3.- Anticuerpos IgG de conejo anticadenas α , τ , μ humanas se precipitaron con solución saturada de sulfato de amonio; se cuantificó la proteína por método Lowry y se acoplaron a Peroxidasa de rábano picante por el método de glutaraldehído de 2 pasos y posteriormente se purificó por precipitación con sulfato de amonio.

4.- Los conjugados que se emplearon en la técnica ELISA fueron de marca comercial (Cappel) (IgG de cabra anti IgA, anti IgG y anti IgM humana). Se consideró para la realización del método ELISA que todo el material a utilizar debe estar libre de cualquier residuo orgánico y jabón, y el agua que se emplee en la preparación de los reactivos debe ser bidestilada en vidrio ya que cualquier tipo de componente orgánico o inorgánico que no

forme parte de la metodología altera los resultados. Se hicieron pequeñas modificaciones en los tiempos de incubación al realizar la metodología no encontrando variación significativa, la técnica ELISA marca incubación de muestras y conjugados de 3 horas a temperatura ambiente, realizándose durante la noche a 4°C.

5.- Se determinó el título de IgM, IgG e IgA específicos a Toxoplasma gondii en suero e IgAs en saliva, encontrando los resultados mostrados en la tabla 4 y 5.

6.- Para determinar la positividad o negatividad de la muestra se considero el criterio establecido en "Data on file (1988), Organon Teknika B.V. Buxtehl Holland", encontrando los siguientes cortes para las inmunoglobulinas:

IgG = 0.5603

IgM = 0.8737

IgA = 0.7026

IgAs = 0.8646

ELISA. TOXOPLASMOSIS.

	IgM	IgG	IgA	IgAs		IgM	IgG	IgA	IgAs
1	1.315	0.964	1.134	0.985	31	0.673	0.654	0.436	0.806
2	0.670	0.525	0.554	0.793	32	0.790	0.652	0.633	0.907
3	0.910	0.654	0.511	0.823	33	0.681	0.447	0.447	0.611
4	0.811	0.476	0.464	0.384	34	0.795	0.739	0.789	0.628
5	0.784	0.522	0.284	0.902	35	0.600	0.548	0.148	0.542
6	0.574	0.534	0.455	0.924	36	0.708	0.548	0.477	0.771
7	1.079	0.609	0.668	0.817	37	1.311	0.870	0.741	1.190
8	1.195	0.459	0.433	0.435	38		0.762	0.859	0.325
9	0.510	0.638	0.695	1.129	39	1.261	0.622	0.679	0.911
10	0.324	0.375	0.375	0.577	40	1.270	0.686	1.037	1.249
11	0.411	0.554	0.466	0.702	41	0.915	0.606	0.649	0.460
12	1.053	0.709	0.598	0.384	42	0.788	0.810	0.579	0.606
13	0.427	0.463	0.502	0.815	43	0.598	0.620	0.709	0.568
14	0.726	0.592	0.636	0.783	44	0.675	0.553	0.754	0.995
15	0.575	0.593	0.596	0.776	45	0.510	0.548	0.478	0.365
16	0.834	0.536	0.526	0.493	46	1.115	0.630	0.763	0.845
17	0.892	0.547	0.641	0.178	47	0.916	0.528	0.618	0.801
18	0.633	0.665	0.798	0.451	48	0.674	0.578	0.597	0.999
19	0.462	0.480	0.256	0.224	49	1.277	1.144	1.437	1.134
20	0.685	0.648	0.575	0.913	50	1.193	1.005	1.110	0.708
21	0.390	0.557	0.605	0.812	51	0.000	0.608	0.574	0.715
22	0.448	0.506	0.664	0.825	52	0.721	0.426	0.284	0.512
23	0.671	0.470	0.297	0.532	53	0.718	0.621	0.808	0.554
24	0.925	0.669	0.717	1.018	54	1.171	0.649	0.794	0.724
25	0.911	0.461	0.305	0.791	55	0.699	0.563	0.906	0.949
26	0.750	0.556	0.365	1.168	56	0.867	0.923	1.081	1.124
27	0.911	0.529	0.544	1.139	57	0.651	0.551	0.597	0.480
28	1.330	0.676	0.783	0.762	58	1.270	1.005	1.191	0.502
29	0.881	0.773	0.588	1.107	59	1.198	0.601	0.679	0.535
30	0.623	0.539	0.338	0.721	60	0.746	0.592	0.547	0.452

TABLA 4 DENSIDADES OPTICAS DEL ELISA

ELISA. TOXOPLASMOSIS.
IFA = 0

IFA = 1:64

	IgM	IgG	IgA	IgAs
1	+	+	+	+
2	-	-	-	-
3	+	+	-	-
4	+	-	-	-
5	-	-	-	+
6	-	-	-	+
7	+	+	-	-
8	+	-	-	-
9	-	+	-	+
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	+	-	-
13	-	-	-	-
14	-	+	-	-
15	-	+	-	-
16	-	-	-	-
17	+	-	-	-
18	-	+	+	-
19	-	-	-	-
20	-	+	-	+
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	+	+	+	+
25	+	-	-	-
26	-	-	-	+
27	+	-	-	+
28	+	+	+	-

	IgM	IgG	IgA	IgAs
29	+	+	-	+
30	-	-	-	-
31	-	+	-	-
32	-	+	-	+
33	-	-	-	-
34	-	+	+	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	+	+	+	+
38	+	+	+	-
39	+	+	-	+
40	+	+	+	+
41	-	+	-	-
42	-	+	-	-
43	-	+	+	-
44	-	+	+	+
45	-	+	-	-
46	+	+	+	-
47	+	-	-	-
48	-	+	-	+

54
TABLA 5 POSITIVIDADES Y NEGATIVIDADES DE LAS MUESTRAS

ELISA. TOXOPLASMOSIS.

IFA = 1:128

	IgM	IgG	IgA	IgAs
49	+	+	+	+
56	-	+	+	+
55	-	+	-	+
53	-	+	+	-
50	+	+	+	-
54	+	+	+	-
51	-	+	+	-
52	-	-	-	-

IFA = 1:256

	IgM	IgG	IgA	IgAs
60	-	+	-	-
58	+	+	+	-
59	+	+	-	-
57	-	-	-	-

TABLA 5 POSITIVIDAD Y NEGATIVIDAD DE LAS MUESTRAS

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1.- De las 60 muestras, el 38% presenta título positivo de IgM, 60% de IgG, 30% de IgA y 30% de IgAs (gráfica 1).

2.- De las 60 muestras 9 son negativas y 3 positivas en todas las determinaciones (IFA, ELISA IgAs, IgM, IgG, IgA).

3.- Considerando los resultados de la determinación indirecta de anticuerpos fluorescentes (realizada en estudios anteriores por el Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina) las muestras se clasificaron en 4 grupos:

GPO. I IFA negativo : formado por 28 muestras, de las cuales el 39% presenta título positivo de IgM, 39% de IgG, 14% de IgA y 28% de IgAs (gráfica 2).

GPO. II IFA = 1:64 : formado por 20 muestras, aquí el 35% presenta título positivo de IgM, 75% de IgG, 35% de IgA y 35% de IgAs (gráfica 3).

GPO. III IFA = 1:128 : formado por 8 muestras, presentando el 37% título positivo de IgM, 87% de IgG, 75% de IgA y 37% de IgAs (gráfica 4).

GPO. IV IFA = 1:256 : formado por 4 muestras, de las cuales el 50% presenta título positivo de IgM, 75% de IgG, 25% de IgA y 0% de IgAs (gráfica 5).

4.- De las 60 muestras 14 corresponden a niños, 12 a niñas, 5 adultos masculinos y 29 adultos femeninos, quienes presentan valores positivos en la siguiente proporción (gráfica 6 - 9):

ELISA

	IFA	IgM	IgG	IgA	IgAs
Niños (n=14)	8	5	7	3	4
Niñas (n=12)	12	6	10	6	4
Adulto masc. (n=5)	0	1	1	0	2
Adulto fem. (n=29)	12	10	17	8	6

5.- Comparando la positividad de la IgAs con las demás determinaciones tenemos las siguientes combinaciones:

GPO. A (IgAs+, IgM+, IgG+, IgA+): este perfil inmunológico se presenta en 5 muestras, de las cuales 2 no presentan positividad en IFA.

GPO. B (IgAs+, IgM-, IgG+, IgA+): ésta característica se presenta en 2 muestras, siendo positivas en IFA.

GPO. C (IgAs+, IgM-, IgG-, IgA-): se presenta en 3 muestras, siendo negativas en IFA.

GPO. D (IgAs+, IgM+, IgG+, IgA-): presente en 2 muestras, con positividad en IFA.

GPO. E (IgAs+, IgM-, IgG+, IgA-): se observa en 5 muestras, de las cuales solo 3 son positivas en IFA.

GPO. F (IgAs+, IgM+, IgG-, IgA-): presente en 1 muestra, siendo negativa en IFA.

6.- Comparando la negatividad encontrada en IgAs tenemos:

GPO. I (IgAs-, IgM-, IgG+, IgA+): éste perfil se encuentra en 5

muestras, de las cuales 1 es negativa en IFA.

GPO. II (IgAs-, IgM+, IgG+, IgA-): presente en 4 muestras, siendo 3 negativas en IFA.

GPO. III (IgAs-, IgM-, IgG+, IgA-): se observa en 7 muestras, de éstas 4 son negativas en IFA.

GPO. IV (IgAs-, IgM+, IgG-, IgA-): se presenta en 5 muestras, de ellas 4 son negativas en IFA.

GPO. V (IgAs-, IgM+, IgG+, IgA+): presente en 6 muestras, de las cuales 1 es negativa en IFA.

GPO. VI (IgAs-, IgM-, IgG-, IgA-): presente en 15 muestras, de las cuales 10 fueron negativas en IFA.

7.- 11 muestras presentan positividad en las determinaciones de IgM, IgG e IgA (ELISA), de las cuales 5 son positivas en IgAs y 6 son negativas.

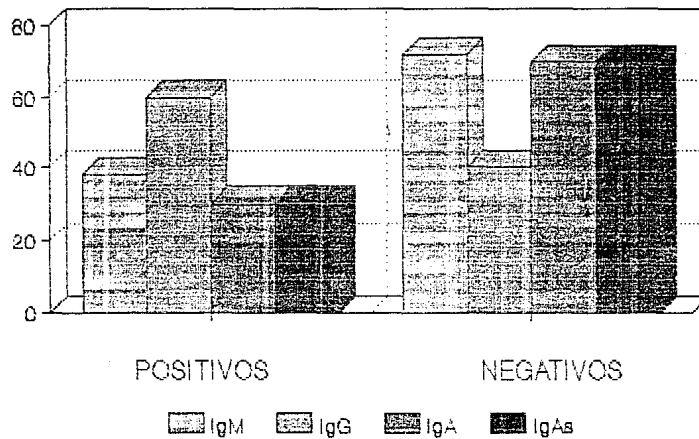
8.- 18 muestras son negativas en IgM, IgG e IgA (ELISA), de ellas 15 fueron negativas en IgAs y 3 positivas.

9.- Relación de IgAs con IgM: 8 muestras correlacionan en positividad y 27 en negatividad (gráfica 10, 11, 12).

10.- Relación IgAs con IgG : 14 muestras correlacionan en positividad y 20 en negatividad (gráfica 10, 11, 12).

11.- Relación IgAs con IgA sérica : 7 muestras correlacionan en positividad y 31 en negatividad (gráfica 10, 11, 12).

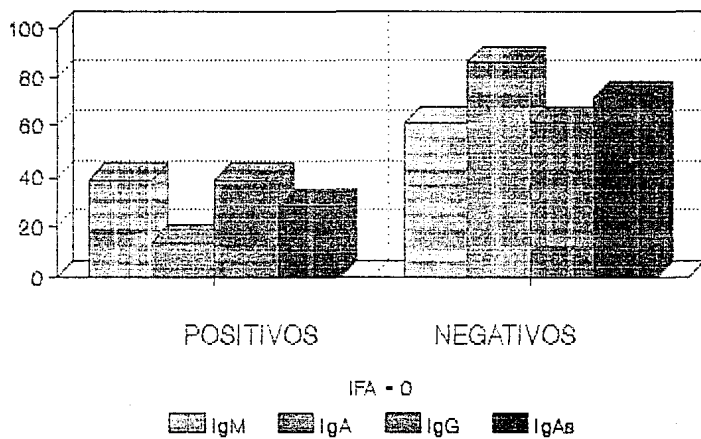
ELISA TOXOPLASMOSIS



GRAFICA 1

60 MUESTRAS

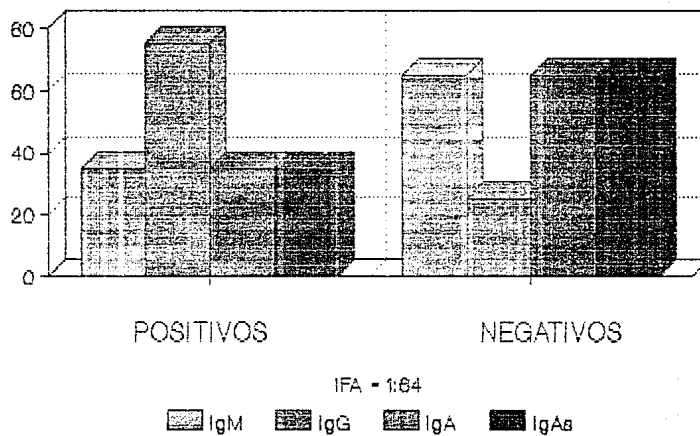
ELISA TOXOPLASMOSIS



GRAFICA 2

26 MUESTRAS

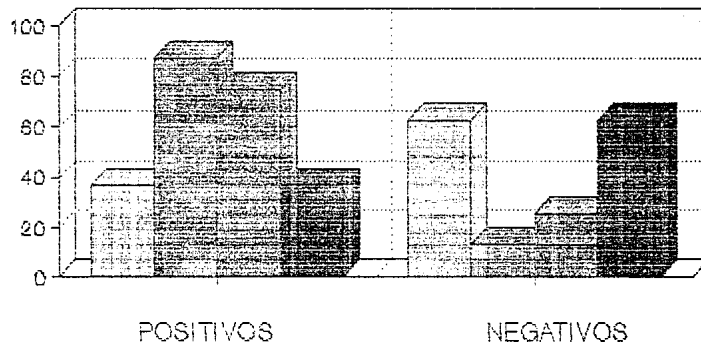
ELISA TOXOPLASMOSIS



GRAFICA 3

20 MUESTRAS

ELISA TOXOPLASMOSIS



IFA - 1:128

IgM

IgG

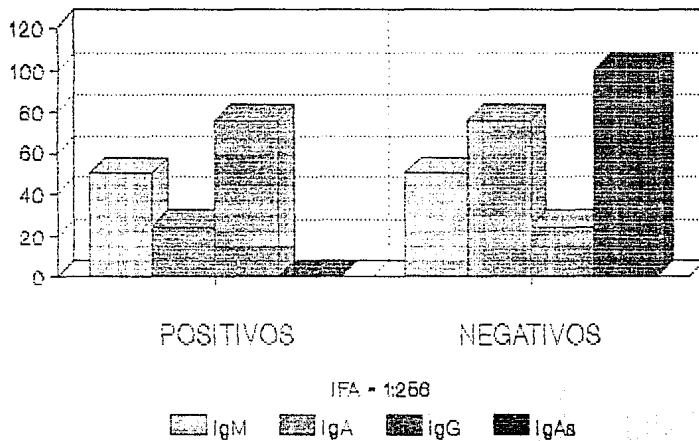
IgA

IgAs

GRAFICA 4

6 MUESTRAS

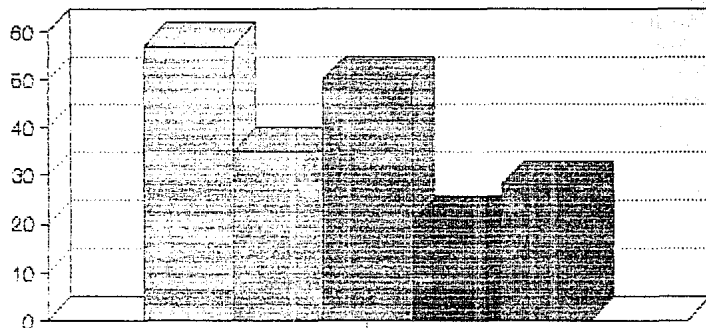
ELISA TOXOPLASMOSIS



GRAFICA 6

4 MUESTRAS

TOXOPLASMOSIS



POSITIVOS

NIÑOS

IFA

IgM

IgG

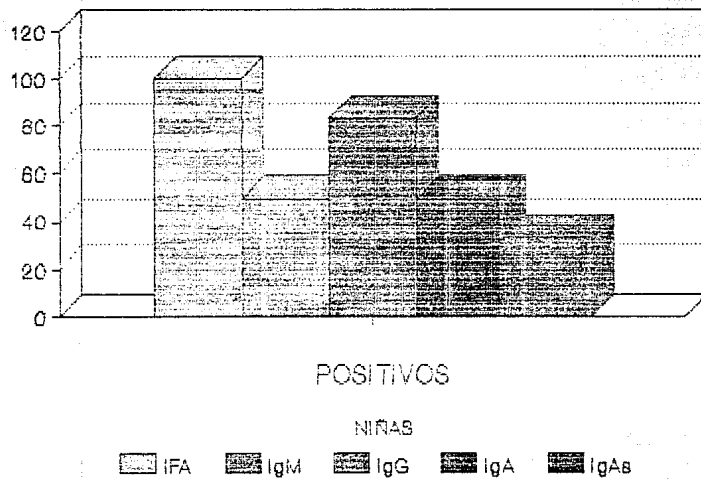
IgA

IgAs

GRAFICA 6

14 MUESTRAS

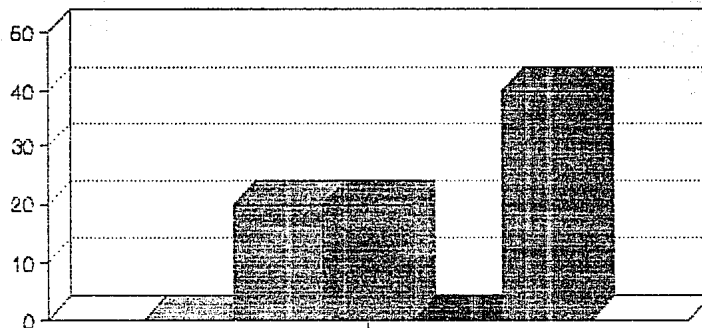
TOXOPLASMOSIS



GRAFICA 7

12 MUESTRAS

TOXOPLASMOSIS



POSITIVOS

ADULTOS MASCULINO

IFA

IgM

IgG

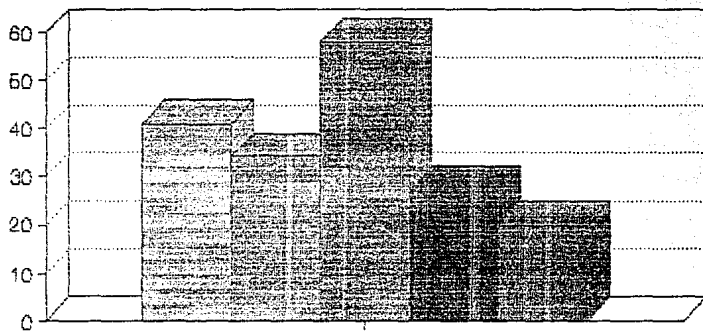
IgA

IgAs

GRAFICA 8

6 MUESTRAS

TOXOPLASMOSIS



POSITIVOS

ADULTOS FEMENINO

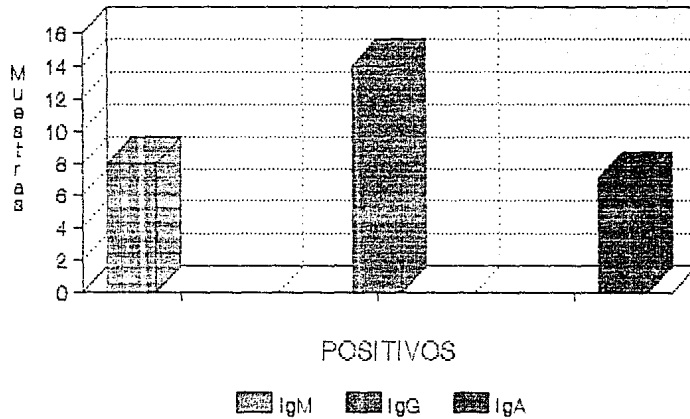
IFA IgM IgG IgA IgAs

GRAFICA 9

29 MUESTRAS

ELISA

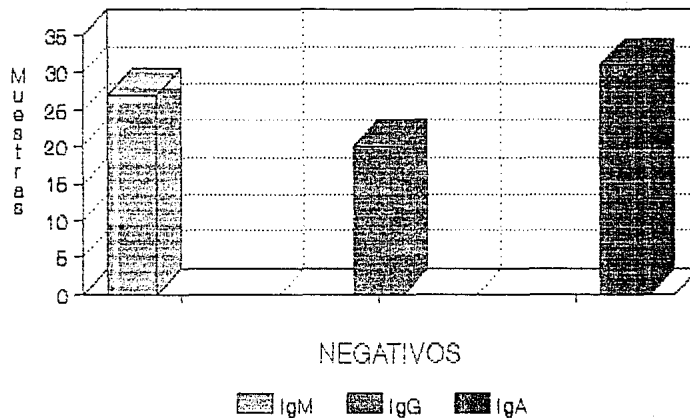
CORRELACION IgAs/(IgM, IgG, IgA)



GRAFICA 10

ELISA

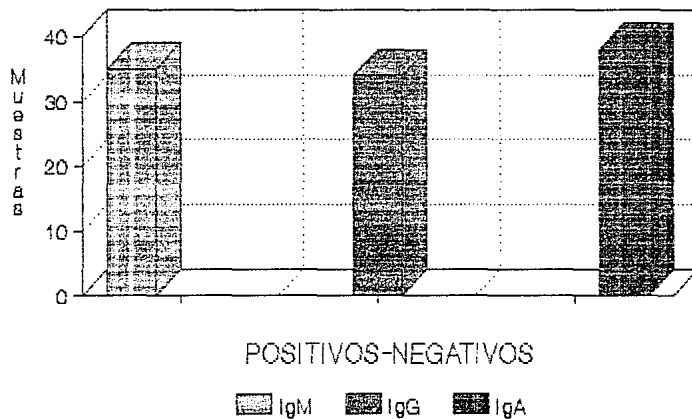
CORRELACION IgAs/(IgM, IgG, IgA)



GRAFICA 11

ELISA

CORRELACION IgAs/(IgM, IgG, IgA)



GRAFICA 12

CONCLUSIONES

Si se detectan anticuerpos específicos a Toxoplasma gondii en saliva, aunque no existe una buena correlación con los niveles séricos, esto es de esperarse ya que la IgA no trasuda totalmente hacia secreciones y las inmunoglobulinas no se sintetizan al mismo tiempo. La IgG es la que en mayor casos es detectada ya que ésta puede permanecer elevada durante más tiempo.

Existe relación de la IgA salival con la positividad y negatividad encontrada en las determinaciones séricas, con IgM del 58%, con IgG del 56.6% y con IgA del 63.3%, teniendo una mayor correlación con la IgA sérica.

Los resultados obtenidos con el método ELISA tienen buena correlación con la clínica de los pacientes.

Se obtienen mejores resultados acordes con la clínica con el método ELISA que con la determinación indirecta de anticuerpos fluorescentes.

No se puede concluir que la determinación de IgA en saliva por el método ELISA no sea satisfactoria como prueba alternativa para el diagnóstico de la toxoplasmosis, ya que no se sabía en que fase de la infección se encontraban los pacientes.

Para poder establecer que la prueba pueda considerarse alternativa es necesario realizar un estudio en el cual se vayan

detectando los niveles de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA sérica e IgA salival) durante las diferentes etapas de la infección y determinar con exactitud que correlación existe entre ellas y con la clínica del paciente.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Araujo F, Handman E & Remington JS: "Use of monoclonal antibodies to detect antigens of T. gondii in serum and other body fluids". Infect Immun 1980, 30, 12.
- 2.- Avrameas S, Guesdon JL & Ternynck T: "Brief General Review on Immunoenzyme Techniques". Unite d'Immunocytochimie, Institut Pasteur, France, 1-25.
- 3.- Avrameas S, Ternynck T & Guesdon JL: "Coupling of enzymes to antibodies and antigens". Scand J Immunol 1978, 7, 7-23.
- 4.- Barrett T: "Inmunología, Inmunoquímica e Inmunobiología", 4a. ed., Ed. Interamericana, México 1985, 24.
- 5.- Biagi F: "Enfermedades parasitarias". Ed. La Prensa Médica Mexicana, 1986, 171-181.
- 6.- Brown CR and McLeod R: "Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number T. gondii infection". J Immunology 1990, 145 (10), 3438.
- 7.- Bustamante YD: "Manual de Prácticas de Inmunología". Dpto. de Inmunología, Esc. Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México 1985.
- 8.- Calderón Jaimes E: "Immune response to toxoplasmosis". Bol Med Hosp Infant Mex 1986, 43 (10), 658.
- 9.- Calderón JE, León DG: "Interpretación de las pruebas inmunoserológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis" Infectología 1985, S, 258.
- 10.- Charif H, Darcy F, Torpier G, Cesbron-Delauw MF, Capron A: "Toxoplasma gondii: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites". Exp Parasitology 1990, 71 (1), 114.
- 11.- Decoster A, Darcy F, Capron A: "Recognition of T. gondii excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection". Clin Exp Immunol 1988, 73 (3), 376.
- 12.- Decoster A, Darcy F, Caron A, Capron A: "IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis". Lancet 1988, 2 (8620), 1104.
- 13.- Erbe DV, Pfefferkorn Ef: "Functions of the various human IgG Fc receptors in mediating killing of T. gondii". J Immunology 1991, 146 (9), 3145

- 14.- Fernández TM, Sibaja C MT, Granier AR: "Encuesta seroepidemiológica de anticuerpos anti Toxoplasma gondii en 125 mujeres embarazadas del oriente del estado de Tabasco". Bol Med Hosp Infant Mex 1986, 43, 274.
- 15.- Ferson MJ, Roberston PN: "Congenital Toxoplasmosis letter". Med Aust 1989, 150 (2), 110.
- 16.- Frenkel J. K. : "Pathophysiology of Toxoplasmosis". Parasitology Today, 1988, 4 (10), 273.
- 17.- Fudenberg H, Stites P, Caldwell J, Wella V: "Inmunología Clínica": Ed. El Manual Moderno, 1980, 23-39, 746.
- 18.- Gazzinelli R, Hakim F, Hiény S, Shearer GM, Sher A: "Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in γ IFN production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine". J Immunol 1991, 146, 286.
- 19.- Golledge CL, BSC, MB and Miles H Beaman: "Toxoplasmosis and Pregnancy". Aust NZ J Obstet Gynaecol 1990, 30, 32.
- 20.- Handman E & Remington JS: "Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to T. gondii". Immunology 1980, 40, 577.
- 21.- Handman E, Goding JW & Remington JS: "Detection and characterization of membrane antigens of T. gondii". J Immunol 1980, 124, 2578.
- 22.- Heremans JF: "Immunoglobulin A" in The Antigens Vol. II, 1974, Academic Press, 384-495.
- 23.- Johnson A, Mc Donald FJ & Neoh SH: "Molecular weight analysis of Toxoplasma gondii soluble antigens". J Parasitol 1983, 69, 459.
- 24.- Kennedy JH, Kricka LJ and Wilding E: "Protein-protein coupling reactions and the applications of protein conjugates". Clinical Chimica Acta 1976, 70, 1-31.
- 25.- Khan IA et al.: "Induction of antigen specific human cytotoxic T cells by Toxoplasma gondii". J Clin Invest 1990, 85 (6), 1879.
- 26.- Koskiniemi M, Lappalainen M, Hedman K: "Toxoplasmosis needs evaluation. An overview and proposals". Am J Dis Child 1989, 143 (6), 724.
- 27.- Lumsden WHR: "Application of immunological methods in protozoology". Applications of Immunological methods in

- Biomedical Sciences, in: Handbook of Experimental Immunology, 1986, chapter 122. Blackwell Scientific Publications.
28. - Lumsden WHR : "Demonstration of antibodies to Protozoa". Application of Immunological methods, in: Handbook of Experimental Immunology, 1978, chapter 42. Blackwell Scientific Publications.
29. - Male D., Champion B, Cooke A : "Advanced Immunology" ed by the British Society for Immunology. Gower Medical Publishing. London 1987, chapter 1-2, 7-9.
30. - Markell F, Voge M: "Parasitologia". Ed El Manual Moderno, 1984, 141.
31. - Nakamura RM, Voller A & Bidwell DE: "Enzyme immunoassay: heterogeneous and homogeneous systems". Immunochemistry in Handbook of experimental immunology, 1986, chapter 27. Blackwell Scientific Publications.
32. - Nakane P & Kawaoi A: "Peroxidase Labeled Antibody. A new method of conjugation". J Histochem and Cytochem 1974, 22 (12), 1084.
33. - Naot Y, Barnett F, Remington J: "Method for avoiding false positive results occurring in immunoglobulin M enzyme linked immunosorbent assays due to presence of both Rheumatoid factor and antinuclear antibodies". J Clinical Microbiology 1981, 14 (1), 73.
34. - O'Beirne AJ and Cooper HR: "Heterogeneous enzyme immunoassay". J Histochem and Cytochem 1979, 27 (8), 1148.
35. - Partanen P, Turunen HJ, Paaivuo RA, Leinikki PO: "Immunoblot analysis of Toxoplasma gondii antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection". J Clin Microbiol 1984, 20, 133.
36. - Pearson IW & Clarke MW: "Antigens of parasites". Immunochemistry in: Handbook of Experimental Immunology, chapter 6. Blackwell Scientific Publications 1986.
37. - Pinnon JM, Theannes H and Gruson N: "An enzyme linked Immuno-Filtration Assay used to compare and maternal antibody profiles in toxoplasmosis". J Immunological Methods 1985, 77, 15.
38. - Pinnon JM et al.: "Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis": J Clinical Microbiology 1990, 28 (8), 1739.

- 39.- Roitt I, Brostoff J, Male D: "Immunology". Gower Medical Publishing, England 1985, chapter 2, 5, 8, 11, 17.
- 40.- Santoro F, Afchaim D, Pierce R, Cesbron J., Ovalque G, Capron A: "Serodiagnosis of toxoplasma infection using a purified parasite protein (P30)". Clin exp immunol 1985, 62, 262.
- 41.- Sever JL, Ellenber JH, Ley AC, Madden D1, Fucillo DA, Tzan NR, Edmonds DM: "Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23000 pregnancies". Pediatrics 1988, 82 (2), 181.
- 42.- Skinner LJ, Chatterton JM, Joss AW, Moir IL, Ho Yen Do: "The use of an IgM immunosorbent agglutination assay to diagnose congenital toxoplasmosis". J Med Microbiol 1989, 28 (2), 125.
- 43.- Stepick Biek et al.: "IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis". J Infect Dis 1990, 162 (1), 270.
- 44.- Suzuki Y et al : "Use of acute stage specific antigens of Toxoplasma gondii for serodiagnosis of acute toxoplasmosis". J Clin Microbiol 1990, 28 (8), 1734.
- 45.- Suzuki Y, Thuilliez P, Desmontes G, Remington J : "Antigens responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of toxoplasma infection in humans". J Clinical Microbiology 1988, 26 (5), 901.
- 46.- Tay Z.J., Lara A.R., Velasco C.O, Gutiérrez O.M. : "Parasitología Médica" 5a. ed, Ed. Fco. Mendez Cervantes, p 173.
- 47.- "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)". Bull World Health Organ 1976, 54, 129.
- 48.- Turunen H, Vuorio KA, Leinikki PD: "Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by ELISA". Scand J Infect Dis 1983, 15, 307.
- 49.- Voller A, Bidwell D and Bartlett A: "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)": Dynatech Laboratories Inc 1979, 7-41.
- 50.- Voller A, Bidwell D, Bartlett A: "Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in Manual of Clinical Immunology", ed by American Society for Microbiology. Rose & Fredman, 1980, 359.
- 51.- Voller A, Bidwell D, Bartlett A, Fleck D, Perkins M and Oladehin B : "A microplate enzyme immunoassay for Toxoplasma antibody". J Clin Pathol 1976, 29 (2), 150.

52.- Wisdom Erlan: "Enzyme immunoassay". Clinical Chemistry 1976,
22 (8), 1243.