

7
ce

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS PRUEBAS DE DOT-ELISA
(ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) E IFI
(INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA) PARA LA DETECCION
DE ANTICUERPOS CONTRA *Toxoplasma gondii*, EN UNA
ENCUESTA SEROEPIDEMIOLOGICA EN POBLACION ABIERTA
EN LA PENINSULA DE YUCATAN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

PIEDAD LUCILA CABALLERO RAMIREZ

ASESOR DE TESIS:

MVZ Pablo Martínez Labat

FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Estudio comparativo entre las pruebas de Dot-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e IFI (Inmunofluorescencia indirecta) para la detección de anticuerpos contra Toxoplasma gondii, en una encuesta seroepidemiológica en población abierta en la península de Yucatán, que presenta la pasante: Piedad Lucila Caballero Ramírez con número de cuenta: 8154764-1 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga .

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de septiembre de 1995

PRESIDENTE	Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo	<i>Juan Antonio Montaraz Crespo</i> 27/11/95
VOCAL	Q.F.B. Idalia Avila Mivazava	<i>Idalia Avila Mivazava</i>
SECRETARIO	M.V.Z. Pablo Martínez Labat	<i>Pablo Martínez Labat</i>
PRIMER SUPLENTE	M.V.Z. Jorge Torres Martínez	<i>Jorge Torres Martínez</i>
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Victor M. Zendejas Buitrón	<i>Victor M. Zendejas Buitrón</i>

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, bajo la asesoría del Dr. Oscar Velasco Castrejón, a quien le agradezco el apoyo que me brindó.

A los miembros del Honorable Jurado

Presidente Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

Vocal OFB Idalia Avila Miyazawa

Secretario MVZ Pablo Martínez Labat

Primer suplente MVZ Jorge Torres Martínez

Segundo suplente OFB Victor M. Zendejas Buitrón

por todas las atenciones que me brindaron.

A la Universidad Nacional Autónoma de
México por darme la oportunidad de
formarme profesionalmente.

A mi esposo Mario Alberto con amor y a quien le agradezco el apoyo que me brindó para que pudiera realizar esta meta.

A mis hijos Angélica, Dulce y Mario Alberto con cariño y amor

A mis padres Angel Caballero y Piedad Ramirez de Caballero por su constante estímulo y apoyo, ya que sin ellos la terminación de este trabajo no hubiera sido posible.

A mis hermanos Angélica, Héctor, Verónica
y Pilar con afecto y respeto.

A mis abuelos Manuel, Carmelita,
Enrique y Eulalia con cariño.

En especial agradezco a mi asesor de tesis MVZ
Pablo Martínez Labat, a mi padre QBP Angel
Caballero Servín, a mis amigas QFB Georgina
García Acosta y CP Silvia Alcalá de Caballero por
sus valiosos consejos y ayuda profesional para
realizar este trabajo de Tesis.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
2.1 Biología y Morfología	3
2.2 Ciclo de Vida	9
2.3 Patología	10
2.4 Modalidades Clínicas	13
2.5 Inmunología	15
2.6 Epidemiología	21
2.7 Diagnóstico de Toxoplasmosis en el laboratorio	22
2.8 Tratamiento y Profilaxis	23
3. ANTECEDENTES HISTORICOS EN MEXICO	26
4. INMUNODIAGNOSTICO	28
4.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	28
4.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
5. OBJETIVOS	34
6. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	35
7. HIPOTESIS EXPERIMENTAL	36
8. MATERIAL Y METODOS	37
8.1 Suero problema	37
8.2 Suero control	37

8.3	Antígeno	37
8.4	Preparación de laminillas con antígeno para IFI	39
8.5	Sensibilización de los discos con el antígeno para Dot-ELISA	39
8.6	Preparación de conjugado para IFI	40
8.7	Preparación de conjugado para Dot-ELISA	40
8.8	Preparación de sustrato	41
8.9	Solución amortiguadora de fosfatos pH - 7.2	41
8.10	Desarrollo de la técnica de IFI para determinación de anticuerpos IgG contra Toxoplasma gondii	41
8.11	Desarrollo de la técnica de Dot-ELISA para determinar anticuerpos IgG contra Toxoplasma gondii	45
9.	RESULTADOS	49
9.1	Frecuencia de anticuerpos en sueros problema	49
9.2	Sensibilidad, especificidad, valor de predicción, comparación de proporciones en grupos apareados (χ^2) y reproducibilidad	51
9.3	Distribución de títulos de anticuerpos antitoxoplasma gondii por técnicas de Dot-ELISA	56
9.4	Seroprevalencia por grupo de edad y sexo en población abierta en la península de Yucatán	58
10.	DISCUSION	60
11.	CONCLUSIONES	64
12.	BIBLIOGRAFIA	66

1. RESUMEN

En este trabajo de tesis, se presentan los resultados obtenidos con las técnicas de IFI (Inmunofluorescencia indirecta) y Dot-ELISA (Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para la detección de anticuerpos contra **Toxoplasma gondii** en una encuesta seroepidemiológica en población abierta en la península de Yucatán, a 539 sueros humanos, en donde se observa y se analizan los resultados.

Se encontró que en la técnica de Dot-ELISA se tiene una seroprevalencia de 56.9% lo cual se considera no estar muy alejada de la obtenida por IFI que tiene una seroprevalencia de 53.2%.

Al realizar los cálculos estadísticos se encontró que la prueba de Dot-ELISA tiene una sensibilidad de 92%, una especificidad de 83%, un valor de predicción positivo de 86% y un valor de predicción negativo de 90%, en relación a la técnica de IFI que es la prueba de referencia.

De acuerdo a los resultados se puede decir que la técnica de Dot-ELISA es una buena alternativa para estudios seroepidemiológicos contra toxoplasmosis, particularmente porque es una prueba de campo y no requiere equipo caro.

Por otro lado se determinó la prevalencia de toxoplasmosis en el área de la Península de Yucatán con un 53.2%

Por último podemos decir que este estudio es el resultado de la integración de los adelantos de la Parasitología e Inmunología para crear nuevas alternativas en el diagnóstico de la toxoplasmosis.

2. INTRODUCCION

2.1 BIOLOGÍA Y MORFOLOGÍA

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular, su hospedero definitivo es el gato, el cual produce una zoonosis, donde el hombre representa un accidente en la cadena de transmisión. [3, 4, 10, 11, 19, 32]

Su posición taxonómica es:

Phylum:	Protozoa
Subphylum:	Apicomplexa
Clase:	Esporozoa
Subclase:	Coccidia
Orden:	Eucoccidia
Suborden:	Elmerina
Familia:	Sarcocystidae
Subfamilia:	Toxoplasmatinae
Género:	Toxoplasma
Especie:	gondii

Estudios han demostrado que **Toxoplasma gondii** tiene una fase sexual y otra asexual en el ciclo de vida. [2]

2.1.1 Morfología de *Toxoplasma gondii* en hospedero definitivo

El ciclo del parásito se presenta en el intestino del gato, donde se realiza la formación de Ooquistes dentro de las células epiteliales de la mucosa, donde alcanzan la fase esquizonte en el cual mediante esquizogonia da origen a los merozoítos, transformándose después en gametos femenino y masculino que al ser fecundado da lugar al cigoto o huevo que es expulsado del intestino con la materia fecal en forma de Ooquistes (fig. 1).

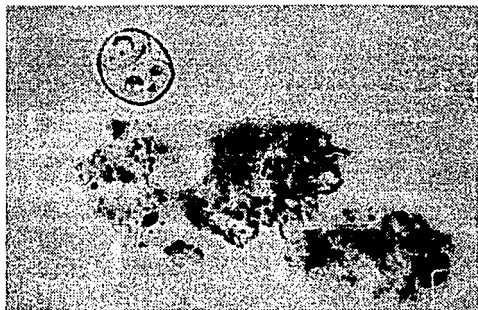


Figura 1. Ooquistes de *Toxoplasma gondii* en las heces de gato. (Fotografía de Harley Sheffield. Foundations of Parasitology, St. Louis, 1977). (2)

Los Ooquistes sin esporular salen en las heces del gato y otros felinos, contienen un esporonte o masa interna del citoplasma y, en condiciones favorables de temperatura y humedad, el esporonte se divide y da lugar a dos cuerpos esferoides llamados esporoblastos, los que al

madurar dan lugar a los esporoquistes, después, dentro de cada esporoquiste se desarrollan cuatro esporozoítos de 2 a 3 micrómetros de largo, este proceso se conoce como esporogonia (fig 2) (2, 13, 18, 19, 21, 29).

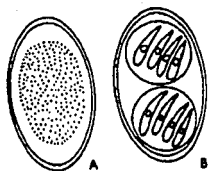


Figura 2. Toxoplasma gondii. A. Oociste sin esporular; B. Oociste esporulado. (29)

2.1.2. Morfología de Toxoplasma gondii en el hospedero intermedio.

El parásito se encuentra en tejidos de mamíferos, incluyendo el hombre donde se realiza la formación de pseudoquistes, quistes y trofozoítos (13, 19, 21).

Bradizoítos: Se encuentran en infecciones crónicas, los quistes son las formas predominantes, estos aparecen en el ciclo de vida del parásito, inducidos por el estado del hospedero, los quistes poseen una membrana y miden 29-200 micrómetros de forma generalmente redondeada, en su interior se encuentran cientos de parásitos conocidos como bradizoítos (fig. 3, 4) (2, 18).

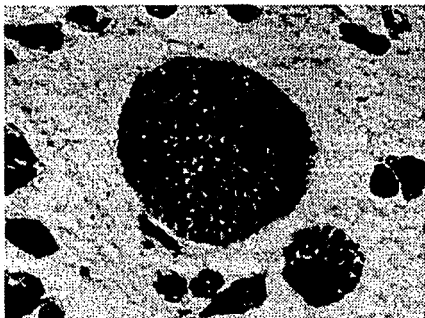


Figura 3. Quiste de *Toxoplasma gondii* en cerebro de ratón. [21]

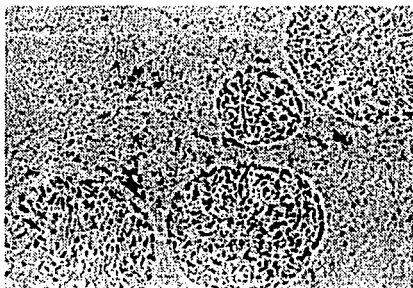


Figura 4. Bradizoitos de *Toxoplasma gondii* en una preparación cruzada sin teñir de cerebro de ratón. [Cortesía del Dr. B. H. Kean y el Dr. Anne C. Kimball, Cornell University, Medical College.] [2]

Taquizoitos: Los taquizoitos de **Toxoplasma gondii** pueden encontrarse en los ganglios linfáticos mesentéricos y en otros órganos del gato, en tanto que en otros vertebrados, esas formas no intestinales son las únicas que se observan (fig 5) (2, 18, 19, 21, 29).

Son formas que se multiplican con rapidez, características de la infección aguda, se desarrollan dentro del pseudoquiste su tamaño es de 4 a 6 micrómetros de longitud por 2 a 3 micrómetros de ancho en forma de huso (2, 19, 21, 29).

La multiplicación de los organismos dentro de una célula infectada suele producir la muerte y rompimiento de la célula con liberación de parásitos y diseminación de la infección en otras células, causando las lesiones y que varían en gravedad en relación directa con el número de parásitos.

Entre las cepas prototipos descritas de manera internacional de **Toxoplasma gondii** son las cepas C, P, y Rh, las cuales tienen diferentes estructuras antigénicas. (7, 8, 13).

Son 12 los antígenos detectados en la cepa Rh (cuadro 1) (4, 5).

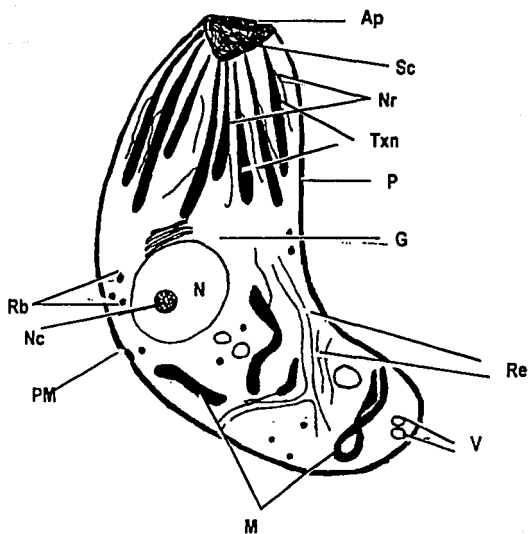


Figura 5. Morfología de *Toxoplasma gondii*. Ap: Anillo polar; Sc: Sistema conoide; Nr: Nervaduras radiales; Txn: Toxonemas; P: Pared con doble membrana; G: Aparato de Golgi; Re: Retículo endoplasmático; V: Vacuolas; M: Mitocondrias; PM: Micrópilo; Rb: Ribosomas; N: Núcleo; Nc: Nucleolo.

CUADRO No. 1

**CARACTERISTICAS DE LOS ANTIGENOS DE TOXOPLASMA
GONDII CEPA Rh**

ANTIGENO	PM	NATURALEZA	LOCALIZACION
1	139×10^3	Proteínas	Membrana
2	61×10^3	Proteínas	Membrana
3	139×10^3	Glicoproteínas	Membrana
4	150×10^3	Proteínas	Intracelular
5	324×10^3	Proteínas	Intracelular
6	10×10^3	Proteínas	Intracelular
7	105×10^3	Lipopolisacárido	Desconocido
8	46×10^3	Proteínas	Desconocido
9	140×10^3	Proteínas	Desconocido
10	105×10^3	Proteínas	Desconocido
11	105×10^3	Proteínas	Membrana
12	NP*	NP*	NP*

NP* No probado

2.2 CICLO DE VIDA

La transmisión de **Toxoplasma gondii** incluye el ciclo natural y el ciclo animal doméstico-hombre mencionado según Frenkel. Los dos reservorios importantes del parásito son los felinos, y los hospederos

intermediarios (fig. 6) (11).

El hospedero definitivo de **Toxoplasma gondii** es el gato, el cual adquiere la enfermedad y se convertirá en un portador y diseminador de la forma infectante (Ooquiste), no sólo para el hombre, sino también por los mamíferos herbívoros, para las aves domésticas y para cualquier posible hospedero intermediario susceptible de adquirir la enfermedad. (2, 3, 4, 11, 19, 29).

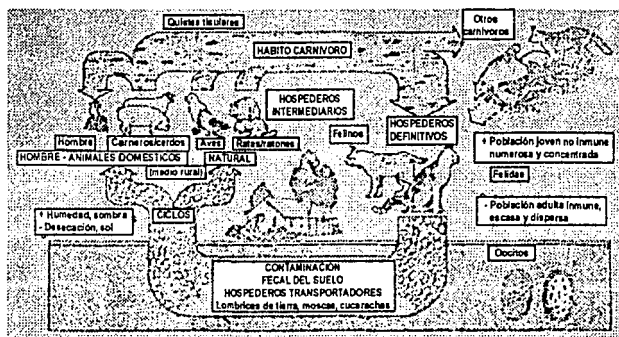


Figura 6. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. (11)

2.3 PATOLOGÍA.

El mecanismo etiopatológico acontece a partir del sitio de la infección hasta la diseminación de los diferentes órganos. El lumen intestinal

es en general el primer sitio invadido, debido al consumo de alimentos contaminados con formas infectantes de **Toxoplasma gondii**, en el intestino son destruidas gran cantidad de células epiteliales de la mucosa las cuales tienen una rápida regeneración compensando el desarrollo de los taquizoitos (2, 3, 5, 19).

En el mecanismo patológico de esta variedad clínica de la enfermedad, muchos trofozoitos alcanzan la circulación sistémica por vía transintestinal llevados por macrófagos infectados y leucocitos donde los fagocitos y anticuerpos inespecíficos rinden cuenta de una gran parte de los mismos (29).

En esta etapa suelen presentarse los síntomas generales con una graduación variable de intensidad pudiendo incluso estar ausentes (29).

Los ganglios linfáticos mesentéricos y parénquima hepático son los primeros tejidos que atacan los parásitos, estos tejidos presentan una rápida regeneración (2, 3). Otros tejidos afectados son las células de músculo liso, células endoteliales y las neuronas, los taquizoitos ocasionalmente invaden los pulmones, corazón, cerebro y los ojos en donde causan serias lesiones (17, 19).

Después de una o dos semanas, cuando se desarrolla la inmunidad en esta situación pueden ocurrir dos cosas; si hay una adecuada respuesta inmunitaria, los anticuerpos específicos acaban por destruir las formas libres

o extracelulares. La proliferación de los parásitos disminuye, obligando a estos a protegerse mediante la formación de bradizoitos enquistados en los tejidos predilectos, que con mayor frecuencia son cerebro, retina, miocardio y músculo esquelético, sin producir reacción inflamatoria (2).

La segunda, es que si el mecanismo inmunitario no responde adecuadamente, como en el caso de pacientes tratados con inmunosupresores, pacientes con SIDA con inmunodeficiencia secundaria, tumores malignos, pueden presentarse formas clínicas agudas de la enfermedad. Donde los parásitos pueden invadir, multiplicarse en cualquier órgano del cuerpo humano. En algunos casos sobreviene la muerte por la invasión de taquizoitos (23).

En la toxoplasmosis adquirida durante la gestación, los agentes patógenos que circulan en la sangre materna, llegan a localizarse en los espacios intravellosos de la placenta, donde origina un foco infeccioso, pasan luego a los vasos de las vellosidades coriales y de ahí al feto, dando como resultado la muerte o el nacimiento de un lactante severamente afectado (6, 26).

Aproximadamente 30% de los fetos pueden adquirir la infección con una amplia gama de signos clínicos, al momento de nacer presentan Ictericia, retinocoroiditis, hidrocefalia o microcefalia, afecciones en SNC, ojos y vísceras. La mayoría de los signos y síntomas no son aparentes sino después del periodo natal (6, 12, 19, 21).

La mayor parte de las cepas de **Toxoplasma gondii**, son poco patógenas para casi todos los hospederos, dado que la inmunidad que sigue a la infección aguda suele estar relacionada con una infección persistente o premunición. (11).

2.4 MODALIDADES CLÍNICAS

Clinicamente la toxoplasmosis presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas, pero dependiendo del mecanismo de infección, esta enfermedad puede ser adquirida o transmitida durante la gestación, términos que por lo general son difíciles de manejar, ya que en ocasiones no se puede definir el tipo clínico mediante el cual el hombre se infecta, es posible afirmar que todos los tipos de toxoplasmosis son adquiridos, sólo que en una la infección se realiza durante la etapa gestacional, es decir in útero y en otros casos se adquiere después del nacimiento (18).

Sin embargo hay ocasiones en que no es posible aclarar cual ha sido el mecanismo de infección. Tanto por la implicación de los datos clínicos, como por la edad en que se presentan.

De tal manera que se clasificarán las modalidades clínicas de acuerdo como nos describe Frenkel, donde conjuga las diferentes variantes que participan en esta infección (cuadro 2) (11).

Cuadro 2

Formas clínicas y subclínicas de Toxoplasmosis humana

	Toxoplasmosis clínica diferida [Subclínica en la madre, clínica en el hijo]	Minima	Aguda	Subaguda	Infección crónica	Recrudescencia en el hospedero con Inmunosupresión	Toxoplasmosis subclínica [Infección oculta]
Manifestaciones	Madre: asintomática Producto: hepatitis, neumonía, encefalitis, coriorretinitis (véase toxoplasmosis clínica subaguda)	Fiebre, linfoadenopatía	Neumonía, hepatitis, miocarditis, miosis, encefalitis y coriorretinitis		Coriorretinitis	Encefalitis (miocarditis, neumonía, coriorretinitis)	Ninguna
Datos serológicos característicos	Seroconversión con títulos altos de anticuerpos en las fracciones IgM e IgG	Seroconversión, títulos altos de IgM e IgG	Títulos altos de IgM e IgG		Títulos intermedios o bajos de IgG	Títulos variables de IgG	Títulos estables de IgG
Factores inmunitarios y estado de la inmunidad	a) Resistencia por la edad (madre) b) Inmadurez inmunitaria (criatura) c) Inmunización pasiva (criatura)	a) Inmunidad adquirida casi óptima	a) Inmunidad adquirida en forma tardía o insuficiente	a) Inmunidad adquirida en forma insuficiente b) Inmadurez inmunitaria c) Inmunización pasiva d) Base inmunitaria de la necrosis periventricular	a) Rotura del quiste con necrosis por hipersensibilidad retarda (90%) b) Defecto inmunitario locali- zado en la retina y multiplicación de taquizoitos (10%) c) Inmunidad adecuada en otras partes del cuerpo	a) Defecto inmunitario por linfoma, quimioterapia anti- tumoral o por trasplante, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y otras causas	Inmunidad establecida, probablemente de tipo preinmunización

2.5 INMUNOLOGÍA.

La inmunología de la toxoplasmosis es compleja, sin embargo es fundamental su estudio para entender la toxoplasmosis clínica, su diagnóstico y su tratamiento ideal.

La infección provoca fácilmente una inmunidad la cual se ha demostrado, depende sobre todo, de factores provenientes de linfocitos T, macrófagos y en menor medida los anticuerpos (5, 34, 36).

La infección por **Toxoplasma gondii** da por resultado una respuesta inmune la cual se le conoce como inmunidad no esterilizante tipo I, donde se observa inducción de una respuesta inmune que provoca una resistencia adquirida a la reinfección, además la persistencia del parásito a nivel controlado llamado premunición (3, 9, 16, 34). Este es el mecanismo por el cual el parásito asegura su supervivencia en la naturaleza, la premunición resulta ser el mejor estado de inmunidad que puede alcanzar la mayor parte de los hospederos (34).

2.5.1 Inmunidad Celular.

Al inicio de la infección, la inmunidad celular se activa con los macrófagos y mientras coincide con la inmunidad humoral ésta se encarga de disminuir la proliferación de parásitos extracelulares (1, 11).

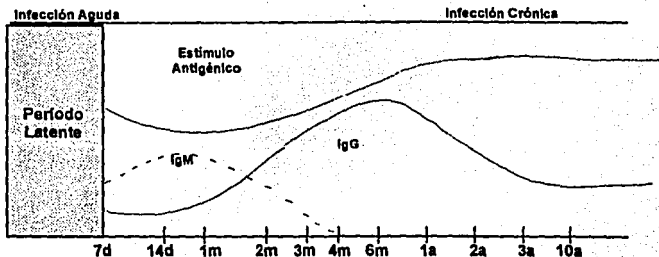
Posterior a la invasión pueden presentarse periodos de latencia. Donde el bradizoito acumula un polisacárido semejante al glucógeno, que hace que el parásito se altere y forme pseudoquiste, en donde **Toxoplasma gondii**, tiende a rodearse de una pared química como un mecanismo de defensa contra la respuesta del hospedero (16, 17, 36).

Se ha encontrado también que los linfocitos T, estimulan a los macrófagos para inhibir o matar los parásitos, por medio del interferón gamma que fue identificado como la linfocina (llamada también factor activador de macrófagos FAM) que estimula a los macrófagos a liberar peróxido y destruir toxoplasmas (33).

2.5.2 Inmunidad Humoral.

Se han descrito varias clases de anticuerpos que participan en la infección IgA, IgG e IgM, sin embargo no pueden actuar contra los microorganismos que se multiplican dentro de gran variedad de células (11, 16, 19).

El sistema inmune de un organismo normal reconoce los diferentes determinantes inmunogénicos y responde con la formación de anticuerpos de diferentes estirpes, los cuales aparecen a diferentes intervalos alcanzando un máximo, permanecen en meseta y finalmente muestran una caída lenta (gráfica 1) (3, 4, 32).



Gráfica 1. Respuesta inmunitaria a la Toxoplasmosis (4).

A partir de la primera semana posterior a la infección se reconoce la presencia de anticuerpos IgM, la variedad de IgG aparece dos o cuatro semanas después de iniciada la infección, la elevación de los títulos es lenta durante 2 o 4 meses y alcanza su máximo entre 3 y 6 meses (3, 4, 32).

La cantidad de anticuerpos en humanos en la variedad IgM e IgG, o en ambas, ha sido cuantificada por diversas pruebas serológicas [3, 4, 5, 16, 24, 36]. Al estudiar la relación entre el título de anticuerpos y las modificaciones que estos pueden causar en la morfología de los toxoplasmas, Werner (24) encontró que cuando los títulos son bajos entre 1:4 y 1:128 el parásito puede aún reproducirse, cuando el título se eleva a 1:4000, el número de parásitos disminuye sensiblemente y la división ploidogénica es incompleta, quedando los parásitos unidos sin poder separarse, cuando el título llega a cifras de 1:16000 o más, se lisa la mayoría de los parásitos y sólo un pequeño grupo se mantiene en el interior de las

células iniciando la formación de pseudoquiste (24).

2.5.3. Relación Hospedero-Parásito.

Existe una relación hospedero-parásito, por una parte, las acciones que ejercen los parásitos para sobrevivir en sus hospederos y por otra, los mecanismos que desarrolla el hospedero para oponerse a la actividad de tales parásitos (11, 17, 34).

Los mecanismo de evasión en **Toxoplasma gondii** son:

I. Aislamiento anatómico. La localización de los parásitos dentro del hospedero desempeña un papel importante en el proceso infeccioso, ya que de ello depende que los parásitos persistan o no (17).

a) Localización intracelular. En donde **Toxoplasma gondii**, dentro de la vacuola evade la actividad hidrolítica de los lisosomas, cuando no hay fusión vacuola-lisosoma debido a que el parásito altera las propiedades de los fagosomas oponiendo barreras de mitocondrias y material fibrilar entre la membrana vacuolar y la membrana lisosómica lo que impide al acceso del contenido del lisosoma a la vacuola (fig. 7) (17).



Figura 7. Macrófago con un parásito fagocitado. T: *Toxoplasma gondii* con su núcleo; V: vacuola parasitófora; m: mitocondrias y mf: material fibrilar (17).

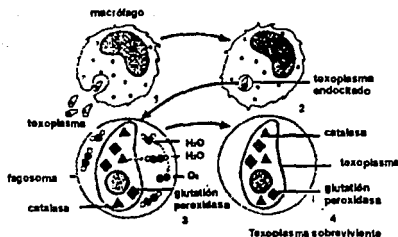


Figura 8. Acción evasiva de *T. gondii* dentro de vacuola parasitófora del macrófago: 1: fagocitosis del parásito por el macrófago. 2: formación de la vacuola parasitófora. 3: dentro del fagosoma la presencia de enzimas demoleedoras del oxígeno degradan al peróxido de hidrógeno formado por el macrófago. 4: parásito sobreviviente. Dibujo: Dr. F. la Jara.

Por otra parte, conteniendo las enzimas catalasa endógena y glutation-peroxidasa **Toxoplasma gondii** evade la acción del peróxido de hidrógeno, lo que señala que el nivel de enzimas demoledoras de metabolitos del oxígeno también tiene un papel importante en la muerte del parásito dentro del fagocito (fig. 8) (17).

II. Modificación antigénica. Es la capacidad que tienen algunos parásitos para eliminar antígenos de su superficie es muy demostrativa de cómo puede evadir la respuesta inmunitaria del hospedero, se cree que los parásitos capaces de desprenderse de sus antígenos de superficie también son aptos de sintetizarlos de nuevo y que tal vez, la formación de casquete refleja un mecanismo de evasión del parásito (17).

Ya que **Toxoplasma gondii** es un parásito intracelular obligado, ha desarrollado tal mecanismo para sobrevivir en el hospedero cuando al liberarse del fagocito queda a merced de los anticuerpos circulantes antes de tener oportunidad de invadir una nueva célula (17).

Concluyendo, el sistema inmunológico contra **Toxoplasma gondii** es capaz de mantener asintomático al individuo infectado, pero no es lo bastante eficiente para lograr la destrucción total del parásito (16).

2.6 EPIDEMIOLOGÍA

La infección por **Toxoplasma gondii** tiene una distribución mundial, es un padecimiento que va de la mano con costumbres higiénico-dietéticas. Así la frecuencia varía de una zona a otra, dependiendo de factores climáticos, socioeconómicos, existiendo mayor prevalencia en regiones conocidas como tropicales húmedas (10, 36, 37).

La infección por **Toxoplasma gondii** se transmite principalmente por las heces fecales del gato, que contaminan alimentos (2, 3, 10, 13, 29, 36).

La transmisión hombre-hombre, se realiza por vía sanguínea, por transfusión de glóbulos blancos con parásitos intracelulares viables y por infección transplacentaria (2, 3, 10, 13, 29, 36, 37).

El número de personas positivas de la infección aumenta en relación directa con la edad, el porcentaje máximo se encuentra en población de 20 años en adelante (4, 11, 36).

La mayoría de los infectados tienen un curso clínico asintomático o no característico lo que dificulta el diagnóstico.

El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica Dr. Manuel Martínez Baez realiza encuestas epidemiológicas a nivel nacional,

indicando que en México está infectado el 32% de la población (36, 37).

2.7 DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS EN EL LABORATORIO.

La toxoplasmosis con una sintomatología tan variada y a veces confusa, sólo con ayuda del laboratorio se puede llegar a un diagnóstico definitivo.

La toxoplasmosis puede diagnosticarse por dos vías fundamentales; método directo y método indirecto.

2.7.1 Método Directo.

La observación directa del parásito en los tejidos u órganos en los cuales es difícil de definir ya que muestra diferentes partes de la estructura del parásito, según sea su posición, se requiere mucho tiempo y cortes seriados para identificarlo, pudiendo dar falsos positivos o negativos. Las tinciones más utilizadas es hematoxilina-eosina y Giemsa (23, 29).

2.7.2 Método Indirecto.

Los métodos indirectos para la detección de **Toxoplasma gondii** es mediante serología por detección de los anticuerpos específicos lo cual indica que ha habido previo o reciente contacto con el parásito pero no necesariamente presentar la enfermedad, tomando como concepto básico

que el aparato inmune reconoce los diferentes determinantes inmunogénicos y responde con la formación de anticuerpos de diferentes estirpes, es así que se tienen varios métodos serológicos que han sido desarrollados para el diagnóstico de toxoplasmosis (4, 5).

El perfil de respuesta de anticuerpos en la variedad IgM, IgG o ambas ha sido cuantificado por diversas pruebas, como la de colorante de Sabin-Feldman (DT), la de fijación de complemento de Warren-Feldman (CF), hemaglutinación indirecta de Jacobs y Lunde (THI), inmunofluorescencia indirecta de Walton (IFI) y la de inmunoensayo enzimático de Voller (ELISA). En la práctica, todos requieren de la preparación de antígenos solubles de **Toxoplasma gondii** (2, 4, 5, 13, 27, 32, 36, 37).

2.8 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

La terapia farmacológica para la toxoplasmosis no es lo suficiente, ya que no se dispone de fármacos parasitocidas e incluso sólo tiene acción sobre las formas parasitarias de multiplicación rápida o taquizoitos (17, 22).

2.8.1 Indicaciones de manejo terapéutico.

En primer término ningún caso asintomático requiere terapia, aunque tenga títulos muy altos de anticuerpos, a no ser que se trate de alguna de las siguientes situaciones: toxoplasmosis asintomática en mujeres

embarazadas, toxoplasmosis transmitida durante la gestación asintomática o toxoplasmosis accidental en personal de laboratorio.

2.8.2 Control terapéutico.

El control terapéutico, simplemente se basa en seguimiento de nivel de anticuerpos contra **Toxoplasma gondii** y la evolución clínica del paciente.

2.8.3 Medicamento de manejo.

Varios han sido las drogas utilizadas en el manejo de la toxoplasmosis. Las sulfas y la pirimetamina fueron las primeras ensayadas, demostrándose efectos sinérgicos (2, 3, 36).

La sulfa-pirimetamina, las sulfas de corta acción y muy especialmente la sulfadiazina, son los fármacos más potentes para el tratamiento de la toxoplasmosis (2, 3, 36).

2.8.4. Profilaxis.

La profilaxis de esta infección es de suma importancia, ya que es la única manera de poder controlar y prevenir la infección de **Toxoplasma gondii**, evitando contacto con el gato, limpiar sus deyecciones, evitando comer legumbres crudas y carne mal cocida (13). En el caso de una

toxoplasmosis congénita conociendo de antemano si existe o no infección previa en la mujer embarazada (36, 37).

3. ANTECEDENTES HISTORICOS EN MEXICO

Toxoplasma gondii fue descubierto en 1908 por Nicolle y Manceaux en un pequeño roedor (*Ctenodactylus gundl*) (19, 22, 34).

En la República Mexicana, Moser encontró en 1929 el parásito en cobayos (2, 19). Se han realizado numerosos estudios sobre esta enfermedad, el primer caso humano publicado se trata de un niño de 11 meses que en 1950 fue presentado por Dena y Col del Hospital infantil de México. Posteriormente Biagi en 1957 (1), realizó exploraciones epidemiológicas empleando la prueba de intradermorreacción (toxoplasmina). En 1953, Varela aisló la primera cepa de **Toxoplasma gondii** en líquido cefalorraquídeo y en el mismo año Roch, empezó a usar la prueba de colorante de Sabin y Feldman en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, ahora Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos para el diagnóstico de toxoplasmosis (14, 25, 31).

En 1960 Silverman y Varela, realizaron estudios para la relacionar esta enfermedad con trastornos mentales en distintos hospitales psiquiátricos, los datos revelaron hasta un 65% de sueros positivos (14, 25).

En 1966 Roch y Varela en una encuesta serológica en población

abierta, encontraron el 30% empleando la reacción del colorante (19, 25).

Caballero en 1968, en cultivo de leucocitos humanos, encontró que **Toxoplasma gondii** es capaz de provocar distintos tipos de aberraciones cromosómicas (30).

Molina y Ontiveros en 1971 realizaron estudios a mujeres embarazadas, obteniendo el 74% de sueros positivos empleando la técnica de inmunofluorescencia (30).

En 1992 el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos realizó una encuesta seroepidemiológica demostrando que la infección en México, es mucho más común por debajo del trópico de Cáncer, particularmente en las áreas costeras de Nayarit, Colima, Veracruz, Tabasco y Campeche (37).

Actualmente en este Instituto tienen una vigilancia epidemiológica permanente y sirve de referencia para otras instituciones (36).

4. INMUNODIAGNOSTICO

4.1 INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Ciertos compuestos al ser excitados por una luz de longitud de onda corta son capaces de absorber energía luminosa y emitir a su vez luz de onda mayor. Algunos colorantes que tienen esta capacidad de radiación de excitación se localizan en el campo ultravioleta y la luz emitida en el espectro visible, estos son los colorantes fluorescentes, ya que cuando se les somete a luz ultravioleta suave producen luz brillante de tipo fluorescente (9). Las proteínas incluyendo los anticuerpos séricos pueden ser conjugados con colorantes fluorescentes sin afectar sus propiedades biológicas e inmunológicas.

La técnica de IFI ha sido usada como técnica de diagnóstico de varias enfermedades, en la toxoplasmosis, el antígeno (el parásito) fija en su superficie los anticuerpos contenidos en el suero humano por examinar, a continuación son sometidos a la acción de antiglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína que es una forma de fluoresceína que con facilidad se fija a los anticuerpos unidos a la superficie de los toxoplasmas, éstos al ser iluminados con luz ultravioleta emiten la luz de longitud de onda más larga adquiriendo fluorescencia verde brillante, característica a 517nm (fig. 9) (9).

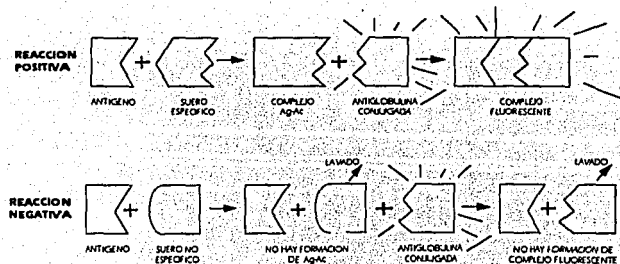


Figura 9. Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta

Actualmente es la prueba de mayor utilidad a nivel general, no requiere organismos vivos, esta técnica es sensible, específica y reproducible a más de 90% (24, 28).

Los títulos para considerar valor positivo son mayores e iguales a 1:16, y varias determinaciones a intervalos de tiempo de 2 a 4 meses pudiendo pronosticar datos suficientes para sostener o rechazar el diagnóstico de la infección (15).

4.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

La técnica de ensayo de Inmunosorbencia ligado a una enzima, actualmente es ampliamente utilizada para detectar y medir antígenos o anticuerpos, se basa en la propiedad que se desarrolla cuando se presenta

la interacción antígeno anticuerpo-enzima-sustrato la cual da como resultado la producción de coloración que es cuantificable por un aparato especial (espectrofotómetro) u observar a simple vista (15, 32).

Con respecto a lo metodológico de la prueba se requiere:

1. Fase sólida: Es la base donde se retiene el antígeno o anticuerpo, en la cual la reactividad de los componentes inmunológicos no son afectados. Hay una gran variedad de materiales que se han usado como son celulosa, poliacrilamina, varios tipos de plásticos y tubos de poliestireno (15, 27).
2. El conjugado: En este ensayo incluye un gran número de enzimas que se han investigado por su utilidad, estabilidad, alta reactividad y disponibilidad, teniendo en cuenta que el sustrato requerido para la reacción cubra las mismas cualidades, algunas enzimas con estos requisitos y más comúnmente usados son peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, Betagalactooxidasa.
3. Agentes ligantes: Las enzimas pueden ser unidas a anticuerpos o antígenos por medio de un agente ligante, uno de los más usados es el glutaraldehído (27).
4. Sustrato: Los sustratos de la enzima es importante que sean estables, altamente reactivos y que se tengan disponibles.

5. Microplaca: El uso de microplaca es conveniente para la realización de un gran número de muestras, además que se requieren pequeños volúmenes de reactivos y muestras. Las microplacas son de fondo en forma de "U" o fondo plano, como las que se utilizan en Dot-ELISA.

La prueba de ELISA tiene 3 variantes:

4.2.1 ELISA - competitiva

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

4.2.2 ELISA - indirecta

Se usa en la detección de anticuerpos. El antígeno específico es absorbido a la fase sólida, se adiciona el suero a probar, se incuba y se lava, se agrega una enzima ligada a antiglobulina y se deja reaccionar, enseguida se adiciona el sustrato y se hace observación del color producido. La

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

4.2.3 ELISA - doble cuerpo o sandwich

Se detectan antígenos. El anticuerpo específico es absorbido a la fase sólida, se incuba, se lava, y posteriormente se adiciona la solución a probar que se piensa contiene el antígeno, se incuba y se lava, bajo estas condiciones, se adiciona un complejo enzima-anticuerpo (anti-antígeno), se incuba, se lava y se agrega el sustrato de la enzima, el cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno.

Dot-ELISA:

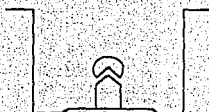
La técnica de Dot-ELISA es una modificación de la variante indirecta de ELISA, este método se puede usar en la detección y cuantificación de anticuerpos. Donde el antígeno específico es absorbido a la fase sólida que son discos de filtro de nitrocelulosa introducidos en una microplaca, así se adiciona el suero problema e incuba, se lava y se añade el conjugado, (anti-Inmunoglobulina conjugada con la enzima), de tal manera que reaccione contra el anticuerpo del complejo antígeno anticuerpo primario, se lava y adiciona el sustrato, terminando el proceso, si la prueba es positiva se observa un botón de color en el papel, que es el resultado de la degradación del sustrato (27).

La técnica de Dot-ELISA, corre de igual manera que la variante indirecta de ELISA, y sus ventajas incluyen la simplicidad, estabilidad de los reactivos, equipo relativamente no costoso y se pueden procesar un gran número de muestras (fig. 10).

1. Antígeno absorbido en disco de nitrocelulosa.



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



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



4. Adición del sustrato y cambio de color en la zona de reacción al ser positiva.

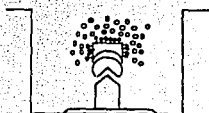


Figura 10. Reacción en técnica Dot-ELISA

5. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Integrar los adelantos de la Parasitología e Inmunología para crear procedimientos de diagnóstico de toxoplasmosis que sean de utilidad en la medicina clínica.
2. Identificar la técnica de Dot-ELISA como una posible alternativa para el diagnóstico de toxoplasmosis en el laboratorio.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la validez de la técnica de Dot-ELISA por medio de su sensibilidad, especificidad, valor de predicción y reproducibilidad en sus resultados obtenidos.
2. Determinar cuál de las dos técnicas es adaptable en el laboratorio clínico, con el fin de que entre a las pruebas de rutina y en encuestas seroepidemiológicas.
3. Conocer la seroprevalencia de personas que presentan anticuerpos contra **Toxoplasma gondii** en población abierta en la península de Yucatán.

6. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Las infecciones en el hombre por **Toxoplasma gondii** se han observado en todas partes del mundo, pueden ser asintomáticas o sintomáticas. Se han tratado ambos casos a partir de encuestas seroepidemiológicas a nivel nacional, obteniendo así el índice de frecuencias de este parásito en una población y a la vez poder ofrecer atención médica adecuada a las personas infectadas.

Para detectar estos casos se han utilizado diversos métodos de laboratorio, cada uno con sus ventajas y desventajas.

Así, con el fin de establecer un método de diagnóstico, sensible, específico, reproducible y costeable para procesar gran número de muestras, como es lo que ocurre en una encuesta seroepidemiológica, se tratará de adaptar la técnica de Dot-ELISA para este fin y se comparará con la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) que ha sido la más utilizada para el diagnóstico de toxoplasmosis.

Se analizará y establecerá la importancia de cada técnica para dicho fin.

7. HIPOTESIS EXPERIMENTAL

En la detección de anticuerpos contra **Toxoplasma gondii**, la prueba por la técnica de Dot-ELISA pudiera ser tan específica y sensible como lo es la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

8. MATERIAL Y METODOS

8.1 SUERO PROBLEMA

Se obtuvieron muestras de sangre venosa de 539 personas aparentemente sanas, fueron obtenidas de una población abierta en la península de Yucatán (Campeche, Yucatán y Quintana Roo) para una encuesta seroepidemiológica a nivel nacional sólo se reporta edad y sexo. Se separó el suero del paquete celular y se congela a -20°C hasta su uso.

El trabajo de campo fue realizado por el personal del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Baez de la Secretaría de Salud.

8.2 SUERO CONTROL

- Suero control positivo. Suero de sangre de paciente tipificado positivo IgG a 1:1024 por el mismo Instituto.
- Suero control negativo. Suero de sangre de paciente tipificado negativo.

8.3 ANTÍGENO

Para ambas técnicas IFI y Dot-ELISA se prepara el mismo antígeno. Este antígeno son taquizoitos de **Toxoplasma gondii** de la cepa CK.

manteniendo su línea en líquido peritoneal de ratón.

1. Después de 3 días de producir la línea de parásitos en el ratón, se sacrifica, con los dedos pulgares se le oprime el abdomen para remover los parásitos adheridos a la pared de la cavidad abdominal; extraer con una jeringa el líquido peritoneal.
2. Se lavan los parásitos con PBS a pH de 7.2 a 1500 rpm por 10 min., 3 veces, con el fin de eliminar los restos de células que se encuentran junto con los parásitos, son pasados por un filtro a presión con una jeringa.
3. Se inactivan en 50 ml. de formalina al 1.5% PBS, pH 7.2 durante una hora a 22°C.
4. Se vuelven a lavar los parásitos con 50 ml. de PBS a pH de 7.2 por 3 veces consecutivas.
5. En el último lavado se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 ml. de PBS a pH de 7.2
6. Se diluyen los parásitos hasta tener una concentración de 5.0×10^4 taquizoitos por ul., esta concentración la podemos checar realizando la cuenta de taquizoitos por mm^3 con una cámara de Neubauer correspondiendo a 5.0×10^5 taquizoitos por mm^3 .
7. Una vez listo dicho antígeno, se puede utilizar para preparar las laminillas de la técnica de IFI, sensibilizar los discos de nitrocelulosa para la técnica de Dot-ELISA o también se puede conservar el antígeno en pequeñas

alícuotas a -20°C hasta su uso, (sólo se pueden utilizar una vez después de descongelar, verificando la cuenta de taquizoitos por mm^3 antes de su uso).

8.4 PREPARACIÓN DE LAMINILLAS CON ANTÍGENO PARA IFI

Las laminillas son portaobjetos donde en cada una se grabaron 12 pocillos o círculos de aproximadamente 3 mm de diámetro en donde fue depositado 5 ul de antígeno preparado, se dejan secar a temperatura ambiente, quedando fijados los taquizoitos en la laminilla y finalmente almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso (15).

Se comprueba que en las laminillas al microscopio existen de 30 a 40 parásitos por campo, que no estén destruidos, ni contaminados.

8.5 SENSIBILIZACIÓN DE LOS DISCOS CON EL ANTÍGENO PARA Dot-ELISA

1. Se preparan discos de nitrocelulosa de 5 mm de diámetro de 0.22 micrómetros de poro, éstos se manejarán con pinzas para evitar una posible contaminación, se sensibilizarán los discos con 5 ul. de antígeno a cada disco.
2. Se incuban durante 10 min. a 37°C .
3. Se dejan los discos a temperatura ambiente durante 10 o 15 min. y

finalmente se congelan los discos sensibilizados hasta el momento de su uso (15).

8.6 PREPARACIÓN DE CONJUGADO PARA IFI

Reconstituir el conjugado de antigamaglobulina IgG humana marcada con isotiocianato de Fluoresceína producida por Sigma Immuno Chemicals, después se diluye a 1:500 con solución de azul de evans al 0.5% en PBS pH - 7.6 Esta es la dilución de trabajo y debe ser guardada en congelación.

8.7 PREPARACIÓN DE CONJUGADO PARA Dot-ELISA

El conjugado es un antigamaglobulina IgG humana peroxidada fabricada por Sigma Immuno Chemicals, se prepara a una dilución de 1:300 con la solución de leche Sveltes al 5% PBS pH 7.6 La dilución ideal fue determinada al realizar la prueba a un control positivo a título conocido contra varias del conjugado (1:100, 1:200, 1:300, 1:400), determinando la ideal como la que se ve mejor el botón color violeta en el papel de nitrocelulosa.

Para disminuir la variabilidad de la prueba debido al envejecimiento durante la refrigeración, el conjugado reconstituido fresco se divide en alícuotas de 100 ml y se congela -20°C hasta su uso

8.8 PREPARACIÓN DE SUSTRATO

Disolver 3 mg. de 4-cloro-1,naftol en 2 ml. de metanol, del cual se toman 700 ul y se añaden a 10 ml. de PBS, por último se añaden 5 ul. de H_2O_2 y se deja incubar por 30 a 40 minutos. Lo anterior se prepara inmediatamente antes de su uso.

8.9 SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH - 7.2

A. $Na_2HPO_4 - H_2O$...14gr

Agua destilada 1000 ml

B. Na_2HPO_4 13.8gr

Agua destilada 1000 ml

Mezclar 28.5 ml de A y 71.5 ml de B, áforar a 1000 ml con solución salina al 0.85% y ajustar a pH - 7.2

8.10 DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE IFI PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA *Toxoplasma gondii*

8.10.1 Material y equipo

- Portaobjetos con antígeno de *Toxoplasma gondii*
- Antigamaglobulina IgG humana conjugada con isotiocianato de

fluoresceína.

- Solución salina tamponada con fosfatos pH 7.2
- Suero control positivo a **Toxoplasma gondii** a dilución 1:1024
- Suero control negativo a **Toxoplasma gondii**
- Control negativo de solución salina PBS pH 7.2
- Solución tamponada de glicerina (9 valores de glicerol mas 1 vol de buffer fosfatos.
- Microscopio de inmunofluorescencia.

8.10.2 Desarrollo de la técnica IFI

1. Preparar una dilución del suero problema 1:16 y 1:32 con PBS por duplicado.
2. Para el suero control positivo se preparan diluciones una por arriba y una por abajo del título conocido, es decir diluciones 1:512, 1:1024 y 1:2048.
3. El suero control negativo con tres diluciones 1:16, 1:32 y 1:64 y por último un control negativo de solución salina PBS pH 7.2
4. Colocar sobre las áreas que contienen el antígeno 5 ul de los sueros

problemas y controles e incubarlos en cámara húmeda durante 30 min. a temperatura ambiente, identificar los sueros por medio de un esquema.

5. Lavar las láminas con PBS pH 7.2 en un recipiente durante 10 min. Se sacan éstas y se lavan nuevamente con una solución limpia durante 5 min., se sacan y se dejan escurrir sobre papel filtro y posteriormente se deja secar.
6. Cubrir los círculos con conjugado antigamaglobulina humana - isotiocianato de fluoresceína.
7. Lavar con PBS pH 7.2 y secar a temperaturas ambiente.
8. A cada 4 círculos 1 gota de glicerol tamponado (9 volúmenes de glicerol + 1 volumen de buffer fosfatos pH 8.0) y colocar un cubreobjetos a estos 4 círculos.
9. Dejar reposar las muestras durante 15 min a temperatura ambiente, y observar las muestras al microscopio de inmunofluorescencia con el lente de inmersión 40x. (15).
10. Interpretación de resultados:
 - a) Negativo. La reacción se considera negativa cuando los organismos

fluorescen rojo púrpura, sin ninguna fluorescencia verde amarillenta en la periferia, también se considera negativa cuando el polo anterior del organismo fluoresce verde amarillento sin extenderse esta fluorescencia a la periferia y sin llegar al polo posterior (coloración polar) (fig. 11).

b) Positivo. La reacción es positiva cuando la fluorescencia verde amarillenta se extiende por toda la periferia del organismo (fig. 11).

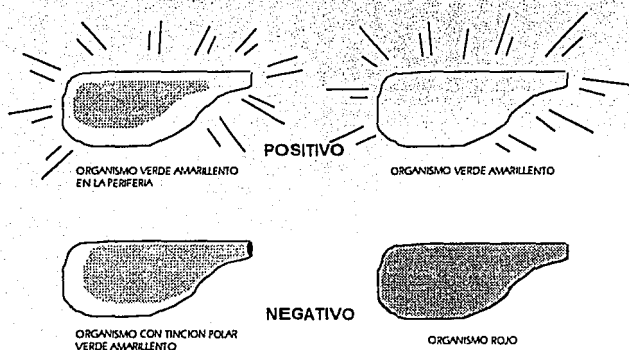


Figura 11. Interpretación de la observación al microscopio de *Toxoplasma gondii* en la reacción de inmunofluorescencia indirecta.

La intensidad de la fluorescencia está en relación directa con la concentración de anticuerpos.

8.11 DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE Dot-ELISA PARA DETERMINAR ANTICUERPOS IgG CONTRA *Toxoplasma gondii*

8.11.1 Material y equipo

- Discos de nitrocelulosa, sensibilizados con antígeno de ***Toxoplasma gondii***
- Solución bloqueadora, de leche sveltos 5% P/V
- Conjugado. Suero antiglobulina IgG humana peroxidado
- Solución salina PBS pH 7.2
- Suero control positivo a ***Toxoplasma gondii*** a título 1:1024
- Suero control negativo a ***Toxoplasma gondii***
- Sustrato - 4-cloro-1 naftol
- Twen 20 0.05%
- Microplacas fondo plano

8.11.2 Desarrollo de la técnica de Dot-ELISA

La técnica se lleva a cabo a temperatura ambiente de 22 - 24°C, todas las soluciones se trabajan a un pH de 7.2

Esta técnica se dividió en 2 fases, la primera en determinar los sueros positivos a una dilución 1:16 y la segunda, que los sueros positivos a 1:16 se les continúa realizando la técnica 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024. Sin omitir en ambas fases los controles.

Para el suero control se preparan diluciones una por arriba y una por abajo de título conocido es decir diluciones 1:512, 1:1024 y 1:2048.

El suero control negativo con tres diluciones 1:16, 1:32 y 1:64

1. Se descongelan los discos sensibilizados con el antígeno de **Toxoplasma gondii** hasta alcanzar la temperatura ambiente y se colocarán en cada uno de los pozos de fondo plano de la microplaca e identificar la muestra que tendrá cada pozo con la ayuda de un esquema (fig. 12).
2. Se añadirán 75 μ l de una solución bloqueadora de leche svelte 5% (P/V) en cada uno de los pozos con el fin de reducir el fondo inespecífico o absorción de partículas inespecíficas; agitar la placa a una velocidad media durante 1 min., dejar incubar durante 15 min., a temperatura ambiente.
3. Se aspira la solución bloqueadora de leche svelte al 5% en PBS, después se agregan 50 μ l de una solución lavadora PBS-Twen 20 al 1% en cada pozo, aspirar y repetir el lavado.

4. Agregar 50 ul. de cada dilución preparada de suero a analizar, incluyendo controles en su pozo correspondiente de acuerdo al diagrama de la microplaca, esta placa se agita moderadamente y se incuba durante 30 a 40 min.
5. Posteriormente se lavan los pozos 3 veces con 100 ul. de PBS-Twen 20 al 0.05%, en el tercer lavado se incuban las microplacas por 10 min. antes de aspirar la solución de lavado.
6. Se adiciona 50 ul. de conjugado diluido 1:300 en una solución de leche sveltas al 5% en PBS, agitando la placa e incubando de 30 a 40 min., finalmente se aspira el conjugado. Se repite el lavado por tres veces.
7. Se añade por último 150 ul. de sustrato preparado, se dejará incubando por 30 a 40 min.
8. Nuevamente se aspira el sustrato y se lavan los pozos como se indicó anteriormente, se deja secar durante 24 horas, para su lectura posterior (27).
9. Interpretación de resultados:
 - a) Negativo. La prueba se considera negativa cuando en el disco de papel filtro no se observa ninguna marca o mancha (fig. 12).

b) Positivo. La prueba se considera positiva cuando en el disco se observa un círculo de color púrpura (fig. 12):

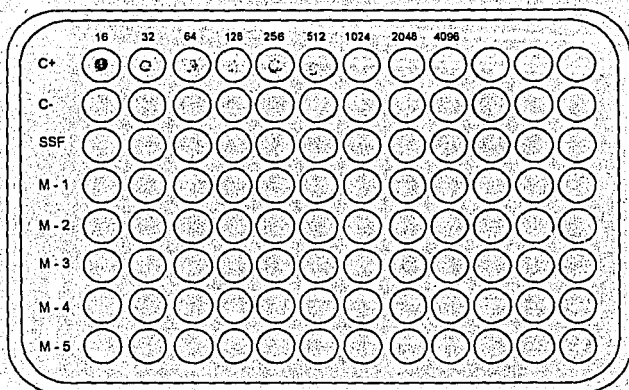


Figura 12. Microplaca de fondo plano para prueba de Dot-ELISA con resultados positivos y negativos (C+ control positivo; C- control negativo; SSF solución salina fisiológica; M muestras).

9. RESULTADOS

9.1 FRECUENCIA DE ANTICUERPOS EN SUEROS PROBLEMA

En el cuadro No. 3 se observa la distribución de 539 sueros trabajados en función de las técnicas IFI y Dot-ELISA a diluciones de 1:16 y 1:128

En el caso de la técnica de IFI se tiene 287 sueros positivos de acuerdo a la dilución que se tomó como punto de corte de 1:16 lo cual corresponde a un 53.2%, por abajo de éste fueron considerados como negativos, o sea 252 sueros correspondientes a un 46.8%, en el segundo punto de dilución es de 1:128, obteniendo como resultado 200 sueros positivos correspondiente a 37.1% y 339 sueros negativos correspondiente a 62.9%

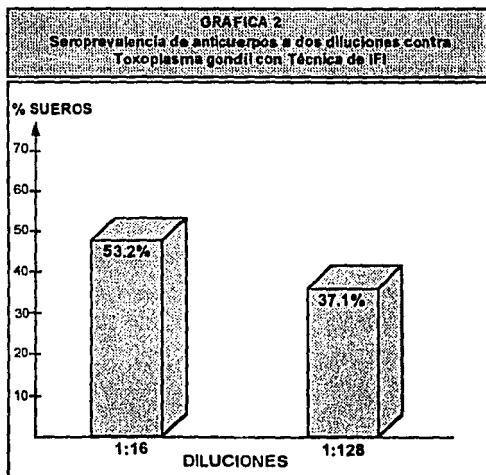
En la técnica de Dot-ELISA se observó que existen 307 sueros positivos a la dilución de 1:16, correspondiente a un 56.9% y 232 sueros fueron negativos correspondientes a un 43.1% en el punto de dilución de 1:128, se obtienen 205 sueros positivos correspondiente a 38% y 334 sueros negativos correspondiente a 61.9%

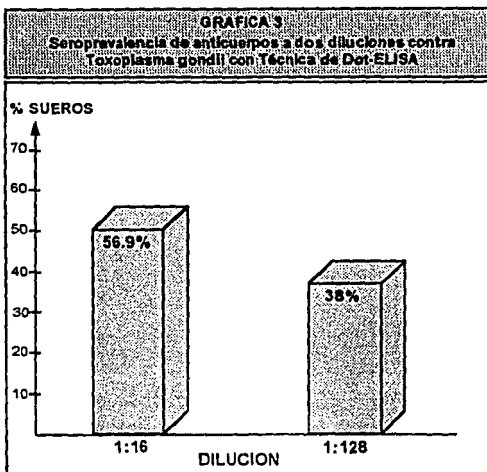
CUADRO No. 3

FRECUENCIA DE ANTICUERPOS ANTITOXOPLASMA EN 539 MUESTRAS DE SUERO HUMANO UTILIZANDO DOS TÉCNICAS

Dilución	IFI		Dot - ELISA	
	1:16	1:128	1:16	1:128
Positivo	287 (53.2%)	200 (37.1%)	307 (56.9%)	205 (38.0%)
Negativo	252 (46.8%)	339 (62.9%)	232 (43.1%)	334 (61.9%)

A continuación se da por medio de gráficas de barras los porcentajes de resultados positivos y negativo obtenidos por las técnicas de IFI y Dot-ELISA a dilución 1:16 y 1:128 (Gráficas No. 2 y 3).





9.2 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR DE PREDICCIÓN, COMPARACION DE PROPORCIONES EN GRUPOS APAREADOS (χ^2) Y REPRODUCIBILIDAD

9.2.1 Sensibilidad y especificidad de Dot-ELISA

Se consideró como prueba de referencia la técnica de IFI, la cual se ha aceptado a nivel internacional para comparar en forma práctica cualquier técnica que pretenda cuantificar los anticuerpos contra **Toxoplasma gondii**, teniendo un valor teórico de sensibilidad del 98% y especificidad de 98%, lo cual se puede considerar casi del 100% comparado con el aislamiento y cultivo del patógeno (4).

Se determina la correlación de ambas técnicas, donde los sueros positivos a Dot-ELISA que son 307 sólo **264** fueron también positivos para la técnica de IFI, dando una diferencia de **43** sueros reportados de más para Dot-ELISA, por otro lado son **23** sueros reportados por Dot-ELISA como negativos, pero en realidad son positivos para IFI y por último de los **252** sueros negativos para IFI, de los cuales 43 no son negativos encontramos que 209 sueros son realmente negativos (Cuadro 4).

CUADRO No. 4

TABLA DE CORRELACION

IFI	Dot-ELISA	CORRELACION	
+	+	=	264
+	-	=	23
-	+	=	43
-	-	=	209

La sensibilidad es expresada en la proporción de los correctamente clasificados como positivos.

La especificidad es expresada en la proporción de los correctamente clasificados como negativos (cuadro 5 y 6).

CUADRO No. 5

TABLA DE CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

PRUEBA		ENFERMEDAD		TOTAL
		PRESENTE	AUSENTE	
		Positiva	a	b
Negativa	c	d	c + d	
Total		a + c	b + d	a + b + c + d

a = verdaderos positivos

d = verdaderos negativos

b = falsos positivos

a + c = total de personas enfermas

c = falsos negativos

b + d = total de personas no enfermas

CUADRO No. 6

TABLA DE CORRELACION PARA Dot-ELISA

PRUEBA de Dot-ELISA		PRUEBA IFI		TOTAL
		Positivo	Negativo	
		Positivo	264	43
Negativo	23	209	232	
Total		287	252	539

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+c} \times 100 = \frac{264}{264+23} \times 100 = \frac{264}{287} \times 100 = 92\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b+d} \times 100 = \frac{209}{43+209} \times 100 = \frac{209}{252} \times 100 = 83\%$$

9.2.2 Valor de predicción de Dot-ELISA

Valor de predicción positivo

El valor de predicción positivo de los resultados de la técnica de Dot-ELISA es definido como el porcentaje de probabilidad de tener la enfermedad entre el grupo de personas clasificadas como positivos.

$$\begin{aligned}VP_{\text{positivo}} &= \frac{a}{a+b} \times 100 \\VP_{\text{positivo}} &= \frac{264}{307} \times 100 = 85.9\%\end{aligned}$$

Valor de predicción negativo

El valor de predicción negativo de los resultados de la técnica de Dot-ELISA es definido como el porcentaje de probabilidad de no tener la enfermedad entre el grupo de personas clasificadas como negativos.

$$\begin{aligned}VP_{\text{negativo}} &= \frac{d}{c+d} \times 100 \\VP_{\text{negativo}} &= \frac{209}{232} \times 100 = 90.0\%\end{aligned}$$

9.2.3 Comparación de proporciones en grupos apareados (χ^2)

En esta situación experimental la prueba McNemar para proporciones apareadas que nos analiza el número de discordancias se

considera la apropiada. Esta prueba sigue una distribución chi cuadrada (χ^2) con un grado de libertad su fórmula es:

$$\chi^2_{(1)} = \frac{[(b-c)-1]^2}{b+c}$$

La prueba de McNemor no considera donde los resultados concuerdan, el análisis se basa sólo en el número de discordancia.

Donde $\alpha = 0.05$

El valor crítico que divide la distribución chi cuadrada con 1 grado de libertad en 95% inferior y 5% superior es 3.841

De acuerdo a los resultados tenemos

$$\chi^2_{(1)} = \frac{[(43-23)-1]^2}{43+23} = \frac{361}{66} = 5.46$$

9.2.4 Reproducibilidad en técnicas de IFI y Dot-ELISA

Se evaluó la reproducibilidad con los resultados obtenidos con el control positivo que tiene un título de 1:1024. Cada vez que se realiza la prueba a un lote de muestra, se realiza por duplicado el control positivo, en total se obtuvieron 20 datos de control positivo.

En el caso de la técnica de IFI se obtuvo el 100% de reproducibilidad y para Dot-EUSA el 95% (cuadro No. 7).

CUADRO No. 7

REPRODUCTIVIDAD DE TÉCNICAS DE IFI Y Dot-ELISA

TITULO	IFI	Dot-ELISA
1:512	0	1
1:1024	20	19

9.3 DISTRIBUCIÓN DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS

Antitoxoplasma gondii POR TÉCNICA DE Dot-ELISA

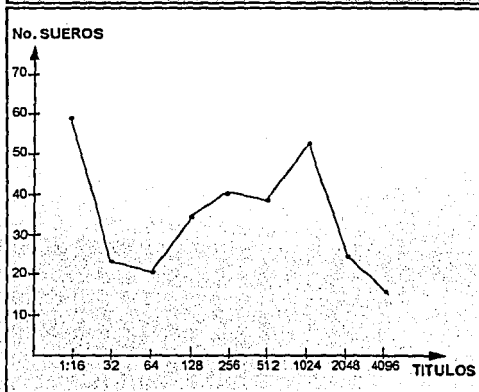
En esta distribución se dan los resultados obtenidos de sueros positivos a diferentes títulos de anticuerpos contra **Toxoplasma gondii** a partir de la dilución de suero considerada como significativa de 1:16, 1:32, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 y 1:4096, contra el porcentaje de sueros positivos de cada título trabajado.

A continuación se da un cuadro de la distribución de dichos anticuerpos (cuadro No. 8) y la representación gráfica de los resultados (gráfica No. 4)

CUADRO No. 8
**DISTRIBUCION DE ANTICUERPOS ANTITOXOPLASMA POR
 TECNICAS DE Dot-ELISA**

TITULOS	No. SUEROS	%
1:16	59	19.3
1:32	23	7.9
1:64	20	6.6
1:128	34	11.0
1:256	40	13.0
1:512	39	12.7
1:1024	52	16.9
1:2048	24	7.9
1:4096	16	5.2

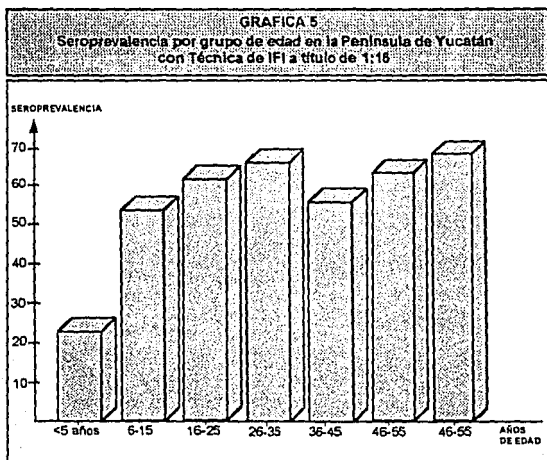
GRAFICA 4
 Distribución de anticuerpos antitoxoplasma por
 Técnica de Dot-ELISA



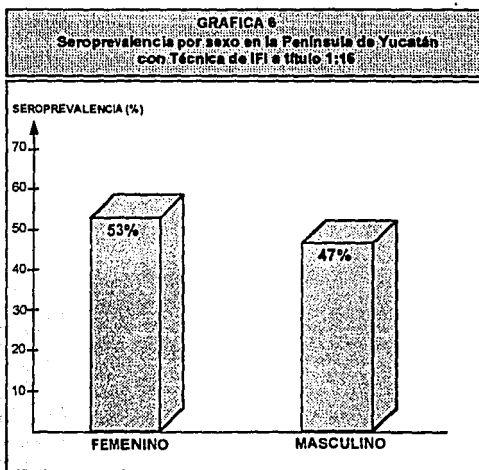
9.4 SEROPREVALENCIA POR GRUPO DE EDAD Y SEXO EN POBLACIÓN ABIERTA EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Para determinar la seroprevalencia por grupo de edad, primero se establecen los rangos de éstas, y se distribuyen a todas las personas participantes en la encuesta de acuerdo a su edad y después se identifica el porcentaje de sueros positivos de cada grupo de edades.

A títulos de 1:16 por técnica de IFI el grupo de menores de 5 años tuvo positivos el 24.3%, el de 6 - 15 años de 53.7%, 16 - 25 años el 61.8%, 26 a 35 años el 65%, 36 - 45 años el 55.3%, 46 - 55 años el 61.3% y mayores de 56 años el 68.8% (gráfica 5)



En esta encuesta seroepidemiológica, se observa que en la península de Yucatán la seroprevalencia por grupo de sexo el porcentaje de positivos femenino es de 53% y masculino es 47% (gráfica 6).



10. DISCUSION

Con respecto al desarrollo de la prueba, tanto en la técnica de IFI como la técnica de Dot-ELISA, son pruebas en que sus resultados dependen de la experiencia y criterio del analista, ya que en ambas sus resultados están dados por apreciación visual para detectar los anticuerpos de **Toxoplasma gondii**. En este caso la interpretación fue, o se trató de realizar con la misma apreciación en todos los casos. En ambas técnicas se requiere casi el mismo tiempo de trabajo y se pueden manejar gran número de muestras.

La técnica de Dot-ELISA tiene ventajas sobre IFI como lo es, equipo no sofisticado y de manejo especial, reactivo de fácil acceso, su lectura no tiene puntos intermedios (es o no positiva). Por lo que Dot-ELISA es una técnica excelente para trabajar en cualquier tipo de laboratorio de rutina incluyendo los de campo por no requerir ningún tipo de aparato especial. En el desarrollo de la técnica, la desventaja que presenta Dot-ELISA es que su lectura se debe realizar 24 horas después, cuando el papel esté seco.

Para el caso de IFI, existen todas las ventajas, en laboratorios especializados, el único problema es carecer de microscopio de fluorescencia, ya que no en todos los laboratorios de rutina existe un microscopio de este tipo. Esta técnica nos puede informar de los resultados hasta 3 horas después de obtener la muestra.

Algo de suma importancia es que el analista para leer los resultados de esta técnica debe tener el punto óptimo de corte de lectura, dedicar el tiempo adecuado e igual a cada una de las muestras.

Con respecto a los resultados se observa una semejanza en el número de sueros positivos a títulos 1:16 y 1:128 de ambas técnicas. En donde la técnica de Dot-ELISA a título 1:16 tiene 20 sueros de más y a título 1:128 5 sueros positivos de más que la técnica de IFI. Esta diferencia es muy poco tomando en cuenta el número total de muestras manejadas (539 sueros), sin embargo esto no es lo real, ya que no todos los sueros positivos de Dot-ELISA son los mismos para IFI. Por lo que se realiza un análisis estadístico de la distribución de sueros positivos y negativos.

La técnica de IFI con 287 sueros positivos y 252 sueros negativos nos sirve como referencia para poder valorar la técnica de Dot-ELISA. Así tenemos que Dot-ELISA nos marca 264 sueros como verdaderos positivos que son también positivos para IFI, 23 sueros como falsos negativos, que pertenecen al grupo de positivos de IFI, 43 sueros como falsos positivos, que son la diferencia de los 307 sueros positivos menos los realmente positivos (264 sueros) y por último 209 sueros verdaderos negativos que son los 232 sueros negativos menos los 23 sueros falsos negativos. Con lo anterior se pudo detectar que la sensibilidad de Dot-ELISA es de **92%** y su especificidad de **83%**.

Así también se determinó para la técnica de Dot-ELISA el porcentaje

de probabilidad de ser realmente positivo con un 86% y la probabilidad de ser realmente negativo con 90%. Concluyendo que tiene un margen de valor de predicción alto.

El valor obtenido χ^2 de 5.46 es mayor que el valor crítico 3.841 por lo cual se tiene una diferencia significativa a α 0.05

Con todo lo anterior podemos determinar que la prueba de Dot-ELISA puede ser una alternativa para detectar anticuerpos contra **Toxoplasma gondii**.

Continuando con el estudio también se realizó para la técnica de Dot-ELISA la prueba a diferentes diluciones 1:16, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, con los resultados de sueros positivos a estas diluciones, se graficó títulos de dilución contra número de sueros positivos (gráfica No. 7), de manera clara se observan dos puntos altos uno a 1:16 con 59 sueros positivos y otro 1:1024 con 52 sueros positivos, títulos donde se encuentra el mayor número de población infectada, las cuales están cursando por 2 diferentes estadios de la infección.

Se puede decir que a la dilución de 1:16 con 59 sueros positivos, estos individuos pueden estar infectados por el parásito de forma pasiva en donde existe un equilibrio entre parásito-hospedero o están en un estado de premunición o la posibilidad que se esté iniciando una primoinfección. Continuando con el segundo pico de la gráfica el título de dilución de

1:1024 con 52 sueros positivos, parece indicar que el parásito está en una fase activa de reproducción, mientras que el hospedero crea una alta concentración de anticuerpos producida por una fase aguda en la infección.

Por último para establecer la referencia epidemiológica en la península de Yucatán, se encontró que de acuerdo con la encuesta seroepidemiológica la infección de **Toxoplasma gondii** afecta tanto a hombres como mujeres, sin tener predilección por el sexo, esto lo podemos observar en la gráfica No. 6 donde no hay gran diferencia entre ambos sexos.

Con respecto a la edad de mayor índice de infección afecta a las personas jóvenes y adultos de 16 años en adelante (gráfica No. 5). De tal manera **Toxoplasma gondii** afecta etapas reproductivas lo que es muy importante por causar abortos y problemas teratológicos al nacimiento. También afecta la etapa productiva del individuo, por lo tanto, de alguna manera si pudiera afectar en cierta medida a la economía del país.

11. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados y discusión se infiere lo siguiente:

1. La técnica de IFI sigue siendo la prueba ideal para detectar anticuerpos contra **Toxoplasma gondii**, ya que la técnica de Dot-ELISA a estudiar no alcanza a tener una sensibilidad y especificidad del 100% comparada con IFI, su valor de predicción aunque es aceptable, no nos indica el 100% de confianza en los resultados.

Se determinó una diferencia significativa al $\alpha = 0.05$ por medio χ^2 en los resultados de ambas técnicas, sin embargo esto no decide que la técnica de Dot-ELISA no sea una alternativa a la técnica de IFI, ya que hay que tomar otros aspectos como se menciona en la conclusión 2.

Así, se determinó que la técnica de Dot-ELISA es una alternativa para detectar anticuerpos contra **Toxoplasma gondii**.

2. Siguiendo una adecuada metodología, se puede utilizar cualquiera de las dos técnicas estudiadas IFI o Dot-ELISA para el diagnóstico de toxoplasmosis en humanos de acuerdo a nuestros recursos materiales, como es el caso de tener un microscopio de fluorescencia que constituye un equipo caro en la prueba de IFI, o en un momento dado para el uso que deseé tener, por ejemplo la técnica de Dot-ELISA se considera buena

alternativa para encuestas seroepidemiológicas, y la técnica de IFI tanto para encuestas seroepidemiológicas como también y de manera más específica, puede constituir una excelente prueba confirmatoria y de seguimiento en mujeres infectadas durante la gestación, pacientes con inmunosupresores y pacientes con SIDA que estén infectados con **Toxoplasma gondii**.

3. La seroprevalencia de anticuerpos contra **Toxoplasma gondii** por técnica de IFI a título 1:16 en la península de Yucatán es del 53.2% siendo un valor alto, dentro del rango de incidencia presente en la república mexicana de 14% al 67% (36). Por lo que es recomendable la realización de estudios seroepidemiológicos en el país y principalmente en zonas marginadas para determinar la prevalencia de toxoplasmosis, lo cual va directamente relacionado con el nivel socio-económico del país.
4. Toxoplasmosis constituye un problema de salud pública en el país, principalmente por afectar a la edad productiva y reproductiva del individuo.
5. La prueba para determinar toxoplasmosis (sea IFI o Dot-ELISA) debería ser incluida en las pruebas de rutina en el laboratorio de acuerdo con los resultados de prevalencia que han sido realizados e indican la importancia de la toxoplasmosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Bagl F.** 1934. Cutirreacciones con Toxoplasmina en Tampico. Revista Médica del Hospital General. Vol. XIV. No. 4. Abril. pp. 191 - 195
- 2. Beck J. W.; Davies J. E.** 1984. Parasitología Médica. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México. pp. 84 - 90
- 3. Botero D.; Restrepo M.** 1985. Parasitosis Humana. Ediciones Corporación para Investigaciones Biológicas. México. pp. 279 - 296
- 4. Calderón J. E.; León D. G.** 1985. Interpretación de la pruebas inmunoserológicas para el diagnóstico de Toxoplasmosis. Infectología. Año V Núm. 10. Octubre. pp. 258 - 264
- 5. Calderón J. E.** 1986. Respuesta inmune a la Toxoplasmosis. Boletín Médico Infantil. México. Vol. 43. Núm. 10. Octubre. pp. 658 - 661
- 6. Carracedo R. J.; Rodríguez T.; Pérez R. A.** 1987. Posible repercusión de la infección Toxoplásmica en el embarazo. Estudio preliminar. Revista Cubana Obstetra Ginecológica, 13 (4): 479 - 486. Octubre-Diciembre.
- 7. Charif H.; Darcy F.; Torpier G.; France M.; Capron A.** 1990. Toxoplasma gondii: Characterisation and Localisation of Antigens Secreted from Tachyzoites. Experimental Parasitology, 71. pp. 114 - 124
- 8. Darcy F.; Charif H.; Caron H.; Deslée D.; Pierce R. J.; Cesbron-Delauw M. F.; Decoster A.; Capron A.** 1990. Identification and Biochemical characterisation of antigens of Tachyzoites and Bradyzoites of Toxoplasma gondii with cross-reactive epitopes. Parasitology Research. No. 76. February. pp. 476 - 478
- 9. Jean Bach F.** 1985. Inmunología. Editorial Limusa. Primera Edición. pp. 441 - 449
- 10. Fernández M.; Tila Sibaja M.; Granier A.** 1986. Encuesta sero-epidemiológica de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en 125 mujeres embarazadas del oriente del Estado de Tabasco. Boletín Médico Hospital Infantil. México. Vol. 43. No. 5. Mayo. pp. 274 - 277
- 11. Frenkel J. K.** 1986. La inmunidad en la Toxoplasmosis. Bol. of Sanit Panam. Vol. 100. No. 3. pp. 283 - 296

- 12. García R. J.J.; Alvarez R.; Salazar A.** 1986. Toxoplasmosis ocular en niños. Estudio de 33 casos Boletín Médico Hospital Infantil, México. Vol. 43. Núm. 12. Diciembre. pp. 769 - 772
- 13. González C. L.; López. V. J.; Moscoso F.** 1987. Miocardiopatía Toxoplásmica crónica. (Presentación de 6 casos). Revista Ecuatoriana de Medicina. Vol. XXIII. No. 1. pp. 13 - 19
- 14. González O. E.** et. al. 1980. Toxoplasmosis considerations diagnostic results of studies. Revista Cubana Med Trop. Vol. 32. No. 2. pp. 157 - 164
- 15. Guhl F.; González A. C.; Marinkelle C. J.; De Sánchez N.** 1981. Estudio comparativo entre las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para toxoplasmosis en 877 sueros. Revista Latinoamericana Microbiología. 23. pp. 235 - 238
- 16. Isita S. L.; Sosa-Martínez J.; Sosa R.** 1984. Respuesta inmune a la toxoplasmosis. Infectología. Año IV. Núm. 2. Febrero. pp. 34 - 40
- 17. Isita-Tornell L.; Isita S. L.** 1988. Potencial evasivo de Toxoplasma gondii a la respuesta inmunitaria del huésped. Infectología. Año 8. Núm. 1. Enero. pp. 31 - 36
- 18. Stephen J.** 1987. Toxoplasmosis. Clinical Microbiology Newsletter. Vol. 9. N. 21. November. pp. 165 - 167
- 19. Leyva C. A.** 1979. Toxoplasmosis: resumen histórico y revisión bibliográfica. Rev. Cub. Trop. 31. Mayo-Agosto. pp. 141 - 158
- 20. Leonardí M. S.; Zummo S.; Fattal-German M.; Bizzi Mastroeni P.** 1990. A dot-ELISA intended for the specific and simultaneous detection of antibodies directed to antigens derived from Toxoplasma gondii, rubella virus, cytomegalovirus, and type 1 and type 2 herpes viruses. J. Clin. lab. Anal. 4(4). pp. 261 - 267
- 21. Markell y Voge.** 1984 Parasitología. Diagnóstico, prevención y tratamiento. Editorial El Manual Moderno. 5ª edición. Capítulo 5. pp. 141 - 150
- 22. Montoya F.** 1985. Manejo terapéutico de la Toxoplasmosis. Acta Médica Colombiana. Vol. 10. Núm. 6. Noviembre-Diciembre. pp. 251 - 255

- 23. Nisal M.; Santana A.; Paniagua R.; Palacios J.** 1986. Testicular Toxoplasmosis in two men with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Arch. Pathol Lab. Med. Vol. 110. August. pp. 744 - 746
- 24. Nojimoto I.T.I.; Hoshino-Shumizu; Comargo M.E.** 1987. Lecitins for the detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii in the diagnosis of acute Toxoplasmosis by immunofluorescence test. Revista Instituto Medico Trop. São Paulo. Vol. 29. No. 6. Noviembre-Diciembre. pp. 354 - 360
- 25. Ediberto O.; López A. C.** 1980. Toxoplasmosis consideraciones diagnósticas. Rev. Cub. Med. Trop. 32;2. pp. 157 - 164
- 26. Papapetropoulou M.; Giannoulaki E.; Tzlgounis V.; Kondakis X.G.** 1990. Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in gravidas and recently aborted woman and study of risk factors. Eur. J. Epidemiol. June. Vol. 6. N. 2 pp. 223 - 226
- 27. Pappas M. G.; Hajkowski R.; Cannon L.; Huckmeyer W.** 1984. Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA): Comparison with standard ELISA and complement fixation assays for diagnosis of human visceral Leishmaniasis. Veterinary Immunology. Vol. 14. pp. 239 - 242
- 28. Pinon J. M.; Toubas D.; Marx C.; Mougeot G.** 1990. Detection of Specific Immunoglobulin F in patients with Toxoplasmosis. J. Clin. Microb. August. pp. 1739 - 1743
- 29. Quiroz R. H.** 1984. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa S.A. Primera Edición. México. Cap. 6. pp. 144 - 151
- 30. Ramos G.J.** 1984. Diagnóstico de Toxoplasmosis. Seminario de Titulación, IPN, México D.F.
- 31. Rivera G. F.; Calderón J. E.; Arredondo G.** 1988. Estructura antigénica de Toxoplasma gondii. Infectología. Año 8. Núm. 1. Enero. pp. 47 - 54
- 32. Rivera G. F.; Calderón J. E.; Olivera J.; Conde G. C.** 1988. Comparación de tres pruebas serológicas para el diagnóstico de la Toxoplasmosis. Infectología. Año 8. Núm. 3. Marzo. pp. 127 - 134

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 33. Sklenar I.; Thomas C.; Sefikalkan J.** 1986. Association of Symptomatic Human Infection with Toxoplasma gondii with imbalance of monocytes and antigen-specific T cell subsets. 1986. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 153. Num. 2. February. pp. 315 - 324
- 34. Stites D.P.; Stobo I.; Hugh H.** 1985. Inmunología básica y clínica. Editorial El Manual Moderno S.A. Quinta edición. México. pp. 705 - 706
- 35. Thiermann O. E.; Muños P.; Lorca H. M.** 1985. El estudio de las infecciones congénitas por Toxoplasma gondii y Trypanosoma cruzi. Revista Chilena de Pediatría. Vol. 56. Núm. 3. pp. 143 - 150
- 36. Velasco C.O.** 1992. Toxoplasmosis. Publicación técnica del INDRE No. 14.
- 37. Velasco C.O.** 1992. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. Rev. Salud Pública. 34:222-229.