



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y ELISA UTILIZANDO UN ANTÍGENO ESTABILIZADO EN LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *TOXOPLASMA GONDII*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ALICIA GONZÁLEZ CASTILLO

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MÉXICO, D.F. 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

México D.F. 2003

**El presente trabajo se realizó en el
Laboratorio L-313 de Inmunología de la
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Director de Tesis:
Dr. Rubén Marroquín Segura**

**Asesor:
Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

B

JURADO

Presidente: Q.F.B. María de las Mercedes Zamudio Durán
Vocal: Dr. Rubén Marroquín Segura
Secretario: Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera
Suplente: Q.F.B. Francisco Javier Parada García
Suplente: Q.F.B. Jesús Arroyo Rosales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

AGRADECIMIENTOS

A los profesores:

**Dr. Rubén Marroquín Segura
Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera**

Gracias por sus valiosas aportaciones y comentarios que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A Yola y al profesor Marroquín, con inmensa gratitud por su disposición y paciencia en todo momento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A mi Mamá:

Que tuviste la ilusión de ver realizada a tu hija y sembraste en mi la inquietud de la superación, por haberme guiado y brindado tu apoyo siempre incondicional: mil gracias. Admiro tu incansable lucha por realizarte y superarte. Eres una gran persona.

A la memoria de mi Padre:

A ti que me brindaste la imagen de un padre cuando pequeña, que me enseñaste con el ejemplo tus mejores virtudes: la responsabilidad y el orden. Gracias.

A Francisco:

Por ser el pilar donde descansan mis emociones, porque nunca obtuve de ti palabras de desaliento, siempre me apoyas y animas para lograr mis metas. Tu confianza, tu bondad y tus sueños hacen de ti una gran persona. A tu lado me esforzaré por ser mejor cada día. Te quiero.

A mi pequeña Abril:

Porque a tu lado aprendí a ser paciente, constante y perseverante. Por que eres la alegría de mi vida y la razón para superarme, siempre recordaré tus palabras: ¡mami soy bien valiente! Lo eres.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E

A mis hermanos:

Victor, Magda, Daniel, Pati, Juan y Mari. Porque cada uno con su ejemplo de lucha diaria, su actitud de superación y alegría han dado un toque de luz a mi vida. Gracias porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado.

A la Dra. Clementina Magos:

Gracias por su comprensión y apoyo para la elaboración y culminación de este trabajo.

A Ana Berta Meléndez:

Gracias por tu amistad, por la ayuda y las palabras de aliento que me brindaste hasta el final.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

F

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un protozooario que es contraído por un tercio de la población mundial; cuando se infecta la mujer en estado de gravidez puede afectar a su producto, causándole anomalías congénitas, trastornos oculares, neurológicos e incluso la muerte; también los pacientes inmunosuprimidos son afectados ya que la toxoplasmosis es una causa importante de enfermedad oportunista.

Generalmente la toxoplasmosis es una infección que cursa asintomática por lo que se requiere de un diagnóstico oportuno para su tratamiento; de aquí que es de gran utilidad el empleo de técnicas altamente sensibles y específicas como lo es el inmunoensayo ligado a enzima, este método ofrece múltiples ventajas y sus costos son accesibles.

En el presente trabajo se pretende realizar una comparación entre las técnicas de inmunofluorescencia y la técnica de ELISA, la cual se trabajará con un antígeno estabilizado ya que este se degrada fácilmente por la acción de las proteasas.

Se determinará la concentración de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en sueros de pacientes sospechosos de toxoplasmosis empleando un antígeno proteico estabilizado y conjugados comerciales anti IgA, anti IgM y anti IgG ligado a peróxidasa de rábano por el método de ELISA indirecto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

	Pag.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Morfología	4
2.3 Ciclo biológico	6
2.4 Patología	9
2.5 Diagnóstico	10
2.6 Tratamiento	12
2.7 Prevención	12
2.8 Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	13
2.9 Respuesta inmune de <i>Toxoplasma</i>	16
2.10 Métodos Inmunoenzimáticos	17
2.10.1 Ensayo tipo sándwich	18
2.10.2 Ensayo competitivo	18
2.10.3 Ensayo indirecto	18
2.10.4 Consideraciones generales para inmunoensayo ligado a enzima	20
2.11 Propiedades generales de inmunoglobulinas	22
2.11.1 Inmunoglobulina G (IgG)	25
2.11.2 Inmunoglobulina M (IgM)	25
2.11.3 Inmunoglobulina A (IgA)	25
2.11.4 Inmunoglobulina D (IgD)	26
2.11.5 Inmunoglobulina E (IgE)	26
3. Planteamiento del problema	27
4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Hipótesis	29
6. Diseño de investigación	30
6.1 Material	30
6.1.1 Material biológico	30
6.1.2 Reactivos	30
6.1.3 Material de laboratorio	31
6.1.4 Equipo de laboratorio	32
6.2 Métodos	33
I. Obtención del antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i> .	33
II. Cuantificación del antígeno por el método de Lowry.	34
III. Determinación de concentraciones de antígeno	34
IV. Tratamiento de muestras.	35
V. Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra <i>Toxoplasma gondii</i> en suero por el método de ELISA.	35
VI. Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra <i>Toxoplasma gondii</i> en suero por el método de inmunofluorescencia indirecta.	36
6.3 Diagrama de flujo	37
6.4 Tipo de estudio	38
6.5 Población	38
6.6 Criterios	38
6.6.1 Inclusión	38
6.6.2 Exclusión	38
6.6.3 Eliminación	38
6.7 Variables	39
7. Resultados	40
8. Análisis de resultados	70
9. Conclusiones	71
Anexo 1. Abreviaturas	73
Anexo 2. Preparación de soluciones	74
Glosario	76
Referencias	81

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemorables las enfermedades parasitarias en el hombre han tenido gran importancia clínica, dentro de las causadas por protozoarios una de las más relevantes es la toxoplasmosis cuyo agente etiológico es un parásito intracelular obligado llamado *Toxoplasma gondii*; este protozoo infecta aproximadamente a la tercera parte de la población mundial, presentándose generalmente en regiones donde el gato constituye una mascota común. La infección en el hombre generalmente carece de importancia ya que sólo es un huésped intermediario, pero en mujeres en etapa reproductiva la primoinfección puede producir aborto y en estado fetal la toxoplasmosis trae graves complicaciones tales como hidrocefalia, calcificación intracerebral o retardo mental; actualmente aún se reportan casos de toxoplasmosis en menores y cada día adquieren mayor importancia los casos de enfermedades oportunistas en pacientes inmunosuprimidos, por lo cual es de primordial importancia para los laboratorios disponer de métodos diagnósticos efectivos.

En la práctica clínica diaria el laboratorio emplea diversas técnicas para el diagnóstico de la toxoplasmosis, las cuales tienen ventajas y limitantes: la prueba de Sabin y Felman tiene como inconveniente el uso de toxoplasmas vivos, lo que presenta un riesgo para el analista; la hemaglutinación indirecta tiene limitaciones para el diagnóstico de la infección aguda adquirida y neonatal transplacentaria; por otra parte la prueba de inmunofluorescencia requiere de organismos vivos, es una prueba sensible, específica y reproducible en un 90%, siempre y cuando la realice personal capacitado, además hay que considerar resultados falsos positivos ocasionados por la presencia de factor reumatoide y anticuerpos antinucleares, y finalmente la prueba de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) tiene una correlación mayor al 90% comparada con el método de Sabin y Felman e inmunofluorescencia, en términos generales la interpretación de los títulos con la prueba de ELISA es semejante al de estas pruebas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La implementación de técnicas inmunoenzimáticas como la ELISA es una alternativa cuya realización trae múltiples beneficios ya que es altamente sensible, específica, económica, de fácil elaboración y no requiere de personal capacitado para su lectura, además de que la cantidad de muestras que se pueden procesar es mucho mayor en comparación con otras técnicas; sin embargo, el antígeno utilizado es muy inestable por lo cual se propone estabilizar el antígeno de *Toxoplasma gondii* con formalina ya que para otros parásitos (*Trypanosoma cruzi*) se ha observado ser conveniente pues aumenta la especificidad. De aquí que en este trabajo se proponga realizar un estudio comparativo entre el método de inmunofluorescencia y el método de ELISA utilizando el antígeno estabilizado con el propósito de comprobar la especificidad de este último y presentarlo como técnica alternativa en el diagnóstico de la toxoplasmosis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

Toxoplasma gondii fue descubierto por Nicolle y Manceaux (1908) en un pequeño roedor conocido como *Ctenodactylus gundi* en Túnez y al mismo tiempo en Sao Paulo, Brasil en conejos de laboratorio (1). Su clasificación taxonómica corresponde a un esporozoario ubicuo de subphylum Apicomplexa (2), subclase Coccidia, familia Sarcocystidae y género *Toxoplasma*. El término toxoplasmosis se refiere a la enfermedad causada por este parásito que es capaz de infectar una gran variedad de células de todos los tejidos de los vertebrados, especialmente se les encuentra en células del sistema retículo endotelial, células del sistema nervioso central y en células musculares; *Toxoplasma* infecta a la población humana, aves, peces y mamíferos domésticos y silvestres, siendo el gato el único hospedero definitivo, el hombre y otros animales de sangre caliente son solamente huéspedes intermediarios (3, 4, 5, 6).

La toxoplasmosis es la zoonosis más difundida en la naturaleza y en general es más frecuente en los países de clima cálido y húmedo que en los fríos y secos (7), el gato como huésped definitivo juega un papel importante en la dinámica de transmisión del parásito al humano ya que al parecer la toxoplasmosis sólo existe donde hay gatos (8); el hombre adquiere la infección al comer carne cruda o no suficientemente cocida que contiene quistes tisulares provenientes de ovejas, cerdos y vacunos (9, 10), también al ingerir agua (11) o alimentos contaminados con ooquistes liberados al ambiente a través de las heces de los gatos, al manipular carne contaminada, por transfusiones o trasplantes y por vía transplacentaria (12).

Las encuestas serológicas efectuadas en diferentes países indican una infección del 30 al 50% de los adultos sanos entre 30 y 40 años de edad, estas cifras varían de un lugar a otro dependiendo de factores geográficos y climáticos, hábitos alimentarios, tipo de

trabajo, a la higiene ambiental y a la presencia de gatos infectados, como hace mención Weigel (10) en un estudio realizado en 43 granjas en Illinois donde encontró una seroprevalencia del 31% y como factores de riesgo asociados a esta infección el elevado número de gatos infectados, abundancia de gatos machos y la crianza de puercos.

En México Velasco y colaboradores (7, 12) en 1992 realizaron un estudio serológico sobre la toxoplasmosis con sueros de la encuesta nacional seroepidemiológica, encontrando una seroprevalencia del 32% a una dilución de 1:16, los resultados obtenidos registran mayor prevalencia en la región costera, en el nivel socioeconómico bajo y un alto índice en la etapa reproductiva de la mujer.

2.2 Morfología

Toxoplasma gondii se puede encontrar de tres formas dependiendo de la etapa que atraviese en su ciclo biológico (5, 13): primeramente tenemos las formas quísticas se desarrollan tanto en el huésped intermediario como en el definitivo, pueden contener hasta 300 bradizoitos y son capaces de persistir en los tejidos, se multiplican lentamente y sus formas son delgadas (2 por 7 μm), invaden preferentemente células neurales y musculares, puede reactivarse cuando se deteriora la inmunidad celular. La segunda forma son los ooquistes que presentan una pared gruesa y resistente, sólo se forman en las células mucosas de los intestinos de los gatos y subsecuentemente se secretan en las heces (conteniendo esporozoitos), los ooquistes se excretan de 3-10 días después de que el gato ingirió quistes, de 18 días o más después de ingerir ooquistes y de 13 días o más después de ingerir taquizoitos (14). Y por último los taquizoitos que son la forma activa de replicación, responsable de la diseminación de la infección y de la destrucción tisular, se localizan en sangre y tejidos durante la infección aguda.

La morfología del trofozoito de *Toxoplasma gondii* puede ser descrita como una estructura de forma semilunar o en arco de 4 a 6 micrómetros de longitud por 2 a 4 micrómetros de ancho, con un polo anterior más aguzado, una cara convexa y la otra generalmente cóncava. La tinción con giemsa pone de manifiesto el núcleo rosado de ubicación central o paracentral y el citoplasma coloreado de azul; al microscopio electrónico se observa un

polo anterior un anillo polar y una formación cónica hueca (conoide) cuya base está dirigida hacia el interior del parásito, por delante del conoide parece continuarse en los roptries (15) (estructuras delgadas, cilíndricas, homogéneas y divergentes en dirección al centro del parásito), el conoide puede ser prominente y en este caso, representar un organelo apropiado para perforar la membrana de la célula hospedera, además en el citoplasma se distinguen mitocondrias, granulaciones, fibras delgadas y el aparato de Golgi, el núcleo redondo u oval es semicentral y está algo desplazado hacia el polo posterior tiene una doble membrana y posee un nucléolo (4, 16). Ver figura 1.

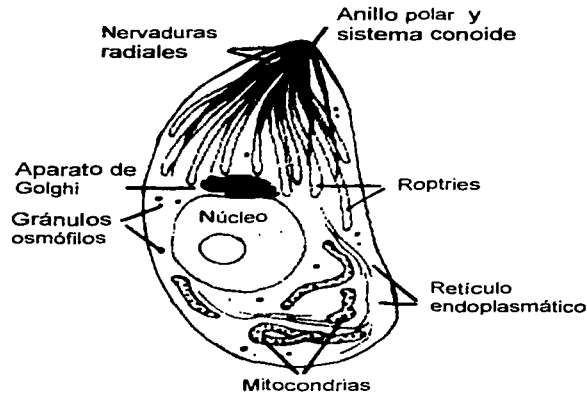


Figura 1. Ultraestructura de *Toxoplasma gondii*. (4)

2.3 Ciclo Biológico

Los toxoplasmas son capaces de parasitar cualquier célula nucleada, pero de preferencia se les encuentra en células del sistema nervioso central, en células del sistema retículo endotelial y en las células musculares. Cuando los trofozoitos penetran a las células se forma una vacuola parasitófora (17) en la que se reproducen los parásitos de forma asexual por endodiogenia y poliendogenia pasando rápidamente de una célula a otra, esta multiplicación intracelular acelerada de toxoplasma (taquizoitos) origina la formación de pseudoquistes o sea células repletas de parásitos. Si el huésped desarrolla rápidamente una respuesta inmunitaria los taquizoitos que se encuentran en el interior de la vacuola celular se reproducen muy lentamente (bradizoitos) y da como resultado la formación de un quiste, éste se desarrolla en las células mucosas del intestino en miembros de la familia de los gatos (3, 12).

En el hospedero definitivo los bradizoitos y los esporozoitos invaden las células epiteliales del intestino y se reproducen por esquizogonia con lo que se producen los merozoitos, es probable que esta fase esquizogónica sea precedida de otros mecanismos de reproducción asexual. Los merozoitos pueden penetrar a nuevas células o transformarse en gametocitos, que son los precursores de los gametos masculinos y femeninos. El microgameto (gameto masculino) debido a la movilidad que proporciona sus flagelos abandona la célula y penetra en otra en la que exista un macrogameto (gameto femenino), de esta forma se inicia la gamogonia produciéndose la fecundación y el cigote resultante sale a la luz intestinal recubierto de una membrana translúcida, esta formación recibe el nombre de ooquiste no esporulado no es infeccioso y se elimina en las heces del animal. En el medio externo cada ooquiste sufre otro proceso de reproducción asexual (esporogonia), formándose en el interior de éste dos esporozoitos, cada uno de los cuales madura en cuatro esporozoitos y si las condiciones son favorables pueden permanecer viables en el suelo durante un año o más (4, 12). Ver figuras 2 y 3.

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

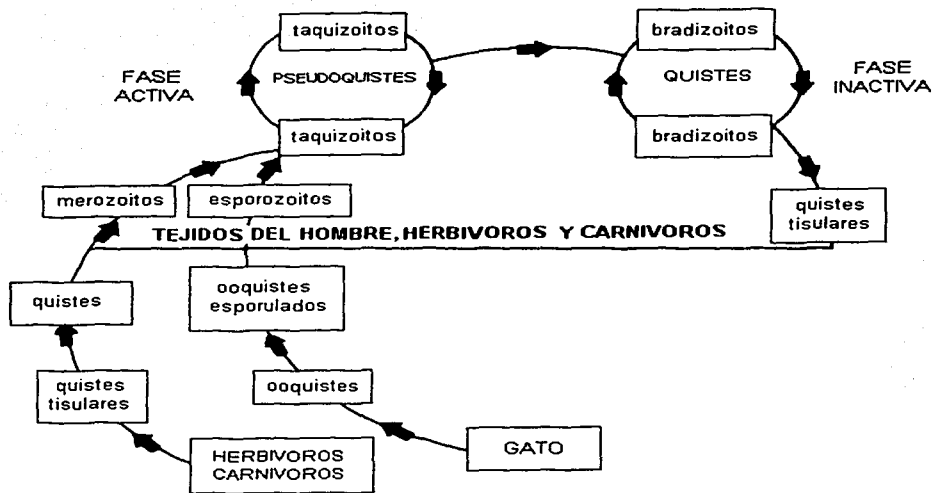


Figura 2. Ciclo evolutivo de *Toxoplasma gondii* en la fase tisular. (4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

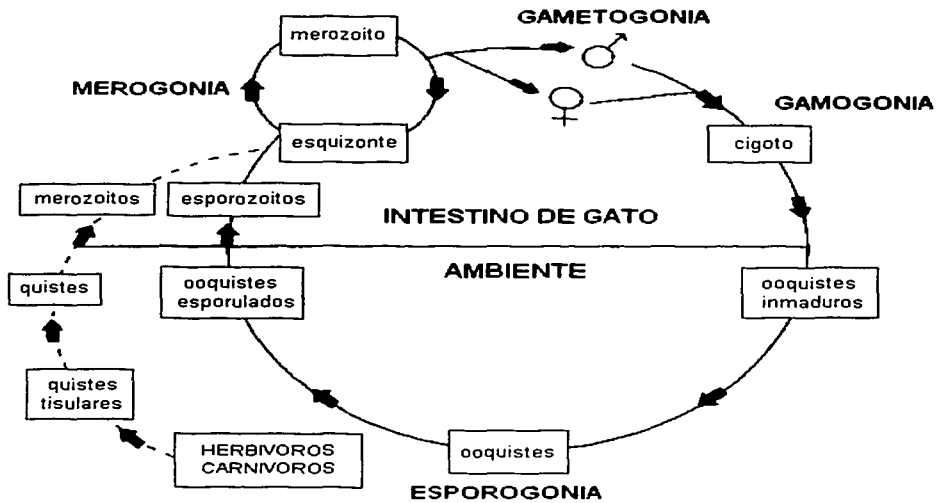


Figura 3. Ciclo evolutivo de *Toxoplasma gondii* en la fase intestinal. (4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4 Patología

La infección por toxoplasma en humanos por lo general cursa asintomática, esto depende de la cepa infectante, la dosis, vía de infección y respuesta inmune del huésped, durante la infección aguda se produce la diseminación del parásito a diversos tejidos y sólo una pequeña fracción presenta síntomas tales como fiebre, malestar general, mialgias, astenia, erupción cutánea, odinofagia y hepatóesplenomegalia. Si el huésped es inmunocompetente se desarrolla en forma paralela la inmunidad celular específica que termina controlando la infección y formando quistes hísticos que persisten de por vida especialmente localizados en el cerebro, retina, corazón y músculos, a partir de entonces se entra en etapa de infección crónica latente (12, 18, 19).

En pacientes inmunosuprimidos puede reactivarse la infección y aparecer como infección oportunista, es el caso de pacientes con neoplasias, trasplante de órganos y pacientes infectados con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Algunos autores tales como Lee (20) señalan que una de las primeras manifestaciones de pacientes con virus de inmunodeficiencia adquirida es la retinocoriorretinitis, mientras que Roberts (21) advierte que esta es una enfermedad recurrente y progresiva que puede causar morbilidad severa, por otra parte Chandener (22) reporta dos casos de pacientes, uno de ellos desarrollo miocarditis y el otro tuvo una falla congestiva del corazón después de contraer toxoplasmosis.

La forma más frecuente de manifestarse la toxoplasmosis en el paciente inmunodeprimido por el VIH es la afección del sistema nervioso central, produciendo abscesos, encefalitis u otra encefalopatía, las manifestaciones más frecuentes son: fiebre, hipertensión endocraneana, convulsiones, trastornos de la conciencia, deficiencias visuales y alteraciones psiquiátricas. Las formas meningoencefálica y pulmonar son poco comunes pero se han incrementado notoriamente por presencia del VIH (23, 24).

La toxoplasmosis congénita es en la mayoría de las veces consecuencia de una infección aguda adquirida por la mujer embarazada que trasmite durante la gestación al embrión; en un estudio realizado por Allain (25) y colaboradores encontraron de 3 a 16 fetos infectados con toxoplasma por cada 10,000 mujeres embarazadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Si la infección es transmitida en los primeros meses de embarazo se puede presentar aborto, muerte fetal o anomalías congénitas, estos niños al nacer pueden presentar signos de infección más o menos severos, la patología más frecuente en estos casos es hidrocefalia, calcificaciones intracerebrales, daños encefálicos, retraso mental y pérdida de agudeza auditiva (5, 26, 27, 28). Cuando la infección ocurre en los últimos meses las alteraciones son menores, no presentan síntomas al nacer, pero puede revelarse trastornos oculares o neurológicos meses o años después del nacimiento tales como la coriorretinitis (12, 29, 30). Al respecto Couvreuret (31) realizó un estudio en Francia donde contempla los últimos 40 años encontrando que el 71% de los casos de toxoplasmosis congénita son infraclínicos al momento de nacer y sólo el 5% son severos y además que la seroconversión durante el embarazo es del 1.48% con un 40% de riesgo de contaminación fetal si no es tratado y menciona que el riesgo de adquirir una fetopatía ocurre primordialmente a las 26 semanas de gestación, por otra parte Dunn (32) y colaboradores realizan un estudio donde reportan que un 6% de las mujeres se infecta durante las primeras 13 semanas y que estos niños presentan signos clínicos de infección al nacer, mientras que un 72% se infecta a las 36 semanas y sólo el 10% de los niños presentan complicaciones a largo plazo.

2.5 Diagnóstico

La demostración de la existencia de diferentes clases de anticuerpos específicos para los diversos antígenos de toxoplasma y la aparición de estos mismos en diferentes estadios de la infección han impulsado al desarrollo de diversas pruebas de diagnóstico serológico. En la práctica se investigan IgG, IgM e IgA anti-toxoplasma, se piensa que durante la fase inicial de la infección los anticuerpos IgG, IgM e IgA están dirigidos contra los antígenos mayores de la membrana y que la liberación de antígenos citoplásmicos sólo produce estímulo de las IgG (4). Los primeros anticuerpos que se detectan son los de tipo IgM que aparecen en la primera semana y llegan a un máximo en 15 días y caen a títulos bajos que normalmente desaparecen en un año o más, en forma paralela otro anticuerpo de tipo IgG aparece de 2 a 4 semanas y alcanzan su pico máximo de 2 a 6 meses más tarde, pueden persistir por toda la vida (12, 33, 34, 35). Ver figura 4.

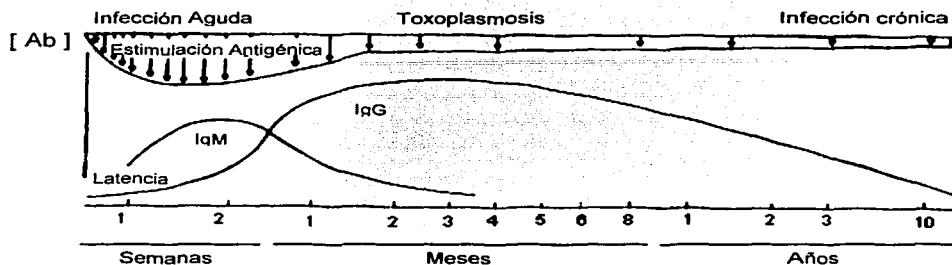


Figura 4. Concentración de anticuerpos en la toxoplasmosis. (34)

Los métodos indirectos se basan en la determinación de anticuerpos en suero. Diversas pruebas tales como las de Sabin y Feldman, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoenzimáticas (36) (ELISA) y hemaglutinación indirecta (HAI) son algunas que se emplean para el diagnóstico de la toxoplasmosis. La prueba de Sabin y Feldman es sensible y específica, pero compleja y peligrosa por utilizar toxoplasmas vivos, sólo se realiza en laboratorios especializados (37, 38); la hemaglutinación indirecta es poco reproducible y no debe emplearse para el diagnóstico de infección congénita ni para los casos de infección aguda, esto debido a que los anticuerpos que detecta se desarrollan más lentamente; la prueba de inmunofluorescencia indirecta es la más utilizada, es una técnica simple y rápida en la cual se miden anticuerpos clase IgG o IgM, los anticuerpos antinucleares y el factor reumatoide pueden ocasionar falsos positivos en la determinación de anticuerpos IgM. La prueba de IFI-IgM ayuda a establecer el diagnóstico de la infección aguda debido a que los anticuerpos IgM aparecen al principio y desaparecen más pronto en comparación con los anticuerpos IgG, los títulos de anticuerpos considerados como significativos en IFI para la mayoría de los laboratorios es de 1:256 (12).

La técnica de inmunoensayo ligado a enzima es simple y objetiva para determinar anticuerpos IgG e IgM, los resultados obtenidos con ella se correlacionan bien con el resto de las pruebas, la positividad en la determinación de IgM por este método define la infección aguda. Otra posibilidad es la medida de la avidéz de los anticuerpos IgG, que se

basa en la medida de la afinidad de los anticuerpos por su antígeno; durante la fase inicial de su producción poseen una afinidad baja (infección reciente) y a medida que transcurre el tiempo ésta aumenta progresivamente (infección crónica); sin embargo algunos autores consideran que la información serológica aislada no basta para establecer el diagnóstico, salvo cuando el título es extremadamente elevado (1:16000 o más) y se correlacionan con el cuadro clínico, ya que títulos elevados 1:20000 carecen de significancia clínica en individuos sanos, mientras que títulos de 1:2 es importante en pacientes con coriorretinitis (4, 7, 12).

2.6 Tratamiento

El tratamiento está indicado para todos los pacientes con manifestaciones clínicas, hasta la fecha no existe un tratamiento completamente eficaz; el mejor es la administración de pirimetamina con trisulfa. Se utiliza también la clindamicina, espiramicina, en las infecciones adquiridas durante el embarazo no se recomienda el uso de pirimetamina y se debe prescribir sulfonamidas y espiramicina (39).

2.7 Prevención

- Cocer perfectamente la carne antes de consumirla. La congelación también destruye las formas parasitarias.
- Dar a los gatos alimento seco, enlatado o hervido e impedir que cacen o coman desperdicios de los basureros. Eliminar diariamente las heces de los gatos ya sea en el retrete, quemarlas o enterrarlas.
- Desinfectar diariamente con agua hirviendo las cajas con arena en que defecan los gatos usando guantes cuando se manipule el material que pueda ser infectante.
- La arena del gato que esté seca debe ser eliminada sin sacudirla para evitar la dispersión de los ooquistes en el aire.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Lavarse perfectamente las manos después de manipular carne cruda o de estar en contacto con tierra que quizá esté contaminada con heces de gatos.
- Las mujeres embarazadas, salvo aquellas que posean anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* deben evitar participar en cualquiera de las actividades para contraer la infección.
- Se recomienda la realización de pruebas serológicas a las mujeres antes de embarazarse. Si el resultado es positivo a IgM se da tratamiento. También es recomendable practicar la detección de anticuerpos a los recién nacidos de madres con serología desconocida.

2.8 Antígenos de *Toxoplasma gondii*

La membrana de toxoplasma cumple con muchas funciones, entre ellas se incluye el rol de ataque, las señales de invasión y transporte e interacción con la respuesta inmune del hospedero, diversas moléculas llamadas antígenos de superficie se encuentran sobre la membrana de este parásito en sus diferentes estados (40). La producción de anticuerpos monoclonales ha sido útil en la purificación y caracterización de antígenos frente a un parásito (41), en este caso para *Toxoplasma gondii* que pasa por diferentes estadios biológicos a lo largo de su ciclo, es muy compleja y depende tanto de la cepa infectante como de la fase que curse, básicamente estos antígenos pueden encontrarse sobre la membrana o en el citoplasma del parásito.

En un estudio realizado por Handman y col. (42) en donde caracterizan por primera vez antígenos de membrana de *Toxoplasma gondii* mediante la preparación de anticuerpos monoclonales (2G11, 3E6, 1E3, 1E11), marcan radioactivamente a taquizoitos, solubilizan las proteínas de membrana e identifican por electroforesis 4 proteínas con peso molecular aparente de 43000, 35000, 27000 y 14000 Da. Posteriormente en 1983 Johnson y col. (43) realizan un análisis de los antígenos solubles y encuentran otro componente antigénico de 98000 Da, en el cual el antígeno soluble reacciona con el anticuerpo por hemaglutinación indirecta, pero no reacciona contra antígenos de membrana por inmunofluorescencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

indirecta, lo cual sugiere que el antígeno de 98 Kd es un componente soluble del citoplasma y no se presenta en la superficie de la membrana de los taquizoitos. Otras proteínas mayores de la membrana se reportaron con peso molecular de 22, 30, 35 y 43 Kd, de éstas la p30 es la proteína dominante y comprende un 5 % del total de las proteínas del taquizoito, consecutivamente se purifica la proteína p30 para obtener finalmente antígenos de 30 Kd (44). Otros investigadores como Sharma y col. utilizando la técnica de western blot encontraron anticuerpos de tipo IgG e IgM en suero humano reconociendo tres antígenos mayores con peso molecular aparente de 32000, 22000 y 6000 Da (45).

Por otra parte Decoster y col. (46) observan la respuesta inmune producida por los antígenos excretados y secretados (ESA) por los taquizoitos y proponen la existencia de diferentes antígenos en cada fase de la infección, los cuales pueden servir como marcadores para el diagnóstico; para demostrar lo anterior comparan la respuesta al anticuerpo utilizando antígenos de membrana y ESA durante la fase aguda de la infección; donde encuentran que los antígenos 30, 35 y 43 reaccionan contra un anticuerpo de tipo IgM, estos son detectados tempranamente, pero la reacción es muy débil; la respuesta anti-ESA es más intensa y se caracteriza por la producción de anticuerpos de tipo IgM los cuales reconocen dos antígenos, uno de 97 Kd y otro de 69 Kd. En la fase crónica de la infección se reconocen alrededor de 20 moléculas de antígenos secretados y excretados tales como 86, 69, 60, 57, 42, 39, 28.5 y dobletes 97-108 Kd, mientras que antígenos de membrana solamente se detectaron cuatro: 43, 35, 30, y 22 Kd; por lo anterior demostraron que antígenos excretados y secretados son más intensamente reconocidos que los antígenos de membrana y citoplásmicos en la fase crónica y que la transferencia pasiva de ESA con anticuerpos específicos inducen una protección significativa contra la toxoplasmosis en ratones nu/nu.

En 1990 Charif y col. (47) caracterizaron y localizaron los antígenos secretados por taquizoitos, encontrando que los antígenos 21,27, y 28.5 Kd se localizan en los gránulos densos de taquizoitos y se les relaciona con la red del microvello de los poros del parásito. En 1998 Fisher y col. (48) pusieron de manifiesto la existencia de un antígeno excretado de 29 Kd conocido como proteína de gránulos densos (GRA7), la cual pone de manifiesto la presencia de toxoplasma intracelular, este antígeno representa por lo menos 0.5% de la proteína de *T. gondii*, en las células infectadas por taquizoitos la P29 se localiza dentro de

TESIS CON
VALLE DE ORIGEN

la vacuola parasitófora y en las células infectadas por bradizoítos la P29 se presenta dentro del citoplasma, la función de GRA7 no se conoce aún, pero es la única proteína que se expresa en todas las formas infecciosas de *T. gondii* el cual puede ser un punto básico en las adaptaciones vacuolares requeridas para el desarrollo activo del parásito (49). Posteriormente se purificó y determino la actividad antigénica de GRA7, el antígeno se evaluó por el método de ELISA en la detección de IgG con una sensibilidad del 81%, pero cuando el antígeno se recombina con una proteína Tg34AR la sensibilidad aumenta hasta en un 96%, el dominio antigénico más importante de GRA7 para el suero humano se localiza entre los residuos 97 y 146, estos resultados pueden ser útiles para el estudio de la respuesta inmune (50).

Los antígenos excretados y secretados se pueden utilizar a mediano plazo en diversas aplicaciones, tal como lo expone Zenner y col. (51) donde proponen una vacuna a partir de antígenos excretados y secretados para la protección de la toxoplasmosis congénita en ratas, la inmunización de las ratas se realiza con extracto de crudos de toxoplasma o con ESA después de preñarlas, éstas producen una respuesta a células B que incluye anticuerpos de isotipo IgG1 y confirieron a los recién nacidos elevados niveles de protección, los experimentos preliminares de inmunización se realizaron utilizando dos antígenos ESA (GRA2 y GRA5) purificados por HPLC, éstos confieren una protección significativa aunque se prolonga muy poco; este modelo podría resultar muy atractivo para la realización de futuras vacunas contra la toxoplasmosis congénita.

Otros investigadores han trabajado con antígenos recombinados tales como Li, Galvan, Remington y Araujo (52, 53) donde combinan cuatro antígenos (rP22, rP25, rP29 y rP35) en un ELISA (Rec-ELISA), el cual concluyeron que puede utilizarse para el diagnóstico de la toxoplasmosis en mujeres embarazadas y para la diferenciación entre la infección adquirida recientemente (toxoplasmosis aguda) y la infección adquirida tiempo atrás (toxoplasmosis crónica), también Aubert y col. (54) evaluaron 11 antígenos recombinados y sugieren que la combinación de P29, P30 y P35 en IgG Rec-ELISA y una combinación de P29, P35 y P66 en IgM Rec-ELISA podrían reemplazar la utilización del taquizoito en el diagnóstico serológico de IgG e IgM respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.9 Respuesta Inmune de Toxoplasma

Los cambios de fase de *Toxoplasma* durante su ciclo biológico y su condición de parásito intracelular le permiten evadir los mecanismos de inmunidad (55) del huésped, como es el caso de los macrófagos no activados donde el parásito penetra la célula a través de una unión de membrana móvil y forma una vacuola parasitófora en el citoplasma, inhibiendo la formación del fagolisosoma del macrófago, impidiendo su digestión y muerte (18, 56). En otras condiciones, si el parásito se expone a los anticuerpos, se desencadena una fagocitosis normal así como la formación de productos intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno que finalmente matan al parásito, además las células citotóxicas efectoras (TCE) activadas con el antígeno P30 son capaces de lisar macrófagos infectados con *T. gondii*. Sin embargo, se debe tener presente que este parásito invade pocos macrófagos y tiene preferencia por células libres que lo protegen de la actividad de anticuerpos y se encuentran dentro de los tejidos sólidos en formas enquistadas, que los protegen de la fagocitosis.

Muchas de las células que invade toxoplasma son no fagocíticas, por lo que la respuesta inmune es a través de células T (18), durante la infección inicial el parásito induce elevados niveles de interferón-gamma (IFN-gamma) como resultado de la activación temprana de células T (57) y de células Natural Killer (NK) (58). Algunos investigadores reportan la importancia que la síntesis de interleucina 12 (IL-12) por macrófagos durante las infecciones parasitarias como un evento clave en la regulación de la inmunidad mediada por células (IMC), la participación de la IL-12 es el mejor mecanismo en la producción temprana de interferón gamma, esta citosina promueve la diferenciación de células efectoras TH1 que es importante para la activación de los macrófagos y en la activación de sus funciones microbicidas, tal como la liberación del óxido nítrico (58, 59).

Otros investigadores realizaron estudios sobre el papel de las células CD4+ y CD8+ en el cual estimulan in vitro células esplénicas con taquizoitos, encontrando que las células CD4+ producen elevados niveles de interferón gamma e interleucina 2 (IL-2) y que las células CD8+ producen menos interferón gamma y no se detecta interleucina 2, además observaron la transferencia de la inmunidad de células provenientes de ratones inmunizados donde las células CD4+ Y CD8+ son mediadoras de la resistencia a la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

reinfección, de esta manera concluyeron la participación de los linfocitos CD8+ como células efectoras en la inmunidad inducida y los linfocitos CD4+ participan como auxiliares en la inducción, protección y en la actividad funcional de CD8+ (60). Khan y col. reportaron que las células CD4+ Y CD8+ son parasitadas a *T. gondii* extracelulares y presentan citotoxicidad independiente de la opzonización, secreción de linfocinas, actividad de células NK y restricción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (61).

Otros autores hacen referencia a la participación de las interleucinas y citocinas: Ely observó que en ratones deficientes de la cadena p40 del heterodímero de la IL-12 hay una deficiencia de IFN-gamma y esto los hace muy susceptibles a la infección contra *T. gondii*, cuando se administra IFN-gamma exógeno se incrementa su supervivencia y regula la depresión de células CD8 super (+), el incremento de células CD8 super (+) es independiente de la acción de las células CD4 super (+), de lo cual concluye que el interferón gamma puede regular la respuesta de las células CD8 super (+) durante la infección de *T. gondii* (62); por otra parte Khan y col. mostraron en sus investigaciones que la citosina IP-10 es un importante quimioatrayente específico para la activación de células T con ratones infectados naturalmente con toxoplasma y por lo tanto sugiere que la IP-10 interviene en la localización y función de las células T efectoras a los sitios de inflamación (63).

2.10 Métodos Inmunoenzimáticos

Los enzimoimmunoensayos fueron desarrollados a mediados de los años sesenta teniendo como base los métodos de inmunofluorescencia, inmunodifusión e inmunolectroforesis (Nakane y Pierce 1966, 1967; Avrameas y Uriel 1966), posteriormente se observó que los antígenos o los anticuerpos podían ser inmovilizados sobre una fase sólida, lo cual hizo posible la cuantificación de inmunoreactivos en tubos (Engvall y Perlman en Suecia, Van Weemen y Schuurs en Holanda, ambos equipos en 1971), esta técnica permite determinar la concentración de un antígeno o de un anticuerpo mediante la actividad enzimática (36). Los enzimoimmunoanálisis son de dos tipos: homogéneos y heterogéneos. En los primeros no es necesario el paso intermedio de separación o lavado, en los ensayos heterogéneos, generalmente conocidos como enzimas fijadas a inmunoabsorbentes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(ELISA), el anticuerpo o el antígeno se liga a una enzima reteniendo el complejo tanto la actividad inmunológica como la enzimática (64). Estos ensayos se pueden dividir en aquellos en los que se marca el anticuerpo, conocido como técnica del sandwich, y aquellos en los que se marca el antígeno, fijándose el anticuerpo en la fase sólida (65, 66).

2.10.1 Ensayo tipo Sandwich

Esta técnica puede utilizarse para medir antígeno o anticuerpo; para la medición de antígenos existe un primer anticuerpo unido habitualmente a una fase sólida, el antígeno reacciona con él, se lava para eliminar sustancias no unidas y se hace reaccionar con otro anticuerpo dirigido a otros determinantes antigénicos. El segundo anticuerpo está marcado con una enzima, tras otro proceso de lavado se revela el ensayo, siendo proporcional el producto formado a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

2.10.2 Ensayo competitivo

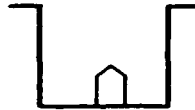
Para medición de antígeno; la muestra se hace competir con antígeno marcado frente a un anticuerpo (unido normalmente a una fase sólida), se lava para eliminar el componente que ha quedado libre y se relava, la cantidad de producto formado es inversamente proporcional al antígeno (no unido a enzima) existente a la muestra.

2.10.3 Ensayo indirecto

Se usa para medir niveles de anticuerpo; el antígeno se fija a la fase sólida que reacciona con la muestra donde se encuentra el anticuerpo, tras un lavado se añade inmunoglobulina-anti-globulina humana marcada con una enzima, se vuelve a lavar y se revela como se ve en la figura 5. La cantidad de producto formado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

1.- Antígeno absorbido a la placa

LAVAR



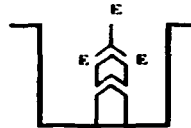
2.- Añadir muestra: anticuerpo específico se une a la placa

LAVAR



3.- Añadir antglobulina marcada con enzima que se une al anticuerpo

LAVAR



4.- Añadir sustrato

Cantidad hidrolizada = Cantidad de anticuerpos presente



Figura 5. Método indirecto de ELISA en microplacas para la detección y determinación de anticuerpos. (66)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.10.4 Consideraciones generales para inmunoensayo ligado a enzima

Los inmunoreactivos que se unen a la fase sólida se pueden clasificar en solubles y particulados, dentro del primer grupo se encuentran las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos, y en el segundo grupo por lo general se utilizan las células completas, el método más utilizado para fijar proteínas es la adsorción física directa, cuando esta fijación no es efectiva se procede a inmovilizar la proteína covalentemente mediante la adsorción y fijación posterior por interpolimerización con glutaraldehído o con carbodiimida; los materiales más comúnmente utilizados para la fijación de inmunoreactivos son el poliestireno y el polivinilo, estos materiales se usan en forma de tubos, esferas, placas y varillas. Otros soportes utilizados con buenos resultados son el nylon, la agarosa, el polipropileno, la nitrocelulosa, la celulosa, la goma de silicona y el vidrio.

Después de la etapa de sensibilización de la fase sólida persisten sitios de unión al plástico no ocupados, es necesario bloquear estos sitios con proteínas ajenas al sistema. Para este propósito se puede utilizar seroalbúmina bovina, caseína, suero entero, gelatina, leche en polvo descremada etc. La etapa de lavado es crítica para separar el componente específicamente unido al inmunoreactante inmovilizado en la fase sólida, de componentes que pueden reaccionar en forma no específica. La adición de un detergente no iónico a la solución de lavado funciona adecuadamente, como ejemplo tween 20 en una concentración al 0.05%.

El conjugado se prepara mediante la unión covalente de una enzima o un antígeno o un anticuerpo, esta reacción se lleva a cabo con glutaraldehído, en donde dos moléculas que tengan grupo amino libres pueden unirse con dos grupos carbonilo del glutaraldehído. Esta reacción puede realizarse en una o dos etapas. Las enzimas utilizadas satisfactoriamente son la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la beta galactosidasa y la fosfatasa alcalina (64). Los criterios para la elección de una enzima se resumen en el cuadro 1.

1. Deben ser estables durante su almacenamiento, ya sea libres o conjugadas
2. Deben ser de fácil preparación, obtenerse con elevada pureza y bajo costo
3. La actividad enzimática debe ser alta, ya sea como enzima libre o como enzima conjugada
4. La actividad enzimática debe ser fácilmente detectable
5. Deben ser compatibles las condiciones del ensayo
6. Deben poseer grupos químicos reactivos para la conjugación
7. Deben ser fácilmente conjugables a anticuerpos u otros sistemas de detección
8. La enzima del conjugado no debe estar presente en el componente que se fijará a la fase sólida

Cuadro 1. Criterios para la elección de una enzima. (64)

Para determinar la actividad enzimática es necesario la adición de una sustancia que ponga de manifiesto dicha actividad mediante el desarrollo de color, para lo cual existe una amplia gama de sustratos cromogénicos. En la elección de sustrato debe considerarse ciertos requisitos que se muestran en el cuadro 2.

1. Deben ser solubles en agua, incoloros y no tóxicos
2. El producto formado debe poseer un alto coeficiente de extinción molar, con un máximo de absorbancia entre 400 y 600 nm
3. Deben ser estables al almacenamiento y luego de la detención de la reacción enzimática
4. No deben ser fotosensibles
5. Debe haber un amplio rango de linealidad entre el color y la concentración de enzima
6. Debe ser de bajo costo y fácil disponibilidad

Cuadro 2. Requisitos para la elección de sustrato. (64)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el caso de los conjugados a peroxidasa se utilizan varios sustratos como la fenilendiamina, la o-toluidina, el ácido 5-amino salicílico, el 3-amino-9 etil carbazol, la 4-amino-antipirina y el ácido 3-dimetilamino benzoico, entre otros; para los conjugados a fosfatasa alcalina uno de los sustratos adecuados es el nitrofenilfosfato.

Una vez establecido el equilibrio en el sistema, el desarrollo de color se mide espectrofotométricamente a una determinada longitud de onda . En el caso de no realizar la lectura inmediatamente, se adiciona una solución de paro que detiene la reacción y permite llevar a cabo la lectura en un período de tiempo más amplio (64).

2.11 Propiedades Generales de Inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas que elaboran los vertebrados al ser estimulados con un antígeno y que tienen la capacidad para reaccionar específicamente con el inductor, todas las inmunoglobulinas poseen una estructura común que consiste en dos cadenas polipeptídicas idénticas ligeras (L) (PM aproximado 23,000 Daltons) y dos cadenas polipeptídicas idénticas pesadas (H) (PM aproximado 55,000 a 70.000 Daltons) unidas por puentes disulfuro covalentes. Esto forma una estructura bilateralmente simétrica. Las cadenas H Y L tienen una región terminal-C constante y una región terminal-N variable. Ver figura 6.

Las regiones variables se relacionan con la unión al antígeno, en tanto que las constantes se ocupan de varias funciones biológicas, como es la activación del complemento y fijación a receptores de superficie (18, 33, 34, 64, 66). Las inmunoglobulinas se clasifican con base en su estructura primaria de sus cadenas pesadas. IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, estas difieren en tamaño, carga, composición de aminoácidos y carbohidratos, lo cual puede observarse en el cuadro 3.

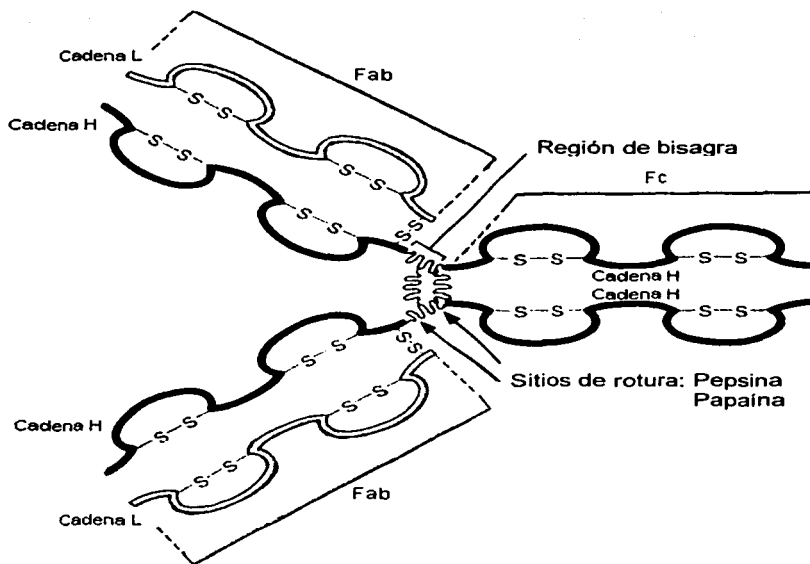


Figura 6. Modelo esquemático de una molécula de anticuerpo humano IgG1 que muestra la estructura básica de 4 cadenas y dominios. (18)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Clase de cadena H	γ	α	μ	δ	ϵ
Subclases de cadena H	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	$\alpha 1, \alpha 2$			
Tipo de cadena L	κ y λ	κ y λ	κ y λ	κ y λ	κ y λ
Fórmula molecular	$\gamma_2 L_2$	$\alpha_2 L_2$ ó ($\alpha_2 L_2$) CSJ	($\alpha_2 L_2$) J	$\delta_2 L_2$	$\epsilon_2 L_2$
Coefficiente de sedimentación (S)	6 a 7	7	19	7 a 8	8
Peso molecular (aproximado)	150 000	160 000 ó 400000	900000	180000	1900000
Movilidad electroforética (promedio)	γ	De γ rápida a β	De γ rápida a β	γ rápida	γ rápida
Fijación del complemento (clásica)	+	0	++++	0	0
Concentración en suero (aproximada mg/dL)	1000	200	120	3	0.05
Vida media en suero (días)	23	6	5	3	2
Paso a través de placenta	+	0	0	0	0
Desgranulación de células cebadas o basófilos	?	0	0	0	++++
Lisis bacteriana	+	+	+++	?	?
Actividad antiviral	+	+++	+	?	?

J - Cadena J

SC - Componente secretor para Ig secretora

Cuadro 3. Propiedades de las inmunoglobulinas humanas. (18)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.11.1 Inmunoglobulina G (IgG)

Esta comprende aproximadamente el 75% de las inmunoglobulinas séricas totales con un peso molecular aproximado de 150,000 Da. Se encuentra distribuida en el líquido extracelular y es la única inmunoglobulina capaz de atravesar la placenta en el humano, siendo la responsable de la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida. La IgG se fija al complemento a través de un receptor FC presente en la región constante de la cadena pesada, la IgG se fija a la superficie de las células y microbios, lo que permite que sean fagocitados o asesinados por células citotóxicas, además fija el complemento del suero y tiene participación en la citotoxicidad natural de células con receptores Fc. Existen cuatro subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, cada una de las cuales con comportamiento diferente ante el complemento.

2.11.2 Inmunoglobulina M (IgM)

Esta constituye aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas totales y presenta una estructura pentamérica, es decir esta formada por cinco unidades básicas idénticas, con un peso molecular alrededor de 900,000 Da. La IgM aparece frecuentemente en etapas tempranas en la respuesta inmune durante procesos infecciosos, también es la inmunoglobulina que se manifiesta sobre la superficie de las células B, en particular los linfocitos B, además es la mejor fijadora del complemento.

2.11.3 Inmunoglobulina A (IgA)

La IgA representa del 15 al 20% del total de las inmunoglobulinas del suero presenta un peso molecular de 400,000 Da para la IgA secretora y de 160,000 Da para la IgA sérica monomérica. En el humano más del 80 % se encuentra como monómero, pero en el suero de muchos mamíferos se presenta como polimérica, comúnmente como dímero. La IgA sérica es una unidad aislada de inmunoglobulina, en tanto que la IgA secretoria está constituida por dos unidades conectadas entre sí por una cadena J.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La IgA secretoria proporciona el mecanismo de defensa primaria contra las infecciones locales, ya que predomina en secreciones corporales como saliva, calostro, bilis, lagrimas y secreciones respiratorias e intestinales, su función especifica es la inactivar virus y desarrolla un importante papel en la prevención de las enfermedades alérgicas, al unirse con antígenos que normalmente se ingieren con los alimentos o penetran por vía aérea, como polvo, polen etc.

2.11.4 Inmunoglobulina D (IgD)

Es una unidad monómera con peso molecular es de 180,000 Da. Se encuentra en las superficies de los linfocitos B que también tienen IgM, pocas veces se secretan cantidades significativas en condiciones normales y sólo se hallan rastros de ella en la sangre. Es relativamente lábil a la degradación por calor.

2.11.5 Inmunoglobulina E (IgE)

La IgE esta presente en el suero en concentraciones muy bajas (aprox. 0.004%). Con peso molecular aproximado de 190,000 Da. Esta baja concentración se debe a que tan pronto como se produce en los plasmacell, su poder citofílico hace que se adhiera a la membrana celular de macrófagos, mastocitos y basófilos. Cuando el antígeno se pone en contacto con la IgE, la célula cebada o el basófilo liberan sustancias mediadoras inflamatorias que originan muchas de las manifestaciones agudas de las enfermedades alérgicas. La IgE participa en los trastornos alérgicos, los valores aumentados de IgE en el suero pueden ser señal de infestación por helmintos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La última encuesta realizada por el departamento de parasitología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (1992) sobre toxoplasmosis en México, encontró seroprevalencia del 32%, es decir, aproximadamente un tercio de la población se infecta (8). Datos recientes señalan que en México se reportan actualmente casos de toxoplasmosis en niños (26, 28, 29) y en pacientes inmunosuprimidos (23, 24), el costo-beneficio del diagnóstico oportuno de esta infección es positiva a la sociedad y evita el daño cerebral y/o la muerte.

Las pruebas más usadas para la detección de anticuerpos contra toxoplasma son inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta, fijación del complemento y pruebas inmunoenzimáticas (ELISA), esta última no se utiliza de forma rutinaria a pesar de las múltiples ventajas que ofrece, sólo algunos laboratorios la emplean debido a que el antígeno es muy inestable ya que es degradado por las proteasas que modifican los sitios activos, aún estableciendo las condiciones óptimas de trabajo los resultados de esta prueba varían considerablemente, por lo cual la técnica de inmunofluorescencia se sigue utilizando a pesar de ser elaborada y de alto costo.

La implementación de técnicas inmunoenzimáticas como la ELISA es una alternativa, cuya realización trae múltiples beneficios ya que es altamente sensible, específica, económica, de fácil elaboración, no requiere de personal capacitado para su lectura y la cantidad de muestras que se pueden procesar es mucho mayor en comparación con otras técnicas (7, 18).

Por consiguiente, es importante la evaluación de la técnica de ELISA con el antígeno estabilizado y de esta forma proporcionar a los laboratorios un método práctico que pueda sustituir a los utilizados actualmente, ya que la implementación de esta técnica representaría un ahorro significativo de tiempo y dinero, además de ser una técnica muy sensible y específica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Realizar un estudio comparativo entre las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoensayo ligado a enzima (ELISA), usando un antígeno estabilizado para la determinación de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*.

4.2 Objetivos particulares

- Obtención del antígeno de *Toxoplasma gondii* usando como fuente ratones CD1 infectados.
- Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* en sueros de pacientes sospechosos de toxoplasmosis mediante el método de inmunofluorescencia.
- Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* en sueros de pacientes sospechosos de toxoplasmosis por medio del método de ELISA.
- Comparar el nivel de anticuerpos de tipo IgG determinado por la técnica de inmunofluorescencia y ELISA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se espera que la estabilización del antígeno de *Toxoplasma gondii* proporcione a la técnica de ELISA una especificidad semejante a la obtenida en la técnica de inmunofluorescencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

6.1 Material

6.1.1 Material biológico

- Conjugado anti IgA-peroxidasa de rábano (Cappel 20 μ L)
- Conjugado anti IgG-peroxidasa de rábano (Cappel 20 μ L)
- Conjugado anti IgM-peroxidasa de rábano (Cappel 20 μ L)
- Conjugado antiinmunoglobulina de chivo con isotiocianato de fluoresceína
- Ratones CD1
- Suero humano
- *Toxoplasma gondii* (Cepa proporcionada por el departamento de parasitología del INDRE S.S.)

6.1.2 Reactivos

Ácido cítrico	Merck
Agua bidestilada	
Azul de Evans	Merck
Carbonato ácido de sodio	Sigma
Carbonato de sodio anhidro	Monterrey
Cloruro de potasio	Baker
Cloruro de sodio	Merck
Éter etílico	Baker
Formaldehído	Baker
Fosfato dibásico de sodio anhidro	Merck
Fosfato dibaásico de sodio dodecahidratado	Baker

Glicerol
Hidróxido de sodio
Leche descremada
Nitrógeno líquido
Ortodifenilamina
Ovoalbúmina
Peróxido de hidrógeno
Reactivo de Folin-Ciocalteau
Sulfato de cobre pentahidratado
Tartrato de sodio y potasio
Tween 20

Baker
Técnica Química
Svelty Nestle

Sigma
Merck
Monterrey
Sigma
Baker
Baker
Sigma

6.1.3 Material de laboratorio

Cámara húmeda
Celda para espectrofotómetro
Cubre objetos
Espátula de acero inoxidable
Gradilla
Matraz Erlenmeyer 125, 500 y 1000 mL
Matraz volumétrico de 50, 100 y 1000 mL
Mechero bunsen
Papel autoadherente
Papel parafilm
Pinzas de tres dedos
Pipeta de émbolo 10-100 μ L
Pipeta graduada 1,2,5 y 10 mL
Pipeta Pasteur
Pizeta 500 mL

Bausch & Lomb

Pyrex
Pirex

Kleen Pack
American company

Brand
Pyrex
Kimble

Placa de microtitulación 12.7 x 9.5 cm 129A	Costar
Porta objetos 2.5 x 7.5 cm	
Probeta 50, 100 y 1000 mL	Pyrex
Soporte universal	
Termómetro -10 a +260° C	Taylor
Tubo de ensaye 13 x 100 mm	Pyrex
Vaso de precipitado 50,100 y 500 mL	Pyrex

6.1.4 Equipo de laboratorio

Agitador vortex	Scientific Ind INC
Balanza analítica	Mettler H80
Baño de agua con temperatura controlada	Precision
Centrífuga	Solbat
Equipo de destilación 2000 mL	Pyrex
Equipo de disección	
Espectrofotómetro ELISA	Dynatech MR 250
Espectrofotómetro spectronic 20	Baush & Lomb
Incubadora	Riossa EC
Microscopio de fluorescencia	Karl Zeiss
Potenciómetro	Sargent Welch PBL
Refrigerador	Philips 127-VA

6.2 Métodos

- I. Obtención de antígeno de *Toxoplasma gondii*.
- II. Cuantificación de antígeno por el método de Lowry.
- III. Determinación de las concentraciones de antígeno por titulación por tablero de ajedrez.
- IV. Tratamiento de muestras.
- V. Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* en suero por el método de ELISA.
- VI. Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* en suero por el método de inmunofluorescencia indirecta.

I. Obtención del antígeno de *Toxoplasma gondii* (39)

1. Inyectar vía intraperitoneal 5 mL de solución salina isotónica estéril al 0.85% a un ratón previamente infectado (4 días antes) con *Toxoplasma gondii*.
2. Hacer un corte en el peritoneo, levantar con mucho cuidado y homogenizar con una pipeta Pasteur. Colectar la suspensión.
3. Se inoculan ratones CD1 por vía intraperitoneal con 0.1 mL de la suspensión anterior.
4. Después de 4 a 5 días se sacrifican los ratones obteniendo las células.
5. Incubar en una botella estéril a 37° C durante 20 minutos.
6. Centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto
7. Lavar 4 veces con PBS a 6000 rpm por 20 minutos.
8. Romper 10 veces por congelación con nitrógeno líquido y descongelación en baño de agua a 37° C.
9. Adicionar la formalina para obtener una concentración final de 0.1%.

La inmunización y obtención del antígeno se realizará en el bioterio y el laboratorio del departamento de parasitología del InDRE SS ya que el laboratorio 313 de la FES Zaragoza no cuenta con las condiciones adecuadas para su obtención.

II. Cuantificación de antígeno por el método de Lowry.

1. A 1 mL de la muestra agregar 3 mL del reactivo de Lowry, agitar y dejar reposar 10 minutos.
2. Adicionar 0.1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu, agitar y dejar reposar 30 minutos.
3. Leer la densidad óptica a 600 nm.

III. Determinación de concentraciones de antígeno por titulación

1. Colocar en una gradilla 7 tubos y etiquetarlos de la A a la G, hacer diluciones del antígeno a diferentes concentraciones con un volumen total de 1.5 mL de buffer de recubrimiento, mezclando bien cada tubo.
2. Colocar en los pozos de la fila A de la placa de microtitulación 100 μ L del tubo, hacer lo mismo con el resto de los tubos.
3. Dejar en cámara húmeda a 4° C durante 18 horas
4. Tirar el sobrenadante y bloquear con ovoalbúmina al 1% en PBS a 37° C durante 30 minutos.
5. Tirar el sobrenadante y lavar 5 veces con PBS-Tween dejando actuar un minuto la solución de lavado.
6. Colocar 11 tubos y etiquetarlos del 1 al 11, hacer diluciones del suero con PBS en un total de 1 mL.
7. Colocar 100 μ L del tubo 1 en los pozos de la columna 1, hacer lo mismo con el resto de los tubos (100 μ L del tubo 2 para los pozos de la columna 2 etc.). Incubar a 37° C durante una hora.
8. Lavar 5 veces con PBS-Tween igual que en el paso 5.
9. Adicionar 100 μ L del conjugado de peróxidasa de rábano. Incubar a 37° C por una hora.
10. Lavar 5 veces con PBS-Tween igual que en el paso 5.
11. Adicionar 100 μ L del sustrato e incubar a 37° C durante una hora.
12. Leer la densidad óptica a 490 nm.

IV. Tratamiento de muestras

1. Colocar el suero en tubos limpios y ponerlos en baño maría a 56° C durante 30 minutos.
2. Congelar las muestras a -20° C hasta su uso.

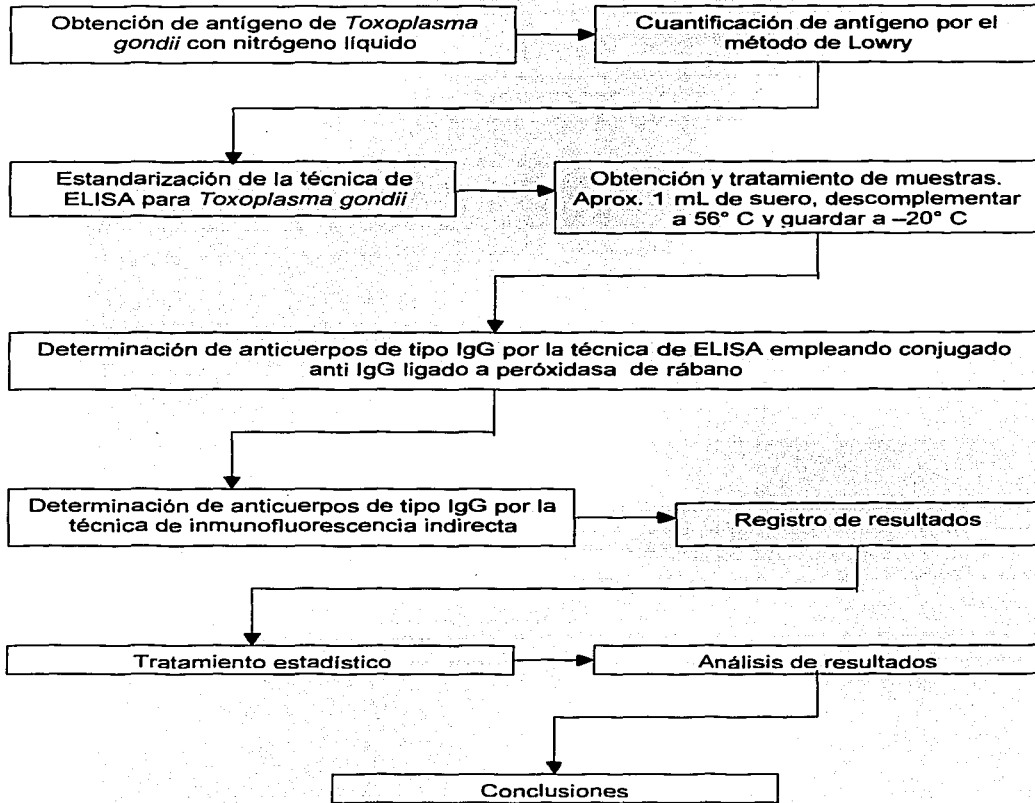
V. Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* en suero por el método de ELISA.

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

VI. Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* en suero por el método de inmunofluorescencia indirecta.

1. Ajustar una solución que contenga de 10 a 20 parásitos por campo en 40x
2. Colocar en cada campo del portaobjetos 10 μ L de la solución anterior y secar al aire
3. Se fija con acetona durante 5 minutos y se seca con una corriente de aire
4. Lavar 2 veces con PBS y una vez con agua destilada.
5. Preparar diluciones del suero control (positivo y negativo) así como de los sueros problema comenzando por la dilución 1:16 en PBS. De esta dilución se partirá para realizar diluciones seriadas (al doble).
6. Se colocan 10 μ L de la dilución apropiada en un campo del portaobjetos, colocar la laminilla en cámara húmeda a 37° C durante 30 minutos.
7. Lavar las laminillas como en el paso 4, secar con una corriente ligera de aire.
8. Cubrir los círculos de la laminilla con 10 μ L del conjugado, colocar en cámara húmeda a 37° C por 30 minutos.
9. Lavar como en el paso 4, dejar secar a temperatura ambiente.
10. Colocar en la laminilla una gota de glicerol y colocar un cubreobjetos.

6.3 Diagrama de Flujo



6.4 Tipo de Estudio

Observacional, prospectivo, transversal y descriptivo.

6.5 Población

La unidad de estudio consistió en sueros de pacientes sospechosos de toxoplasmosis, estos deben ser translúcidos y libres de contaminación, se conservan congelados a -70° C. Estos sueros son colectados por el InDRE a nivel nacional y son proporcionados por él mismo para el presente estudio. Durante la realización de la parte experimental los sueros se conservan en el congelador de de los laboratorios de investigación de la FES Zaragoza y posteriormente son devueltos al InDRE.

6.6 Criterios

6.6.1 Inclusión

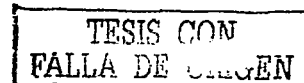
Se trabajará con muestras que contengan como mínimo 1.0 mL de suero, que se encuentren perfectamente rotuladas, selladas, que no presenten contaminación, hemólisis o que estén lipémicas.

6.6.2 Exclusión

Las muestras que contengan menos de 1.0 mL de suero, que no estén rotuladas, que presenten salpicaduras, hemólisis, turbidez o lipémicas serán excluidas.

6.6.3 Eliminación

Se eliminarán todas aquellas muestras que durante la fase experimental se contaminen.



6.7 Variables

Como variable dependiente la concentración de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* que se cuantifique en los sueros de los pacientes. Como variables independientes la concentración de antígeno, los conjugados anti IgGs-peroxidasa de rábano, temperatura equipo y reactivos utilizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. RESULTADOS

- El antígeno de *Toxoplasma gondii* se cuantificó por el método de Lowry obteniéndose una concentración de 349 µg/mL para su uso posterior en la determinación de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* por método de ELISA.
- Se realizó la estandarización de la técnica de ELISA con el antígeno de *Toxoplasma gondii* encontrándose una concentración óptima de 3.5 µg/ml.
- En la estandarización de la técnica de ELISA se encontró una dilución óptima para los conjugados de 1:1000 para anti IgG y anti IgM, y 1:500 para anti IgA.
- Se determinó el título de anticuerpos de tipo IgG específicos a *Toxoplasma gondii* en suero por el método de ELISA y por inmunofluorescencia indirecta, encontrándose los resultados en la tabla 1.
- También se cuantificó la concentración de anticuerpos de tipo IgA e IgM específicos a *Toxoplasma gondii* en suero por medio de la técnica de ELISA obteniendo los resultados que se pueden observar en la tabla 1.
- Se realizó un análisis de regresión múltiple con el programa estadístico SPSS 10.0 for windows utilizando los datos de la tabla 2, y en la tabla 3 se muestra la correlación obtenida entre las variables.
- Cuando se mantiene constante la concentración de anticuerpos de tipo IgG determinado por el método de inmunofluorescencia indirecto (IFI) y como variable independiente la concentración de anticuerpos de tipo IgG obtenido por el método de ELISA se encontró que hay relación entre dichas variables.

- De manera similar cuando se determinaron anticuerpos por el método de ELISA manteniendo constante la concentración de los anticuerpos de tipo IgA y como variable independiente la concentración de los anticuerpos de tipo IgG se encontró que hay relación entre dichas variables.
- Cuando se realizó el cruce entre los títulos de anticuerpos restantes [(IgA/IgG-IFI), (IgM/IgG-IFI), (IgG-ELISA/IgM), (IgM/IgA)] se observó que no existe relación entre dichas variables.
- La gráfica 1 muestra las medias de las absorbancias de los anticuerpos IgA, IgM e IgG obtenidos por el método de ELISA.
- En las tablas de la 5 a la 15 se muestran los valores de las absorbancias obtenidas por el método de ELISA para IgA, IgM e IgG, cuando el título de anticuerpos IgG obtenidos por el método de inmunofluorescencia va en aumento, lo cual se puede observar en las gráficas de la 2 a la 12.
- La tabla 16 resume las medias de las absorbancias de los anticuerpos IgA, IgM e IgG obtenidos por el método de ELISA cuando el título de anticuerpos IgG por inmunofluorescencia indirecta se incrementa, lo cual se muestra en la gráfica 13.

Tabla 1. Absorbancias y diluciones obtenidas en la determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* por medio de ELISA e inmunofluorescencia respectivamente.

No. de muestra	ELISA			IFI
	IgG (nm)	IgM (nm)	IgA (nm)	IgG (dilución)
1	0	0.082	0	NEG
2	1.709	0.937	0.273	1:512
3	0.186	0	0	1:8
4	2	0.038	0.343	1:512
5	0.629	1.309	0.074	1:8
6	1.072	0.235	0.228	1:256
7	0.764	0.631	0.004	1:512
8	0.991	0.858	0.422	1:32
9	0.637	0.397	0.035	NEG
10	0.742	0.683	0.067	1:64
11	0.383	0.375	0.139	1:8
12	0.769	0.792	0.108	NEG
13	0.263	0.299	0	NEG
14	1.387	0.587	0.193	1:512
15	0.524	0.526	0.185	1:32
16	2	0.246	0.252	1:16000
17	0	0	0	NEG
18	0.596	0.256	0.374	NEG
19	1.206	0.454	0.169	1:512
20	0.379	0.602	0.033	NEG
21	0.640	0.404	0.207	1:64
22	0.382	0.634	0.345	1:1024
23	1.147	0.424	0.186	NEG
24	1.067	0.455	0.155	1:256
25	0	0	0	NEG
26	0.539	0.153	0.142	NEG
27	1.430	0.575	0.181	1:1024
28	1.051	0.841	0.138	1:265
29	1.925	1.118	0.138	1:8
30	1.783	0.239	0.087	1:2048
31	1.952	0.268	0.342	1:8

Continúa en la siguiente página

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

32	0.468	0.523	0.141	NEG
33	0.655	0.983	0.198	NEG
34	1.418	0.792	0.091	1:256
35	0.804	1.310	0.197	NEG
36	1.386	0.291	0.786	1:2048
37	0.992	0.54	0.127	1:256
38	0.858	0.846	0.831	1:8
39	2	0.922	0.731	1:64
40	0.757	0.772	0	1:32
41	1.020	0.290	0	1:128
42	0.766	0.607	0.124	NEG
43	0.359	0.313	0	NEG
44	1.222	0.240	0	1:128
45	0.282	0.109	0.091	1:32
46	1.206	0.864	0.555	NEG
47	1.441	0.281	0.038	1:1024
48	0.482	0.372	0.234	1:16
49	1.958	0.202	0.433	1:128
50	1.742	0.199	1.219	1:32
51	0.488	0.588	0.297	1:16
52	0.982	0	0.122	1:16
53	0.517	0.726	0.064	1:32
54	0.657	0.671	0.141	1:64
55	0.638	0.279	0.051	1:64
56	0.841	0.499	0.128	1:64
57	0.620	0.086	0.407	1:128
58	0.967	0.454	0.300	1:512
59	1.234	0.541	0.260	1:512
60	1.689	0.592	0.276	1:1024
61	1.198	0.279	0.157	1:32
62	0.444	0.294	0.302	NEG
63	1.052	0.883	0.121	1:64
64	1.219	0.601	0.200	1:512
65	1.161	0.544	0.152	1:16
66	0.625	0.380	0.137	1:64
67	0.865	0.603	0.235	1:512
68	1.149	0.370	0.181	1:256

Continúa en la siguiente página

69	0.339	0.576	0.143	NEG
70	1.334	0.424	0.071	1:64
71	1.678	0.978	0.361	1:512
72	0.762	0.844	0.111	NEG
73	1.100	0.155	0.051	1:16
74	1.189	0.586	0.052	1:256
75	0.611	0.460	0.227	NEG
76	2	0.888	0.645	1:64
77	0.677	0.693	0	1:32
78	0.862	0.235	0.038	1:128
79	0.956	0.591	0.149	NEG
80	0.567	0.378	0.047	NEG
81	0.276	0.220	0.012	1:128
82	0.579	0.213	0.217	1:32
83	1.604	1.103	0.620	NEG
84	1.557	0.376	0.356	1:1024
85	0.678	0.525	0.721	1:16
86	1.812	0.216	0.856	1:128
87	2	0.314	1.153	1:32
88	1.231	1.019	1.103	1:16
89	1.044	0.093	0.076	1:16
90	0.790	0.775	0.140	1:32
91	1.034	0.757	0.329	1:64
92	0.834	0.314	0.148	1:64
93	0.882	0.547	0.394	1:64
94	1.185	0.169	0.997	1:128
95	1.420	0.706	0.584	1:512

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Absorbancias obtenidas en la determinación de anticuerpos de tipo IgA, IgM e IgG contra *Toxoplasma gondii* y el inverso de la dilución obtenida por IFI.

No. de muestra	ELISA			IFI
	IgG (nm)	IgM (nm)	IgA (nm)	Inverso IgG
1	0	0.082	0	0
2	1.709	0.937	0.273	512
3	0.186	0	0	8
4	2	0.038	0.343	512
5	0.629	1.309	0.074	8
6	1.072	0.235	0.228	256
7	0.764	0.631	0.004	512
8	0.991	0.858	0.422	32
9	0.637	0.397	0.035	0
10	0.742	0.683	0.067	64
11	0.383	0.375	0.139	8
12	0.769	0.792	0.108	0
13	0.263	0.299	0	0
14	1.387	0.587	0.193	512
15	0.524	0.526	0.185	32
16	2	0.246	0.252	16000
17	0	0	0	0
18	0.596	0.256	0.374	0
19	1.206	0.454	0.169	512
20	0.379	0.602	0.033	0
21	0.640	0.404	0.207	64
22	0.382	0.634	0.345	1024
23	1.147	0.424	0.186	0
24	1.067	0.455	0.155	256
25	0	0	0	0
26	0.539	0.153	0.142	0
27	1.430	0.575	0.181	1024
28	1.051	0.841	0.138	265
29	1.925	1.118	0.138	8
30	1.783	0.239	0.087	2048

Continúa en la siguiente página

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

31	1.952	0.268	0.342	8
32	0.468	0.523	0.141	0
33	0.655	0.983	0.198	0
34	1.418	0.792	0.091	256
35	0.804	1.310	0.197	0
36	1.386	0.291	0.786	2048
37	0.992	0.54	0.127	256
38	0.858	0.846	0.831	8
39	2	0.922	0.731	64
40	0.757	0.772	0	32
41	1.020	0.290	0	128
42	0.766	0.607	0.124	0
43	0.359	0.313	0	0
44	1.222	0.240	0	128
45	0.282	0.109	0.091	32
46	1.206	0.864	0.555	0
47	1.441	0.281	0.038	1024
48	0.482	0.372	0.234	16
49	1.958	0.202	0.433	128
50	1.742	0.199	1.219	32
51	0.488	0.588	0.297	16
52	0.982	0	0.122	16
53	0.517	0.726	0.064	32
54	0.657	0.671	0.141	64
55	0.638	0.279	0.051	64
56	0.841	0.499	0.128	64
57	0.620	0.086	0.407	128
58	0.967	0.454	0.300	512
59	1.234	0.541	0.260	512
60	1.689	0.592	0.276	1024
61	1.198	0.279	0.157	32
62	0.444	0.294	0.302	0
63	1.052	0.883	0.121	64
64	1.219	0.601	0.200	512
65	1.161	0.544	0.152	16
66	0.625	0.380	0.137	64
67	0.865	0.603	0.235	512

Continúa en la siguiente página

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

68	1.149	0.370	0.181	256
69	0.339	0.576	0.143	0
70	1.334	0.424	0.071	64
71	1.678	0.978	0.361	512
72	0.762	0.844	0.111	0
73	1.100	0.155	0.051	16
74	1.189	0.586	0.052	256
75	0.611	0.460	0.227	0
76	2	0.888	0.645	64
77	0.677	0.693	0	32
78	0.862	0.235	0.038	128
79	0.956	0.591	0.149	0
80	0.567	0.378	0.047	0
81	0.276	0.220	0.012	128
82	0.579	0.213	0.217	32
83	1.604	1.103	0.620	0
84	1.557	0.376	0.356	1024
85	0.678	0.525	0.721	16
86	1.812	0.216	0.856	128
87	2	0.314	1.153	32
88	1.231	1.019	1.103	16
89	1.044	0.093	0.076	16
90	0.790	0.775	0.140	32
91	1.034	0.757	0.329	64
92	0.834	0.314	0.148	64
93	0.882	0.547	0.394	64
94	1.185	0.169	0.997	128
95	1.420	0.706	0.584	512

Tabla 3. Correlación de los datos con una probabilidad de 0.05

	IFI	IgA	IgG	IgM
IFI	1.000	0.021	0.351	-0.126
IgA	0.021	1.000	0.519	0.197
IgG	0.351	0.519	1.000	0.173
IgM	-0.126	0.197	0.173	1.000

Análisis de regresión múltiple (67, 68)

El análisis de regresión múltiple es una generalización directa de la regresión simple a dos o más variables independientes y se representa por la siguiente ecuación:

$$Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + \dots + b_k X_k$$

Donde :

X_1	primera variable independiente
b_1	primer coeficiente de regresión asociado a ella
X_2	segunda variable independiente
b_2	segundo coeficiente de regresión asociado a ella
X_3	tercera variable independiente
b_3	tercer coeficiente de regresión asociado a ella
X_k	k variable independiente
b_k	k coeficiente de regresión asociado a ella
a	ordenada al origen

Los resultados se procesaron utilizando un programa estadístico llamado SPSS 10.0 para windows, donde se aplicó una regresión múltiple a los datos obtenidos (tabla 2).

Variables consideradas:

- Independientes (X): Título de anticuerpo IgG obtenido por IFI
Título de anticuerpos IgM e IgA obtenido por ELISA
- Dependientes (Y): Título de anticuerpos IgG, IgM e IgA obtenidos por ELISA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Criterios considerados:

- Ho: No existe relación alguna entre las variables, es decir, la correlación es de cero; $r=0$
- Ha: Existe una relación entre las variables, es decir la correlación no es cero

Donde: $\alpha = 0.05$ y $GL = 95 - 2 = 93$

$t_{tablas} = 1.98$ (95% de confianza)

$t_{tablas} > t_{calculada}$ Se acepta Ho

$t_{tablas} < t_{calculada}$ Se rechaza Ha

Regresión múltiple y correlación

1. Variable dependiente: Concentración de anticuerpos IgG obtenido por ELISA (IgG-ELISA)
Constante: Concentración de anticuerpos IgG obtenido por IFI (IgG-IFI)

R múltiple	0.35129
R cuadrada	0.12341
t calculada	3.618
$t_{tablas} < t_{calculada}$	Si hay relación entre variables

2. Variable dependiente: Concentración de anticuerpos IgA obtenido por ELISA
Constante: Concentración de anticuerpos IgG obtenido por IFI (IgG-IFI)

R múltiple	0.02075
R cuadrada	0.00043
t calculada	0.20000
$t_{tablas} > t_{calculada}$	No hay relación entre variables

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Variable dependiente: Concentración de anticuerpos IgM obtenidos por ELISA
 Constante: Concentración de anticuerpos IgG obtenido por IFI (IgG-IFI)

R múltiple	0.12593
R cuadrada	0.01586
t calculada	-1.224
t tablas > t calculada	No hay relación entre variables

4. Variable dependiente: Concentración de anticuerpo IgG obtenidos por ELISA (IgG-ELISA)
 Constante: Concentración de anticuerpos IgM obtenidos por ELISA

R múltiple	0.17278
R cuadrada	0.02850
t calculada	1.692
t tablas > t calculada	No hay relación entre variables

5. Variable dependiente: Concentración de anticuerpo IgG obtenidos por ELISA (IgG-ELISA)
 Constante: Concentración de anticuerpos IgA obtenidos por ELISA

R múltiple	0.51889
R cuadrada	0.26925
t calculada	5.854
t tablas < t calculada	Si hay relación entre variables

6. Variable dependiente: Concentración de anticuerpos IgM obtenidos por ELISA
 Constante: Concentración de anticuerpos IgA obtenido por ELISA

R múltiple	0.19730
R cuadrada	0.03893
t calculada	1.941
t tablas > t calculada	No hay relación entre variables

Tabla 4. Parámetros descriptivos de las muestras.

Variable	Media	Desviación	No. Muestras
IgG	1.00	0.51	95
IgM	0.50	0.30	95
IgA	0.26	0.28	95

Tabla 5. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 0

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	0	0.082	0
2	0.637	0.397	0.035
3	0.769	0.792	0.108
4	0.263	0.299	0
5	0	0	0
6	0.596	0.256	0.374
7	0.379	0.602	0.033
8	1.147	0.424	0.186
9	0	0	0
10	0.539	0.153	0.142
11	0.468	0.523	0.141
12	0.655	0.983	0.198
13	0.804	1.31	0.197
14	0.766	0.607	0.124
15	0.359	0.313	0
16	1.206	0.864	0.555
17	0.444	0.294	0.302
18	0.339	0.576	0.143
19	0.762	0.844	0.111
20	0.611	0.46	0.227
21	0.956	0.591	0.149
22	0.567	0.378	0.047
23	1.604	1.103	0.62
Media	0.603	0.515	0.161

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:8

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	0.186	0	0
2	0.629	1.309	0.074
3	0.383	0.375	0.139
4	1.925	1.118	0.138
5	0.858	0.846	0.831
6	1.952	0.268	0.342
Media	0.989	0.653	0.254

Tabla 7. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:16

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	0.482	0.372	0.234
2	0.488	0.588	0.297
3	0.982	0	0.122
4	0.678	0.525	0.721
5	1.231	1.019	1.103
6	1.044	0.093	0.076
7	1.1	0.155	0.051
8	1.161	0.544	0.152
Media	0.896	0.412	0.345

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:32

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	0.991	0.858	0.422
2	0.524	0.526	0.185
3	0.757	0.772	0
4	0.282	0.109	0.091
5	1.742	0.199	1.219
6	0.517	0.726	0.064
7	1.198	0.279	0.157
8	0.677	0.693	0
9	0.579	0.213	0.217
10	2	0.314	1.153
11	0.79	0.775	0.14
Media	0.914	0.497	0.332

Tabla 9. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:64

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	0.742	0.683	0.067
2	0.64	0.404	0.207
3	2	0.922	0.731
4	0.657	0.671	0.141
5	0.638	0.279	0.051
6	0.841	0.499	0.128
7	1.052	0.883	0.121
8	0.625	0.38	0.137
9	1.334	0.424	0.071
10	2	0.888	0.645
11	1.034	0.757	0.329
12	0.834	0.314	0.148
13	0.882	0.547	0.394
Media	1.021	0.589	0.244

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 10. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:128

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	1.02	0.29	0
2	1.222	0.24	0
3	1.958	0.202	0.433
4	0.62	0.086	0.407
5	0.862	0.235	0.038
6	1.276	0.22	0.012
7	1.812	0.216	0.856
8	1.185	0.169	0.997
Media	1.244	0.207	0.343

Tabla 11. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:256

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	1.072	0.235	0.228
2	1.067	0.455	0.155
3	1.051	0.841	0.138
4	1.418	0.792	0.091
5	0.992	0.54	0.127
6	1.149	0.37	0.181
7	1.189	0.586	0.052
Media	1.134	0.546	0.139

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 12. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:512

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	1.709	0.937	0.273
2	2	0.038	0.343
3	0.764	0.631	0.004
4	1.387	0.587	0.193
5	1.206	0.454	0.169
6	0.967	0.454	0.3
7	1.234	0.541	0.26
8	1.219	0.601	0.2
9	0.865	0.603	0.235
10	1.678	0.978	0.361
11	1.42	0.706	0.584
Media	1.314	0.594	0.266

Tabla 13. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:1026

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	1.382	0.634	0.345
2	1.43	0.575	0.181
3	1.441	0.281	0.038
4	1.689	0.592	0.276
5	1.557	0.376	0.356
Media	1.500	0.492	0.239

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 14. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:2048

No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	1.783	0.239	0.087
2	1.386	0.291	0.786
Media	1.585	0.265	0.437

Tabla 15. Absorbancias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* cuando IFI = 1:16000

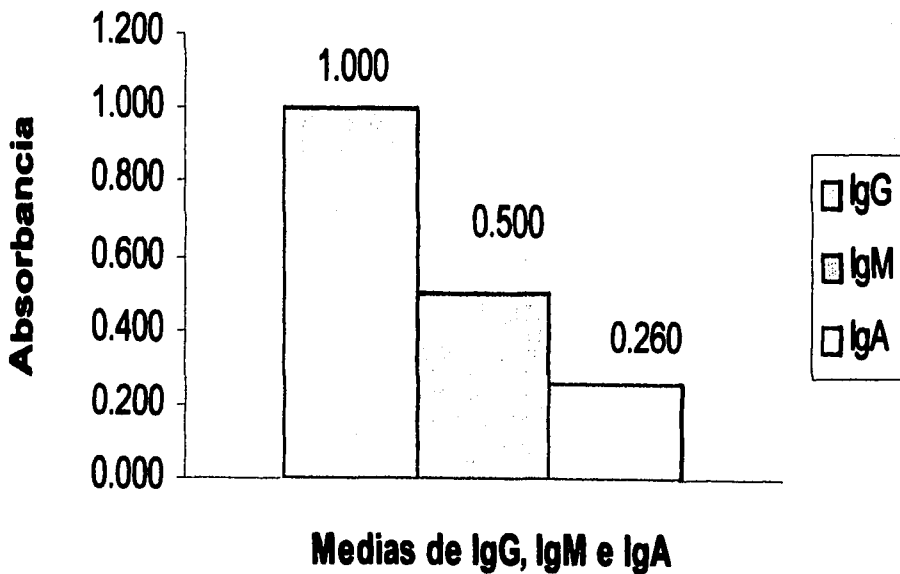
No. Datos	IgG	IgM	IgA
1	2	0.246	0.252
Media	2.000	0.246	0.252

Tabla 16. Medias de las absorbancias de los anticuerpos cuando IFI aumenta.

	IFI 0	IFI 1:8	IFI 1:16	IFI 1:32	IFI 1:64	IFI 1:128	IFI 1:256	IFI 1:512	IFI 1:1026	IFI 1:2048	IFI 1:16000
IgM	0.515	0.653	0.412	0.497	0.589	0.207	0.546	0.594	0.492	0.265	0.246
IgG	0.603	0.989	0.896	0.914	1.021	1.244	1.134	1.314	1.5	1.585	2.0
IgA	0.161	0.254	0.345	0.332	0.244	0.343	0.139	0.266	0.239	0.437	0.252

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

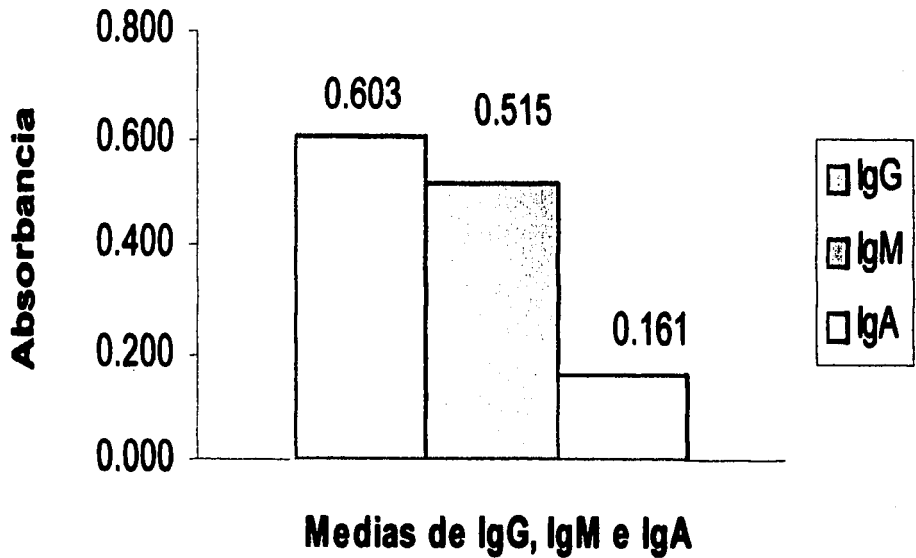
Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* utilizando ELISA



TEMAS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 1

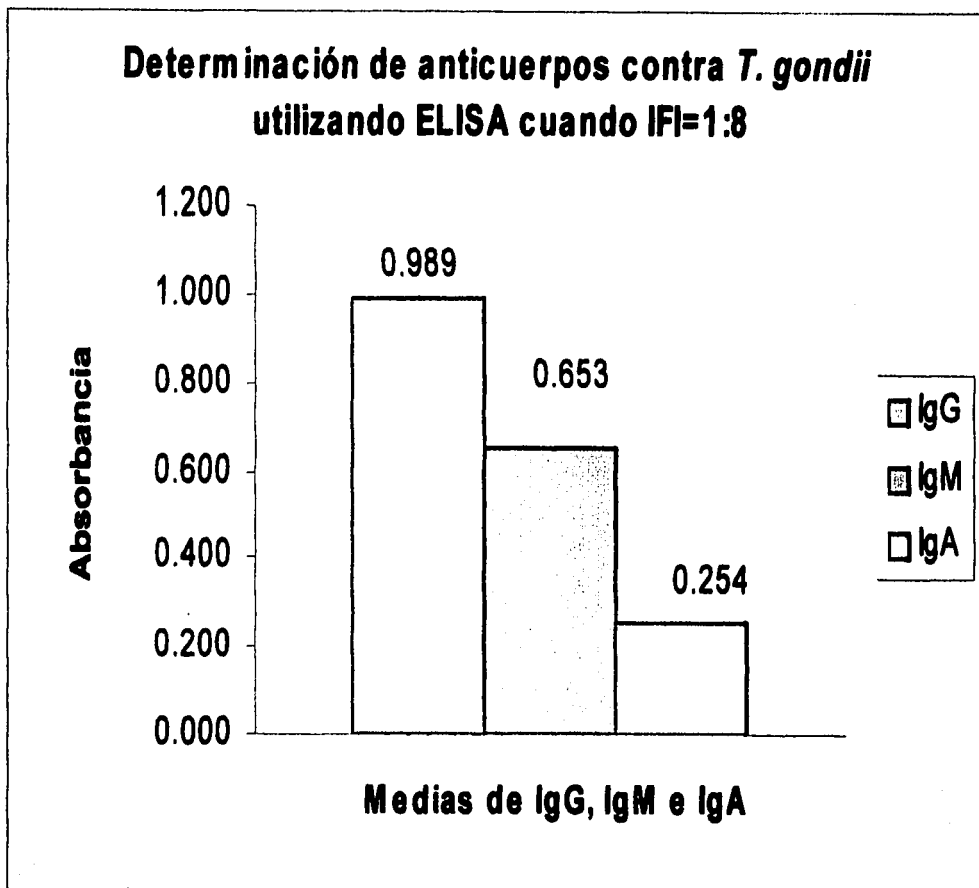
**Determinación de anticuerpos contra *T. gondii*
utilizando ELISA cuando IFI = 0**



Medias de IgG, IgM e IgA

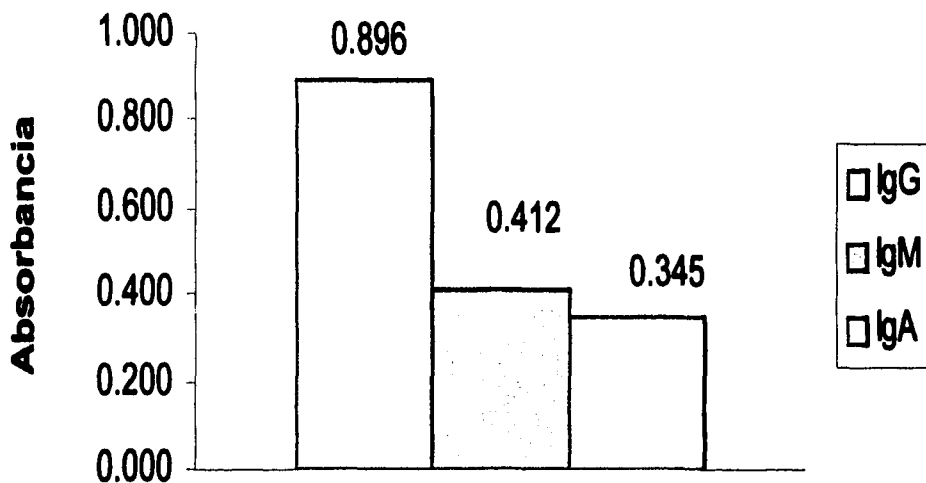
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

59



Gráfica 3

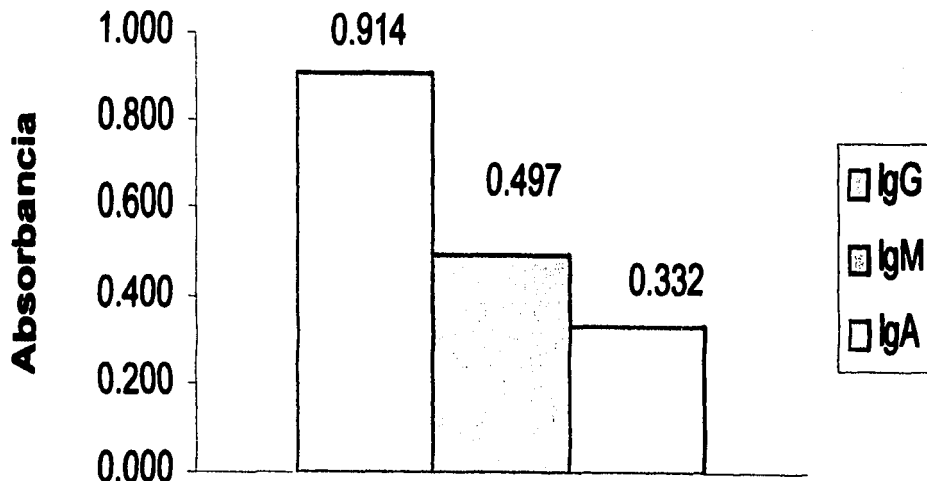
Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* utilizando ELISA cuando IF=1:16



Medias de IgG, IgM e IgA

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* utilizando ELISA cuando IFI = 1:32

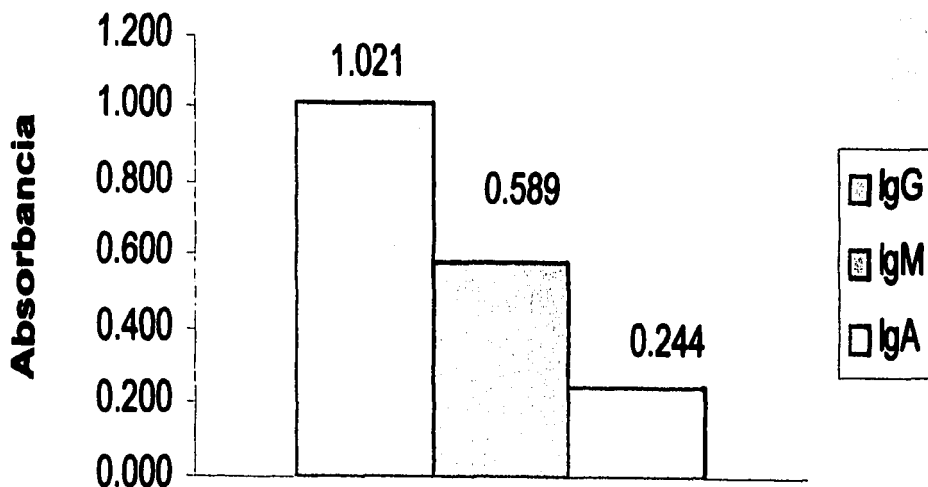


Medias de IgG, IgM e IgA

TESIS CON
PALESTRA ORIGEN

Gráfica 5

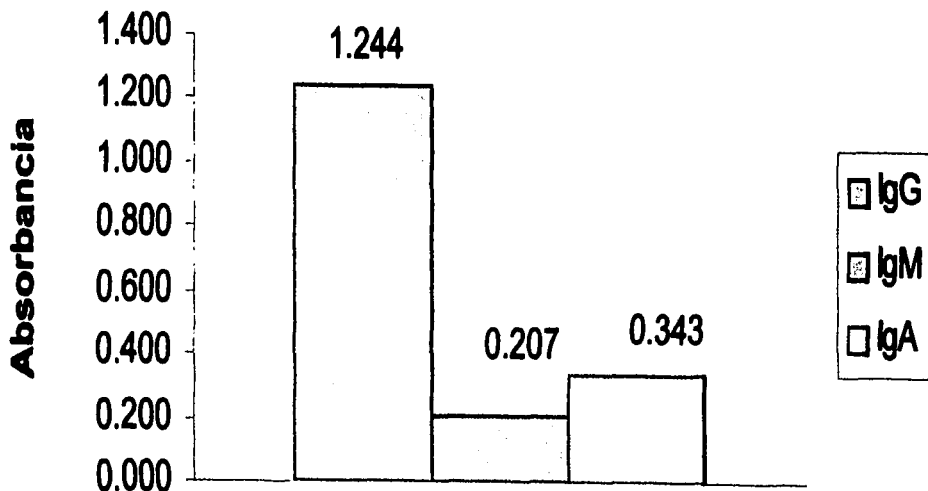
Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* utilizando ELISA cuando IFI = 1:64



Medias de IgG, IgM e IgA

INSTITUCION
FACULTAD DE ORIGEN

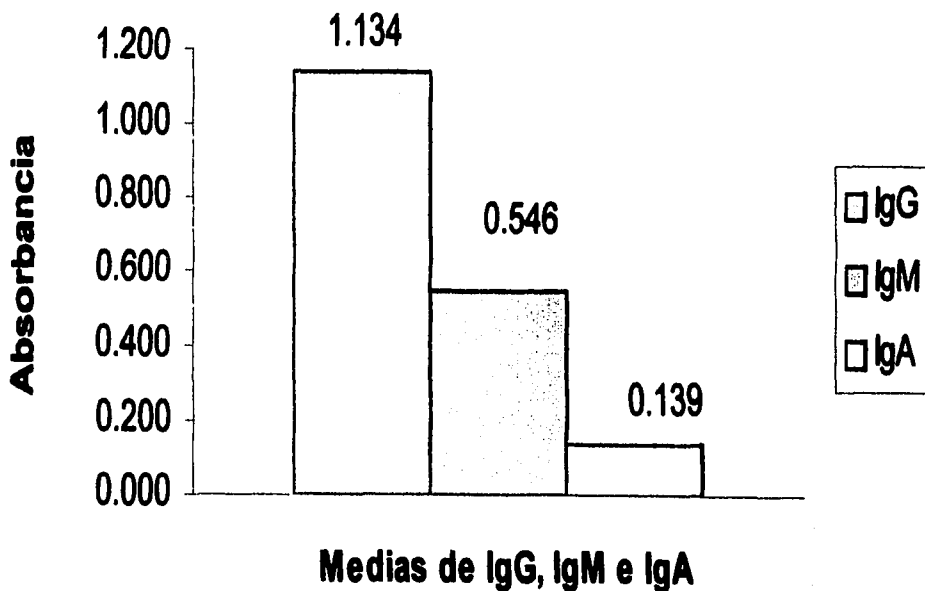
Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* utilizando ELISA cuando IFI=1:128



Medias de IgG, IgM e IgA

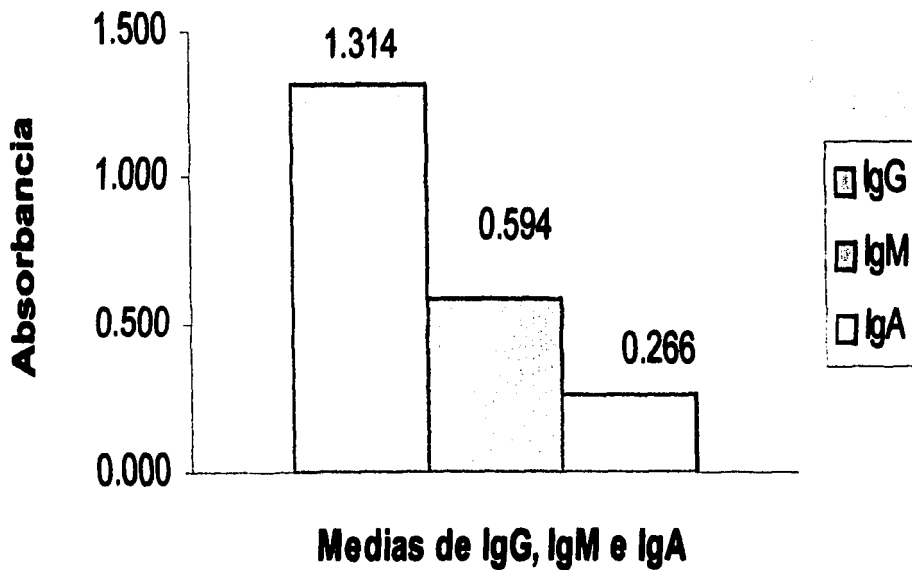
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Determinación de anticuerpos contra *T. gondii*
utilizando ELISA cuando IF = 1:256**



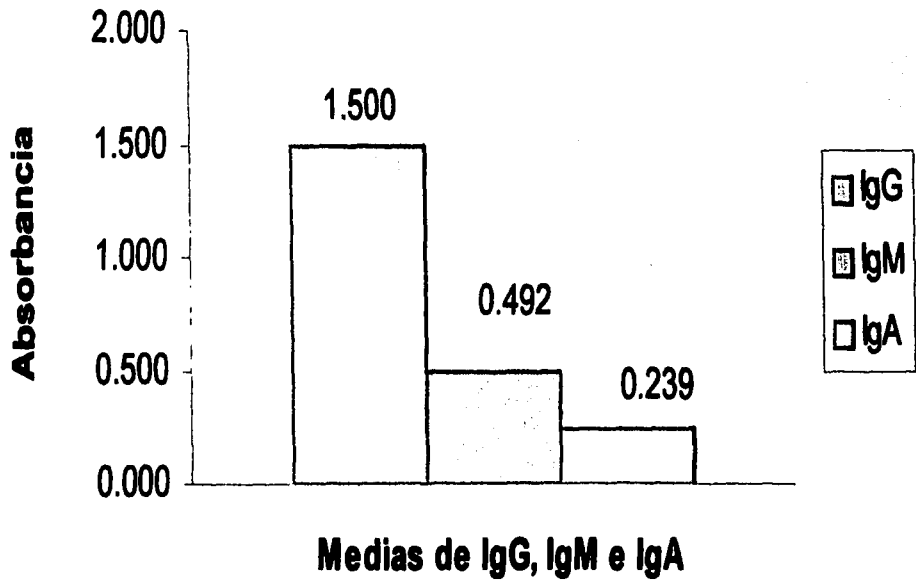
FALLA DE ORIGEN

**Determinación de anticuerpos contra *T. gondii*
utilizando ELISA cuando IFI = 1:512**



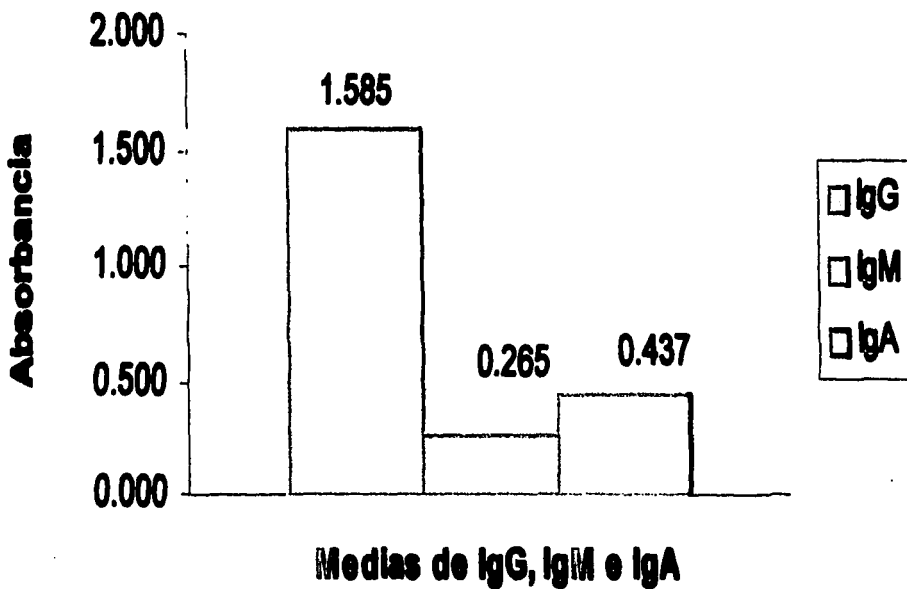
CON
ORIGEN

**Determinación de anticuerpos contra *T. gondii*
utilizando ELISA cuando IF = 1:1024**



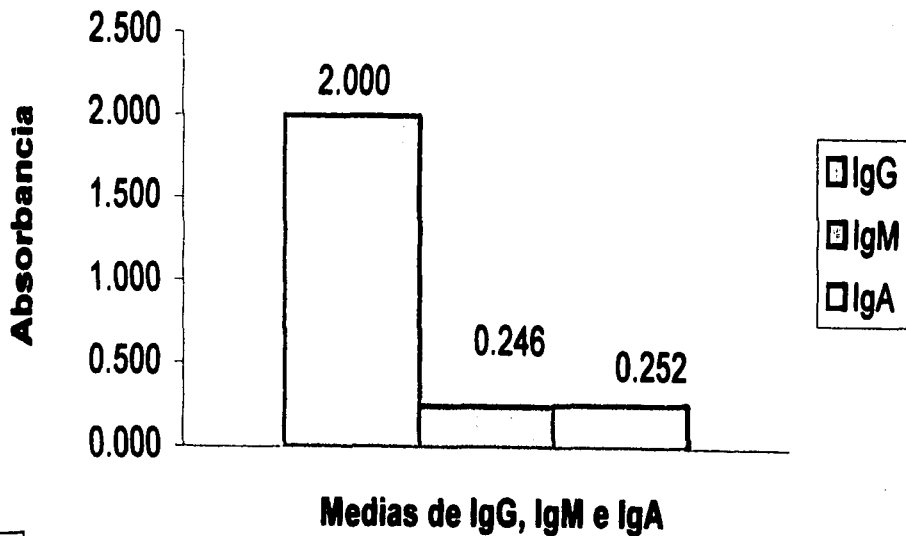
ESTADO CON
FALTA DE ORIGEN

Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* utilizando ELISA cuando IFI = 1:2048

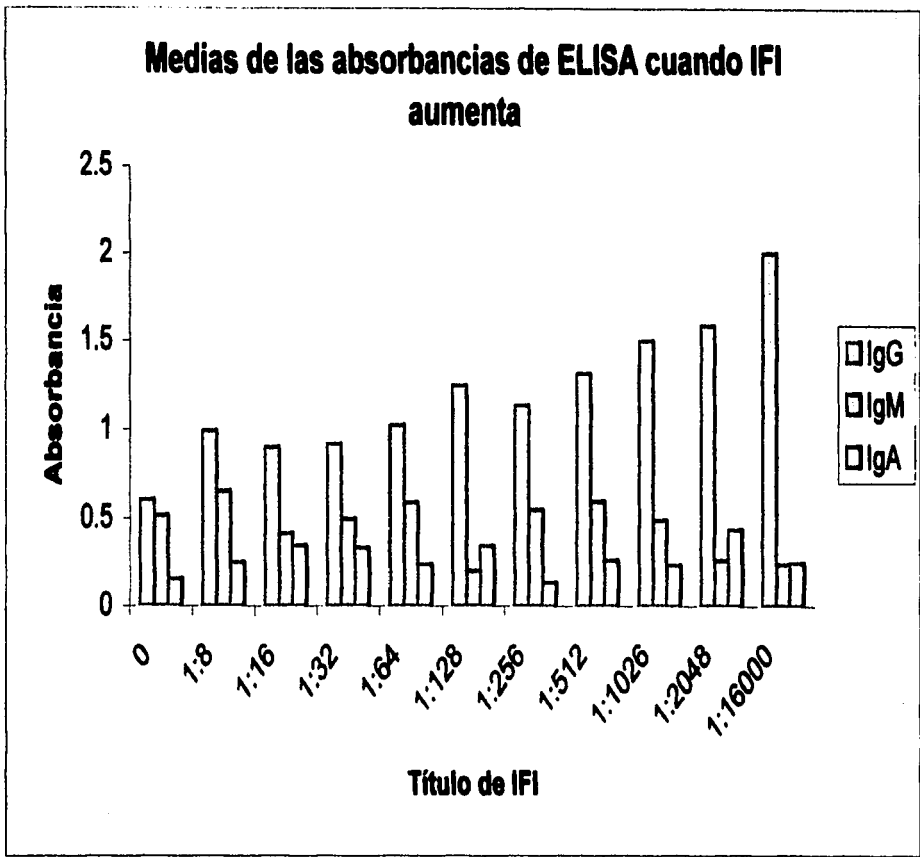


INSTITUCION
FALLA DE ORIGEN

Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* utilizando ELISA cuando IFI=1:16000



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



TESTS CON
 FALLA DE CIGEN

TESTS CON
 FALLA DE CIGEN

Gráfica 13

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La estabilización del antígeno para la técnica de ELISA y su posterior evaluación con la técnica de inmunofluorescencia, donde se determinó el título de anticuerpos IgG mostró que existe relación entre dichas variables.

Este resultado se apreció mejor cuando se relacionaron las medias de la IgG determinada por ambos métodos (ELISA e IFI), observándose que a títulos elevados por IFI corresponde un aumento en las medias de IgG obtenida por ELISA, sin embargo el análisis de correlación mostró una $R=0.351$, que indica una correlación muy pobre. Esto puede deberse a que en ambos ensayos se están determinando anticuerpos contra la superficie del parásito, es decir, se usa el parásito completo.

En la respuesta de IgM contra Toxoplasma determinada por ELISA se observó que las medias disminuyen conforme aumenta el título de positividad en la prueba de IFI. Esta respuesta es de tipo primario y la vida media de esta inmunoglobulina es corta; los títulos elevados de IgG por IFI nos sugieren un tiempo prolongado de infección por el parásito y es de esperarse que los valores de IgM se encuentren muy bajos.

La correlación mostrada cuando se determinaron anticuerpos IgG por IFI e IgA por ELISA fue muy mala ($R=-0.126$) debido a que ambas técnicas determinan respuesta de anticuerpos contra diferentes antígenos, sería conveniente que se relacionara cada una de las técnicas con el cuadro clínico y con la evolución de la enfermedad, para determinar cuál o cuáles de estas técnicas son las más adecuadas en el diagnóstico de la enfermedad, dependiendo de la evolución de ésta en el paciente.

En cuanto a las muestras sería conveniente contar con datos más precisos tales como la edad, el sexo y la procedencia lo cual podría ser útil en la creación de vínculos que ayude a una mejor relación entre las variables.

9. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica de ELISA para *Toxoplasma gondii* con un antígeno estabilizado.
- Se determinó el nivel de anticuerpos IgG en sueros de pacientes sospechosos de toxoplasmosis por el método de indirecto de ELISA y se comparó con las determinaciones de anticuerpos IgG por la técnica de inmunofluorescencia encontrándose que existe relación en la población estudiada, posiblemente por el uso de antígenos de superficie.
- Se determinó el nivel de anticuerpos de tipo IgM en los mismos sueros por el método de ELISA indirecto y se comparó con las determinaciones de anticuerpos IgG por la técnica de inmunofluorescencia encontrándose que no existe ninguna relación entre dichas variables.
- La respuesta de IgM contra toxoplasma disminuye conforme aumenta el título de IFI indicando una infección pasada, lo cual justifica concentraciones bajas de IgM en la determinación.
- Cuando se correlacionaron las variables restantes [(IgA/IgG-IFI), (IgM/IgG-IFI), (IgG-ELISA/IgM), (IgM/IgA)] se determinó que no existe ninguna relación entre dichas variables.
- Ya que la relación encontrada en la determinación de IgG por ambos métodos fue muy baja, por el momento no se recomienda sustituir la metodología de ELISA por el de IFI, sin embargo, es conveniente que los estudios acerca de ambas técnicas sigan llevándose a cabo donde puedan controlarse los parámetros de concentración, temperatura, lavados, obtención de antígeno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Estudios posteriores pueden traer múltiples beneficios ya que al establecer las condiciones adecuadas de trabajo, se puede implementar la técnica de ELISA en casi cualquier laboratorio, con las ventajas de ser una técnica muy sensible, económica y de fácil elaboración.
- La finalidad de proseguir estos estudios es brindar un diagnóstico y tratamiento oportuno a los pacientes y de ésta manera evitar daños irreversibles en la población; además sería conveniente proponerlo como prueba diagnóstico obligatoria en mujeres en etapa reproductiva ya que la infección por toxoplasma no produce sintomatología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 1

Abreviaturas

• μg	Microgramos
• μL	Microlitros
• Da	Dalton
• EIA	Ensayo Inmunoenzimático
• ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima
• ESA	Antígenos Excretados y Secretados
• GRA	Proteína de Granulos Densos
• IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
• IgA	Inmunoglobulina A
• IgD	Inmunoglobulina D
• IgE	Inmunoglobulina E
• IgG	Inmunoglobulina G
• IgG-ELISA	Anticuerpos IgG determinados por ELISA
• IgG-IFI	Anticuerpos IgG determinados por inmunofluorescencia indirecta
• IgM	Inmunoglobulina M
• IL	Inter Leucina
• IMC	Inmunidad Mediada por Células
• INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico
• INF- γ	Interferón Gamma
• Kd	Kilodalton
• NK	Natural Killer
• TCE	Células Citotóxicas Efectoras

ANEXO 2

Preparación de Soluciones

1. Solución salina isotónica al 0.85 % (SSI).

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl) y disolver en 1 litro de agua destilada.

2. Solución salina isotónica formalinizada al 0.06 %.

Colocar 1.5 mL de formaldehído (39.7 % de pureza) y adicionar 98.5 mL de SSI.

3. Ácido sulfúrico al 1%.

Colocar 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; densidad = 1.80 g/mL) en 100 mL de agua.

4. Reactivo de Lowry.

Reactivo A. Colocar carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N.

Reactivo B. Sulfato de cobre al 0.5 %.

Mezclar 50 mL del reactivo A con 1 mL del reactivo B.

Nota: Se conservan en refrigeración.

5. Amortiguador de recubrimiento carbonato-bicarbonato. pH = 9.6.

Pesar 1.59 g de carbonato de sodio y 2.93 g de bicarbonato de sodio.

Aforar a 1 litro con agua bidestilada.

Nota: Se puede almacenar a 4° C por no más de 2 semanas.

6. PBS (Solución amortiguadora salina de fosfatos). pH = 7.2.

Pesar 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 1.15 g de fosfato de sodio dibásico y 0.2 g de fosfato de potasio.

Aforar a 1 litro con agua bidestilada.

7. PBS – TWEEN (Solución amortiguadora salina de fosfatos tween). pH = 7.4.

Pesar 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 2.9 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado y 0.2 g de fosfato de potasio monobásico.

Aforar a 1 litro con agua bidestilada. Poco antes de aforar adicionar 0.5 mL de tween 20.

Nota: Almacenar a 4° C.

8. Ovoalbúmina al 1 % en leche al 5%.

Pesar 0.5 g de ovoalbúmina y 2.5 g de leche y disolver en 47 mL de PBS.

9. Amortiguador de sustrato de peroxidasa con orto - fenilendiamina. pH = 5.

Mezclar 24.3 mL de ácido cítrico 0.1 Molar y 25.7 mL de fosfato de sodio 0.02 Molar.

Nota: Se preparará antes de su uso ya que se descompone con la luz. (Disolver 40 mg de orto-fenilendiamina en 100 mL de amortiguador de sustrato y 40 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 %).

G L O S A R I O

Absceso. Acumulación de pus en una cavidad anormal formada por la desintegración de los tejidos.

Aguzado. Afilado, cortante, punzante, anguloso.

Anterior. Situado delante; del lado de la cabeza; que precede en lugar o tiempo.

Aracnoides. Membrana meníngea delicada, intermedia entre la piamadre y la duramadre en el encéfalo y médula. Está separada de la piamadre por el espacio subaracnoideo y consta de dos hojas, visceral y parietal, que limitan entre sí la cavidad aracnoidea.

Astenia. Falta o pérdida de fuerza.

Bradizoito. Elemento que resulta de la multiplicación lenta, por endodiogenia, en los quistes de Toxoplasma.

Calcificación. Degeneración de un tejido orgánico, por el depósito de sales de cal.

Célula basófila. La que tiene afinidad por los colorantes básicos.

Célula cebada. Célula de los tejidos que se parecen a un basófilo de la sangre periférica y que contienen gránulos con serotonina e histamina.

Células NK. Células citotóxicas que pertenecen a la clase celular encargada de la citotoxicidad celular sin sensibilización previa.

Cigoto. Individuo resultante de la unión de dos gametos; macrogameto fecundado.

Citófilico. Que tiene afinidad por las células.

Citoplasma. Protoplasma de la célula con exclusión del plasma nuclear.

Citosina. Factores como linfocitos o monocinas producidos por unas células que afectan a otras.

Citotóxico. Que posee la acción de una toxina.

Cóncava. Que presenta una depresión o superficie hueca.

Conoide. Cono truncado de forma espiral, localizado dentro de los anillos polares del complejo apical de los Apicomplexa.

Convexa. Más prominente la superficie en el medio que en los bordes.

Coriorretinitis. Inflamación simultánea de la coroides y la retina.

Coroides. Capa oscura y vascular del ojo, situada entre la esclerótica y la retina, cuya función es nutrir a ésta y al cristalino.

Cromógeno. Sustancia que produce color.

Encefalitis. Inflamación del encéfalo.

Encéfalo. Porción del sistema nervioso central contenida dentro del cráneo, que comprende el cerebro, el cerebelo, el puente de Varolio y la medula oblongada o bulbo.

Encefalopatía. Cualquier enfermedad o trastorno del encéfalo.

Endocráneo. Duramadre encefálica.

Endodiogenia. Forma de endopoliogenia, en la cual se forman dos células hijas.

Endopoliogenia o polioendogenia. Forma de multiplicación asexual, mediante la cual se forman células hijas rodeadas por una membrana propia, en el interior de la célula madre.

Endotelio. Delgada membrana compuesta de un solo estrato de células planas, poligonales, que constituye la superficie de las membranas serosas y sinoviales y la túnica interna de los vasos. Membrana propia sobre la que descansa el epitelio del intestino delgado.

Erupción. Aparición en la piel, con fiebre o sin ella, de enrojecimiento o prominencias, o de ambas cosas a la vez; exantema. Lesión cutánea; mácula, pápula, pústula.

Esclerótica. Membrana exterior del ojo, blanca, dura, fibrosa, con una abertura grande anterior en la que se encaja la córnea y otra posterior, pequeña, que da paso al nervio óptico.

Esporogonia. Esquizogonia o fisión múltiple de un cigoto que dará origen a esporozoitos.

Esporozoitos. Cada una de las células hijas resultantes de la esporogonia.

Esquizogonia. Multiplicación asexual, por fisión múltiple, con formación simultánea por citoquinesis, de un número variable de células hijas.

Exógeno. Que se origina en el exterior de una cosa.

Fagocitosis. Ingestión de microorganismos o de otras partículas por los leucocitos.

Fagolisosoma. Organelo celular que es el producto de la difusión de un fagolisosoma y un lisosoma.

Fotosensible. Sensible a las radiaciones lumínicas.

Gametocitos. Célula a partir de la cual se diferenciarán los gametos masculinos o femeninos en el ciclo evolutivo de los coccidios.

Helminto. Nombre genérico de los vermes parásitos y que abarca acantocéfalos, nematodos, cestodos y trematodos.

Hemólisis. Desintegración o disolución de los corpúsculos sanguíneos, especialmente de los hematies, con liberación consiguiente de la hemoglobina por la acción de las lisinas específicas o hemolisinas de bacterias, sueros hipotónicos, etc.

Hepatóesplenomegalia. Aumento de volumen del hígado y bazo.

Hidrocefalia. Calidad de hidrocéfalo.

Hidrocéfalo. Acumulación de líquido en el encéfalo por aumento de su producción en los plexos coroideos de los ventrículos o por disminución de su resorción. La variedad más común en la infancia es debida siempre a la obstrucción, que puede radicar en los agujeros de Luschka o Magendie o en el espacio subaracnoideo. La enfermedad se caracteriza por el mayor volumen de la cabeza, con prominencia en la frente, debilidad mental por atrofia del cerebro y convulsiones.

Hipertensión. Aumento del tono o tensión general; especialmente aumento de la presión vascular o sanguínea.

Hístico. Relativo a un tejido o de su naturaleza.

Interferón. Es una proteína secretora con actividad antiviral, inhibe la proliferación de células de vertebrados y modula las respuestas inmunitarias.

Intracerebral. Situado o que ocurre en la sustancia propia del cerebro.

Isotipo. Características antigénicas de determinada clase o subclase de cadenas H y L de inmunoglobulina.

Linfocinas. Productos solubles de los linfocitos que producen los múltiples efectos de la reacción inmunitaria celular.

Lipemia. Presencia de lípidos o grasas en la sangre, normal después de la ingestión abundante de grasa o patológica en las enfermedades del hígado, alcoholismo crónico o diabetes etc.

Macrófago. Fagocitos mononucleares que derivan de los monocitos de la médula ósea desempeñan papeles accesorios en la inmunidad celular.

Macrogametocito. Célula que dará origen a un macrogameto.

Mastocito. Célula cebada.

Meninge. Cada una de las tres membranas, duramadre, aracnoides y piamadre, que envuelven el encéfalo y la medula espinal.

Meningoencefalitis. Inflamación simultánea, aguda o crónica del encéfalo y las meninges.

Merozoíto. Cada una de las células hijas que se forman a partir de la ezquizogonía de un esporozoito o de un merozoito progenitor (merontes).

Mialgia. Dolor muscular.

Microgametocito. Célula que dará origen a microgametos.

Micropilo. Abertura en la membrana que rodea el ovulo de ciertos animales, por donde penetra el espermatozoo.

Miocarditis. Inflamación del miocardio.

Monomérico. Relativo o que afecta a un solo segmento.

Morbilidad. Número proporcional de personas que enferman en población y tiempo determinados.

Neoplasia. Formación de tejido nuevo de carácter tumoral.

Obicuo. Que está presente a un mismo tiempo en todas partes.

Odinofagia. Deglución dolorosa.

Ooquiste. Forma quística que contiene el cigoto resultante de la esporogonía en los Apicomplexa y los cuales pueden estar cubiertos por una envoltura translúcida o estar desnudos.

Pentámero. De cinco partes.

Peritoneo. Membrana serosa, la más extensa del cuerpo, fuerte, incolora, que tapiza las paredes abdominales y superficie inferior del diafragma, y se refleja en varios puntos sobre las vísceras, para formar una cubierta completa para algunas, estómago, intestino etc. e incompleta para otras, vejiga, recto etc.

Piamadre. Membrana vascular, fina y semitransparente, la más interna de las tres que constituyen las meninges, que se aplica inmediatamente a la superficie del eje cerebroespinal.

Plasma cell. Células sintetizadoras de anticuerpos totalmente diferenciadas que provienen de los linfocitos B.

Plasmocito. Célula plasmática.

Polo. Cada uno de los extremos opuestos de un cuerpo, órgano o parte esférica u oval.

Posterior. Situado atrás.

Protoplasma. Sustancia viscosa, semilíquida, granulosa, que representa la base física de la vida y es el constituyente esencial de la célula viva.

Pseudoquiste. Grupo de protozoos dentro de la célula hospedera. Se diferencia del quiste verdadero en que carece de una pared quística, la cual está formada por los propios parásitos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA BIENESTAR

Quiste. Tumor formado por un saco cerrado, normal o accidental, especialmente el que contiene líquido o una sustancia semisólida.

Roptries. Organelos elongados, densos y a menudo piriformes, que se extienden hacia la membrana celular, dentro de los anillos polares, en el complejo apical de los Apicomplexa.

Taquizoitos. Elemento que resulta de la multiplicación acelerada del Toxoplasma dentro de la célula hospedera, producida por los pseudoquistes.

Trofozoito. Forma vegetativa activa y que se alimenta, entre los protozoos.

Vacuola. Pequeño espacio en el protoplasma de una célula. Pequeña cavidad en el protoplasma de organismos unicelulares, que aumenta gradualmente de tamaño y luego se desvanece. Se le atribuye funciones respiratorias y excretorias.

R E R E F E N C I A S

1. Palmer SR, Soulsby L, Simpson DJ. Zoonoses. 3a.ed. Oxford: Oxford Medical Publications, 1998: 579-592
2. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(3): 607-623
3. Beaver Ch P, Jung RC. Parasitología clínica. 2ª. ed. México: Salvat Editores, 1986:179-184
4. Atías A. Parasitología medica. 2ª.ed. Santiago: Mediterráneo, 1998: 265-284
5. Romero CR. Microbiología y parasitología humana. México: Médico Panamericana, 1993: 561-567
6. García AC. Toxoplasmosis. *Rev AMMMVEPE* 2000; 11(4): 113-116
7. Velasco CO, Salvatierra IB, Valdespino JL y col. Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. *Salud Publica en México* 1992; 34(2): 1-9
8. Martínez BI, Ruiz GLA, Gutiérrez QM y col. Frecuencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos de la ciudad de México y área metropolitana. *Rev Mex Patol Clin* 1996; 43(3): 121-127
9. Hathaway SC. Proceso intensivo de producción de carne de bovinos (criados a campo): la perspectiva de Nueva Zelanda. *Rev sci tech Off int Epiz* 1997; 16(2): 382-390

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. Welgel RM, Dubey JP, Dyer D, Siegel AM. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in Illinois. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(5): 793-798
11. Isaac-Renton J, Bowie WR, King A y col. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(6): 2278-2280
12. Velazco CO, Galindo VS, Sedano LAM, González DF. *Toxoplasmosis*. Publicación Técnica del INDRE 1992; 14: 1-42
13. Goldsmith R, Heyneman D. *Parasitología y medicina tropical*. México: El Manual Moderno, 1995: 430-443
14. Dubey JP, Shirley M, Tomley F. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1998; 28(7): 1019-1024
15. Hoppe HC, Ngo HM, Yang M, Joiner KA. Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat Cell Biol* 2000; 2(7): 449-456
16. Speer CA, Clark S, Dubey JP. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1998; 84(3): 505-512
17. Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol* 1998; 6(1): 27-30
18. Stites PD, Terr IA, Parslow GT. *Inmunología básica y clínica*. 9ª.ed. México: El Manual Moderno, 1998: 881-882
19. Ortiz IFJ, Arredondo GJL. Dermatitis exfoliativa asociada a toxoplasmosis congénita (reporte de un caso). *Perinatol Reprod Hum* 1999; 13(2): 158-164
20. Lee YF, Chen SJ, Chung YM, Liu JH, Wong WW. Diffuse toxoplasmic retinochoroiditis as the initial manifestation of acquired immunodeficiency syndrome. *J Formosan Med Assoc* 2000; 99(3): 219-223

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

21. Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today* 1999; 15(2): 51-57
22. Chandener J, Jarry G, Nassif D, y col. Congestive heart failure and myocarditis after seroconversion for toxoplasmosis in two immunocompetent patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(5): 375-379
23. Ramírez SJH, Cuevas SF. Pulmonary manifestations of AIDS in pediatric patients. *Alergia e Inmunol Pediatr* 1995; 4(1): 33-40
24. Holliman RE. Clinical and diagnostic findings in 20 patients with toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. *J Med Microbiol* 1991; 35(1): 1-4
25. Allain JP, Palmer CR, Pearson G. Epidemiological study of latent and recent infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women from a regional population in the UK. *J Infect* 1998; 36(2): 189-196
26. De León BB, Ridaura SC. Toxoplasmosis en niños. *Acta Pediatr Mex* 1999; 20(4): 187-194
27. Conti DI, Freyre A, Noya C y col. Estudio de la toxoplasmosis en la unidad de perinatología del BPS en el período 1991-1996. *Rev Med Uruguay* 1998; 14(3): 226-235
28. Chávez TR, Vega HME. Tamiz neonatal en América Latina: Problemas y propuestas derivadas de la práctica clínica. *Rev Mex Pediatr* 1995; 62(3): 102-107
29. Ramos CJ, Hernández LA. Secuelas oculares en recién nacidos con síndrome de TORCH. *Rev Sanid Milit Mex* 1999; 53(1): 29-35
30. Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S y col. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 1999; 123(2): 283-289

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

31. Couvreur J. Congenital toxoplasmosis: the changing situation over the last 40 years. *Presse Med* 1999; 28(14): 753-757
32. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999; 353(9167): 1829-1833
33. Markell KE, John TD, Krostoski WA. *Parasitología medica*. 8ª. ed. México: El Manual Moderno, 1999: 161-171
34. Angel MG, Angel RM. Interpretación clínica del laboratorio. 5ª. ed. Colombia: Médica Panamericana, 1996: 567-569
35. Tierney LM, Papadakis MA. Diagnóstico clínico y tratamiento. 32ª. ed. México: El Manual Moderno, 1997: 1296-1298
36. Miroslav F. Handbook of immunochemistry. Checoslovaquia: Chapman and Hall, 1993: 350-356
37. Reiter OI, Petersen E, Joynson D y col. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull WHO* 1999; 77(11): 929-935
38. Cozon GJ, Ferrandiz J, Thulliez P, Peyron F. Flow cytometric application of the Sabin and Feldman dye test in the diagnosis of toxoplasmosis. *J Microbiol Methods* 1999; 38 (1-2): 131-136
39. Sedano LAM, Pérez GJ, Carranza JM, Tapia MJ, Rojas MA, Guzmán BC. Zoonosis: Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. México: Publicación Interna del INDRE, 2000: 85-100
40. Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: More and less. *Int J Parasitol* 1998; 28(1): 3-9

ESTADO COM
FALLA DE ORIGEN

41. Fachado A, Fernández N, Hern HE, Fonseca L. *Toxoplasma gondii*: caracterización de un anticuerpo monoclonal anti-P30. *Rev Cubana Med Trop* 1996; 48(3): 178-183
42. Handman E, Goding JW, Remington J. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1980; 124(6): 2578-2583
43. Johnson AM, McDonald PJ, Neoh H. Molecular weight analysis of soluble antigens from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1983; 69(3): 459-464
44. Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J Immunol* 1983; 130(5): 2407-2412
45. Sharma SD, Mullenax J, Araujo GF, Erlich AH, Remington SJ. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and antibodies. *J Immunol* 1983; 131(2): 977-983
46. Decoster A, Darcy F, Capron A. Recognition of *Toxoplasma 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: 376-382
47. Charif H, Darcy F. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp Parasitol* 1990; 71: 114-124
48. Fischer H-G, Stachelhaus S, Sahm M, Meyer HE, Reichmann G. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Biochem Parasitol* 1998, 91(2): 251-262
49. Ferguson DJP, Jacobs D, Saman E, Dubremetz JF, Wright SE. In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 1999; 119(3): 259-266

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

50. Jacobs D, Vercammen M, Saman E. Evaluation of recombinant dense granule antigen (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(1): 24-29
51. Zenner L, Estaquier J, Darcy F, Maes P, Capron A, Cesbron-Delauw MF. Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunol* 1999; 21(5): 261-272
52. Li S, Galvan G, Araujo FG, Suzuki Y, Remington JS, Parmley S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(5): 781-787
53. Li S, Maine G, Suzuki Y, Araujo FG, Galvan G, Remington JS, Parmley S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 179-184
54. Aubert D, Maine GT, Villena I y col. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): 1144-1150
55. Bogdan C, Roellinshoff M. How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages?. *Parasitol Today* 1999; 15(1): 22-28
56. Yap GS, Sher A. Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, Regulation and Effector Function. *Immunobiology* 1999; 201(2): 240-247
57. Denkers EY. T lymphocyte-dependent effector mechanism of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microb Infect* 1999; 1(9): 699-708
58. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(4): 569-588

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

59. Garzzinelli RT, Talvani A, Camargo MM y col. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31(1): 89-104
60. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer MG, Sher A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 1991; 146(1): 286
61. Khan IA, Smith KA, Kasper HL. Induction of Antigen-specific Human Cytotoxic T Cells by *Toxoplasma gondii*. *J Clin Invest* 1990; 85 (6) :1879-1886.
62. Ely KH, Kasper LH, Khan IA. Augmentation of the CD8 super(+) T cell response by IFN-gamma in IL-12-deficient mice during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 1999; 162(9): 5449-5454
63. Khan IA, MacLean JA, Lee FS, Casciotti L, DeHaan E, Schwartzman JD, Luster AD. IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity* 2000; 12(5): 483-494
64. Margni RA. *Inmunología e Inmunoquímica*. 5ª. ed. Argentina: Médica Panamericana, 1996: 75-129
65. Prieto S, Amich S, Salve ML. *Laboratorio Clínico*. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1993:482-486,498-503
66. Rose NR. *El laboratorio en inmunología clínica*. 3ª ed. Buenos aires: Panamericana, 1999: 416-428
67. Dawson B, Trapp RG. *Bioestadística médica*. 3ª. Ed. México: El Manual Moderno, 2002: 54-56, 257-264
68. Weimer RC. *Estadística*. México: CECSA, 1996: 694-704

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN