

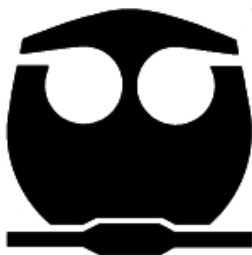


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN
ELISA DE CAPTURA DE ANTICUERPOS TIPO IgA
e IgM CONTRA *Toxoplasma gondii* EN
MUESTRAS HUMANAS DE SUERO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
MÓNICA OLMEDO HERNÁNDEZ



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profesor: SATURNINO DE LEON CHAPA
VOCAL	Profesor: ABEL GUTIERREZ RAMOS
SECRETARIO	Profesor: MARIA DOLORES CORREA BELTRAN
1er SUPLENTE	Profesor: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ
2do SUPLENTE	Profesor: JOSE CORDERO HERNANDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA
LABORATORIO DE INMUNOLOGIA EXPERIMENTAL**

ASESORA: DRA. MARIA DOLORES CORREA BELTRAN

SUSTENTANTE: MONICA OLMEDO HERNANDEZ

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud, bajo la dirección de la Dra. María Dolores Correa Beltrán, y fue apoyado por el financiamiento No. 69666 del CONACYT.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y admiración a mis papás, María Cristina Hernández Cedillo y Pedro Olmedo Jasso, que con esfuerzo y sacrificio me dieron todo su apoyo para la culminación de este sueño. Agradezco a Dios permitirme ser su hija, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanitos Arturo y Luis Gerardo Olmedo, por ser mis cómplices, mis amigos y sobre todo por cuidarme en cada momento. Les agradezco el ejemplo que me dieron para lograr este sueño.

A mis sobrinos Diego y Shayla Olmedo por darle una chispa de ternura e inocencia a mi vida.

A mis abuelitas Juanita Cedillo y Conchita Jasso, que aunque estén en cuerpo etéreo, les agradezco el ejemplo que me dieron de amor, esfuerzo y sacrificio.

A Víctor Arias por ser parte de mi vida, por su apoyo incondicional y sobre todo por saber hacerme reír.

A mis amigas Dámaris y Marquelia por los momentos inolvidables que vivimos en la Facultad, incluidas las metidas de pata.

A mi amiga Haidé por los “osos” que hacíamos al final de la carrera, pero sobre todo su confianza y compañerismo.

A mis tíos Rubén Olmedo y Porfirio Hernández, por el interés que mostraron en mis proyectos.

A mi prima Verónica Hernández por su complicidad y ejemplo, aunque este último no lo llevé tan al pie de la letra.

A todos mis primos y tíos, especialmente a mis tías Gloria Hernández, Catalina y Elvira Olmedo, por todo su cariño.

A Leonardo Cabrera por demostrar lo relajado que se la puede pasar uno en la Facultad y a Narmer Ortiz por enseñarle cómo llevarlo a cabo de forma magistral.

A todos mis compañeros, especialmente a los del grupo 16, por todas las vivencias en las aulas, laboratorios y pasillos de la Facultad de Química.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de convertirme en una profesionista.

A la Facultad de Química con especial cariño por todo lo que aprendí en sus aulas, por cada uno de los profesores que tuve y dieron un granito de arena para mi formación académica.

Al Instituto Nacional de Pediatría por abrirme sus puertas.

A la Doctora Ma. Dolores Correa Beltrán por su valiosísimo apoyo para realizar esta tesis, por su confianza, por levantar mi estado de ánimo y sobre todo por enseñarme a descubrir lo divertido que es la investigación. Muchísimas gracias.

A Esther Calderón, Héctor Luna y José Luis Hernández, les agradezco que se hayan tomado un poco o mucho de su tiempo para compartir todos sus conocimientos conmigo.

A mis amigos del Laboratorio de Inmunología experimental: Irma, Belinda, Lizbeth, Claudia, Heriberto, Edith, Sandra, Carlos, Rafa y José Antonio, por demostrarme lo divertido que es trabajar en equipo. Especialmente a Liz, Beli y Heri por revelar mis placas y no enojarse cuando me acababa su PBS.

A mis compañeras del IMSS: Lucy, Maru, Bety, Lety, Martha y Jefa Carmen, por alentarme a finiquitar este proyecto, tolerando mis salidas temprano.

A los miembros del Jurado por la atención brindada para la revisión de esta Tesis.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
GENERALIDADES DE TOXOPLASMA GONDII	3
CICLO DE VIDA	4
<i>Ciclo sexual</i>	<i>4</i>
<i>Ciclo asexual</i>	<i>5</i>
VIAS DE TRANSMISIÓN	6
EPIDEMIOLOGÍA.....	6
<i>Epidemiología en México.....</i>	<i>7</i>
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	8
TRATAMIENTO	9
RESPUESTA INMUNE CONTRA TOXOPLASMA GONDII	9
<i>Respuesta inmune humoral.....</i>	<i>9</i>
<i>Respuesta inmune celular</i>	<i>11</i>
RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO	12
DIAGNÓSTICO	13
<i>Estudios de gabinete</i>	<i>13</i>
<i>Identificación histológica.....</i>	<i>13</i>
<i>Aislamiento del parásito.....</i>	<i>14</i>
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	<i>14</i>
<i>Inmunodiagnóstico.....</i>	<i>14</i>
Prueba de Sabin y Feldman	14
Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	15
Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	15
Prueba de Avidéz	16
Western blot	16
Dot – ELISA.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO	19
METODOLOGÍA	20
TIPO DE ESTUDIO	20
ESTRATEGIA GENERAL	20
<i>Fase I. Producción de anticuerpo IgG de conejo biotinilado contra Toxoplasma gondii</i>	<i>20</i>
<i>Fase II. Estandarización del ELISA de captura de IgA o IgM</i>	<i>20</i>
<i>Fase III. Validación de cada ELISA de captura</i>	<i>21</i>
MÉTODOS DE LABORATORIO	24
<i>Obtención de taquizoítos de Toxoplasma gondii para infección de conejo</i>	<i>24</i>
<i>Obtención de antígeno de Toxoplasma gondii.....</i>	<i>24</i>
<i>Antígeno P30 (sag1).....</i>	<i>25</i>
<i>Obtención de suero de conejo infectado con Toxoplasma gondii.....</i>	<i>25</i>
<i>ELISA indirecto para suero de conejo</i>	<i>25</i>
<i>Purificación de IgG de conejo contra Toxoplasma gondii</i>	<i>26</i>
<i>Obtención de IgG marcada con biotina</i>	<i>26</i>
<i>Inmunopunto o dot de ELISA</i>	<i>27</i>
<i>Adsorción de anticuerpos anti IgA y anti IgM humanas con reconocimiento inespecífico.....</i>	<i>27</i>
<i>ELISA de captura anticuerpos para muestras de suero humano.....</i>	<i>28</i>

DEFINICION DE VARIABLES.....	29
<i>Variable independiente</i>	29
<i>Variables dependientes:</i>	29
RESULTADOS.....	30
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO IgG DE CONEJO DE TOXOPLASMA GONDII ACOPLADO A BIOTINA.....	30
ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA DE CAPTURA DE IgA O IgM.....	35
<i>Ensayos de respuesta anti extracto crudo y anti P30 del anticuerpo IgG de fase aguda y crónica biotinilados por ELISA indirecto</i>	35
<i>Pruebas de dilución óptima de los anticuerpos anti IgA o anti IgM</i>	37
<i>ELISA de captura preliminar</i>	39
<i>ELISA de captura con IgG biotinilada incubada con suero</i>	44
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	46
CONCLUSIONES.....	48
PERSPECTIVAS.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	50
APENDICE.....	61

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado de distribución mundial. La infección congénita es la más severa y con mayor incidencia de secuelas, pero la naturaleza subclínica de la infección en adultos hace que el diagnóstico resulte difícil en mujeres infectadas durante el embarazo. La infección primaria por este parásito induce la aparición temprana de anticuerpos de clase IgM e IgA, los cuales alcanzan niveles máximos alrededor de la tercera semana, por lo que su identificación permite sospechar una infección aguda.

Los anticuerpos del tipo IgM e IgA presentan una afinidad más baja que la presentada por IgG, por lo que en muestras en las que existe esta última clase, hay competencia por la unión específica al antígeno, lo que complica la identificación de los primeros, a través de un ELISA indirecto. Por lo anterior, se requiere un ELISA de captura de IgM o IgA, eliminando el resto de las inmunoglobulinas de la muestra antes de retarlas con el antígeno. Existen estuches comerciales para la captura de IgM o para IgA por separado, pero se ha observado que la sensibilidad del diagnóstico aumenta si se buscan ambas clases de anticuerpos. Por tal razón el objetivo de la presente tesis fue el diseño, estandarización y validación de un ELISA de captura simultánea de IgM e IgA que permita bajar el costo del diagnóstico de sospecha o tamiz.

La técnica consistió en forrar una placa de ELISA con anticuerpos anti IgA o anti IgM, posteriormente se colocó la muestra de suero. Se añadió el antígeno parasitario, el cual a su vez, fue reconocido por el conjugado de anticuerpos de clase IgG que se obtuvieron por cromatografía de afinidad a partir de suero de conejo infectado con taquizoítos acoplados a biotina; posteriormente se reveló con avidina-peroxidasa.

Se usaron anticuerpos de conejo tanto de la fase aguda como crónica de la infección. Como antígenos se probaron el antígeno de superficie 1 (SAG1 o p30) como un extracto crudo. La respuesta de la IgG de fase aguda al antígeno p30 fue alta, y al extracto crudo baja; la reacción con la IgG de fase crónica fue inversa:

alta para el extracto crudo y baja para p30. Las concentraciones óptimas de los anticuerpos biotinilados correspondientes fueron de 50 µg/mL para 1 y 2 µg/mL de p30 y extracto crudo, respectivamente. Los anticuerpos de captura de IgA o IgM fueron utilizados óptimamente a 5 µg/mL, usando el suero 1:40. Sin embargo, se encontró reacción cruzada entre los dos anticuerpos de captura contra las dos inmunoglobulinas, descartándose realizar por ello el ensayo simultáneo.

En los ELISA de captura para cada inmunoglobulina se detectaron fondos de reacción muy altos, por lo que se adsorbieron los anticuerpos de captura con IgG o se incubó la IgG biotinilada con suero humano negativo 1:10. A pesar de lo anterior, no se logró eliminar el fondo en el sistema de captura de IgM debido a la naturaleza policlonal del conjugado IgG de conejo – biotina y posiblemente a la interferencia del factor reumatoide en la muestra.

Estas modificaciones se repitieron en los ensayos preliminares de captura para IgA con las concentraciones de 5 µg/mL de anti IgA, suero 1:40, mezcla de antígeno p30 1 µg/mL + extracto crudo de taquizoito (EC) 2µg/mL, mezcla de IgG biotinilada fase aguda 25 µg/mL + IgG biotinilada fase crónica 25 µg/mL. Con las concentraciones anteriores se probaron sueros positivos a IgA confirmados por ELISA indirecto. Las absorbancias obtenidas se graficaron contra las del método indirecto, obteniéndose una correlación positiva ($r=0.5$) entre ambos ensayos.

En conclusión el ensayo de captura de IgA se logró estandarizar pero el de IgM requiere afinarse antes de poder combinarlo con el primero.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado, perteneciente al Phylum *Apicomplexa*, a la clase *Sporozoa* y a la Subclase *Coccidia*.¹ Es la única especie del género *Toxoplasma* y se encuentra relacionado taxonómicamente con *Pneumocystis*, *Plasmodium* y *Neospora*.²⁻⁴

El término *toxoplasma* deriva de la palabra griega *toxón*, que significa arco, refiriéndose a la forma del taquizoíto de media luna, el cual es la forma de replicación rápida (figura 1). El nombre de la especie proviene del roedor *Ctenodactylus gondii*, de donde se aisló por primera vez.⁵

Toxoplasma gondii es capaz de invadir a gran variedad de mamíferos, incluso el humano, y aves, cuyas células son susceptibles de infección y multiplicación intracelular.²

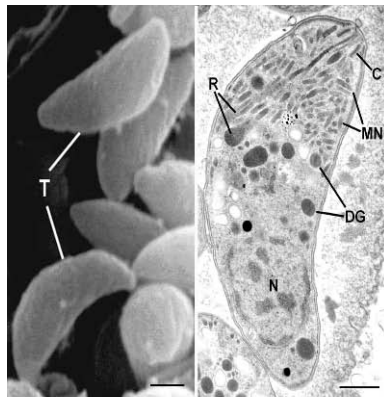


Figura 1. Microfotografía electrónica de barrido (izquierda) y de transmisión (derecha) de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Las barras inferiores a la derecha equivalen a 2 y 1 μm respectivamente.

CICLO DE VIDA

El desarrollo de *Toxoplasma gondii* se lleva a cabo a través de reproducción sexual y asexual (figura 2):

Ciclo sexual

El ciclo inicia cuando el huésped definitivo, un felino, se infecta por consumo de quistes tisulares presentes en la carne de otros animales.⁶ Estas estructuras de forma esférica en cerebro y de forma alargada en corazón, permanecen largos períodos en los tejidos y caracterizan la fase crónica de la infección. Su tamaño dependerá de la cantidad de parásitos que contengan, variando de 10 a 200 micras. En los quistes tisulares se alojarán los bradizoítos, los cuales son formas de proliferación lenta y que persisten enquistados en el tejido del huésped de por vida.⁷ Al romperse el quiste tisular por la acción de las enzimas digestivas intestinales, se liberan las formas infectivas, las cuales invaden a los enterocitos del intestino delgado del huésped, siendo resistentes a la pepsina y tripsina.^{3,7} En este sitio inician la gametogonia, para la formación del cigoto, y posteriormente los ooquistes, los cuales son formas ovoides que miden de 12 a 11 micras de diámetro mayor.³ Estas formas son liberadas al medio ambiente a través de las heces de los gatos infectados, como un ooquiste inmaduro o no esporulado. En condiciones óptimas de temperatura y humedad, en 1 a 5 días ocurren los procesos de replicación y diferenciación celular que conllevan a la maduración y formación de ocho esporozoítos infecciosos (esporulación).⁸ Los ooquistes esporulados pueden permanecer viables hasta 18 meses en tierra húmeda y sobrevivir a temperaturas bajas y deshidratación por periodos cortos de tiempo.³

Ciclo asexual

El huésped intermediario se puede infectar mediante la ingestión de ooquistes esporulados o de quistes tisulares presentes en tejidos de otros hospederos intermediarios.³ Al ingerir los ooquistes o los quistes tisulares, se liberan los esporozoítos o los bradizoítos, respectivamente, que infectando el epitelio intestinal, producen taquizoítos, los cuales finalmente se diferencian a bradizoítos, apareciendo los quistes tisulares a los 7-10 días post-infección.^{2, 7}

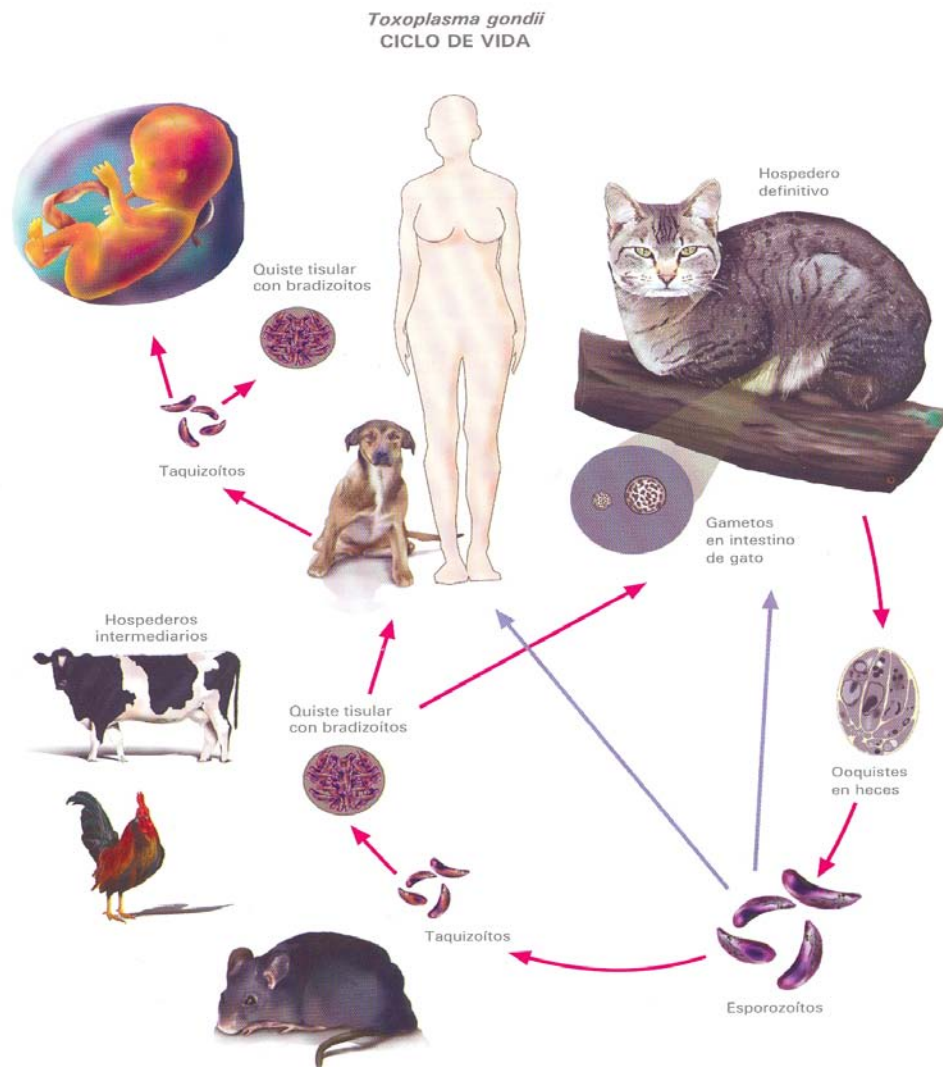


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Tomado de Correa et al, 2006.

VIAS DE TRANSMISIÓN

La transmisión de *Toxoplasma gondii* se puede llevar a cabo por vía oral, mediante el consumo de carne mal cocida contaminada por quistes tisulares o por ingesta de agua contaminada con ooquistes.^{7,9} Por otro lado puede haber transmisión directa por heridas en personas que manejan carne cruda infectada, como carniceros o trabajadores de rastros o personal de laboratorio que trabaja en el manejo de cepas de *Toxoplasma gondii* que se ha infectado accidentalmente.^{10,11} Otra fuente de infección puede ser la transfusión sanguínea, cuando el donador cursa infección aguda y por lo tanto presenta taquizoitos circulantes; o bien el transplante de órganos infectados con *Toxoplasma*.⁸ También se puede llevar a cabo transmisión transplacentaria o vertical, en el que la mujer adquiere la infección dos o tres meses antes del embarazo o durante el mismo, infectando al producto.^{12,13,15}

Puede haber reactivación de la fase aguda en pacientes con infección crónica, secundaria a la disminución en la respuesta inmune en el caso de individuos inmunocomprometidos, como aquellos con cáncer o SIDA, la cual puede causar encefalitis toxoplásmica e incluso la muerte.¹⁵

EPIDEMIOLOGÍA

La poca especificidad por la especie de hospedero, permite que *Toxoplasma gondii* cause una de las zoonosis más ampliamente distribuidas en el mundo, aunque las características del medio ambiente, hábitos alimenticios, edad, higiene y convivencia con gatos, influyen en su prevalencia.^{16, 17} Se ha encontrado que el 30% de los humanos están infectados por el parásito, aunque la frecuencia es menor en los polos y zonas altas.^{16, 18} Se ha observado una alta prevalencia y exposición a temprana edad en zonas de gran contaminación del suelo y del agua con ooquistes por la presencia de gatos domésticos o salvajes que deambulan libremente.¹⁹

Epidemiología en México

En México es muy escasa la información sobre la magnitud del problema. Las primeras investigaciones en 1951 y 1953, por medio de la intradermoreacción con “toxoplasmina”, refieren una positividad del 48% a 51% en población de Tamaulipas y Veracruz y del 15% en el Distrito Federal.²⁰ Posteriormente aparecieron pruebas serológicas utilizando la reacción de Sabin y Feldman (detecta anticuerpos totales), inmunofluorescencia, hemaglutinación indirecta y ELISA.^{17, 21-25}

Los valores considerados representativos de todo el país fueron similares entre 1953 con la prueba de Sabin y Feldman, y 1987, en la que se empleó la inmunofluorescencia (entre 28.9% y 32.0%).^{17, 23, 24}

Se han obtenido valores para anticuerpos totales o de clase IgG en individuos sanos o “controles” de otros grupos y para donadores de sangre, los cuales tienen una gran diferencia entre los Estados como Durango (7.4 -8.9%) y los de regiones cálidas húmedas como Yucatán (69%).²⁵⁻²⁸

En cuanto a la relación de la toxoplasmosis con algún desorden mental o neurológico, en el estado de Durango se encontró una frecuencia significativamente mayor en pacientes psiquiátricos (18.2%) y especialmente en casos con esquizofrenia (26.3%) que en donadores de sangre o mujeres con embarazo normal.^{26, 28}

Referente a la toxoplasmosis congénita, se han encontrado enormes diferencias en la frecuencia en mujeres embarazadas entre regiones distintas del país, que va de 6.0% en Durango a 78.0- 82.0% en una comunidad semi-urbana de Morelos.^{12, 26, 29-31}

En el caso de la infección congénita, existen dos estudios realizados en la Ciudad de México; el primero de 1962, en el que se encontró que de 1000 recién nacidos, 19 tenían anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*¹⁹ y el segundo que corresponde al 2005, en el que de 1003 niños recién nacidos de la Ciudad de México se encontraron 2 casos positivos.³³

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En personas inmunocompetentes, la toxoplasmosis aguda suele ser asintomática y autolimitada, pasando inadvertida en un 80 al 90% de adultos y niños.³⁴ Para el caso de infección crónica, puede persistir de por vida, y con menor daño para el paciente inmunocompetente; siendo grave o provocar la muerte en pacientes inmunocomprometidos, como los transplantados, con VIH o durante el desarrollo del bebé.¹⁶

La infección congénita resulta de una infección primaria en la madre durante el embarazo; aunque también se tiene riesgo de que el producto adquiera la infección si la madre se infecta algunas semanas antes de la concepción.^{12, 13, 35, 36}

El riesgo de daño al producto dependerá del trimestre de la gestación durante el cual la madre adquirió la infección. Si la infección es en el primer trimestre y sin tratamiento, la transmisión al producto se da en un 10 – 25 % de los casos, pudiendo presentar aborto espontáneo. En el caso del segundo trimestre de gestación, la incidencia de infección es de 30 a 50% y de 60 a 65% en el tercer trimestre; siendo en su mayoría asintomáticos al nacer. En los casos de recién nacidos con signos y síntomas aparentes, se pueden presentar cuadros de meningoencefalitis, irritación meníngea y signos de lesión neurológica acompañada de hidrocefalia, macro o microcefalia, lesiones oculares, daño hepatocelular y hasta sordera.^{18, 37, 38} En el caso de niños que no manifiestan sintomatología hasta 3 meses después de nacer, se suele presentar en formas menos graves y que son de naturaleza neurológica y ocular.^{12, 13, 39}

En pacientes inmunocompetentes con toxoplasmosis sintomática, suele presentarse linfadenopatía cervical, además de cefalea, malestar general, fatiga y fiebre. En menores casos se presentan mialgias, faringitis, dolor abdominal, erupción maculopapilar, meningoencefalitis y alteraciones de la conciencia.⁸

TRATAMIENTO

En la actualidad, no existe un tratamiento satisfactorio para el control de la toxoplasmosis. Los avances en el estudio de acción de agentes antimicrobianos y su actividad contra *Toxoplasma gondii*, se deben al reciente aumento de pacientes con encefalitis toxoplásmica en cuadros con SIDA. En el tratamiento se utilizan combinaciones de sulfonamidas (sulfadiacina, sulfametacina y sulfameracina) junto con inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa (RDHF). Las primeras inhiben la sintetasa del ácido dihidrofólico (pirimetamina), interfiriendo con la utilización del ácido para-aminobenzoico por el parásito y las segundas actuando como antagonistas del ácido fólico y folínico, evitando así que *Toxoplasma gondii* pueda llevar a cabo la síntesis de su RNA. La combinación más utilizada es la de pirimetamina con sulfadiacina, ya que esta última potencia la acción de la primera. Como ambos fármacos tienen efecto anti-fólico, debe administrarse ácido folínico o folinato de calcio.¹⁸

RESPUESTA INMUNE CONTRA *Toxoplasma gondii*

La infección primaria por *Toxoplasma gondii* induce una respuesta inmune específica que protege contra una reinfección.⁸ Después de la infección, se presentan inmunidad de tipo humoral y celular contra el parásito.

Respuesta inmune humoral

La inmunidad humoral se demuestra por la presencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en el suero. La primer clase (IgM) aparece al final de la primer semana después de la primo infección (figura 3).⁴⁰ Se pensó que estos anticuerpos eran característicos de la fase aguda, pero se han encontrado meses o incluso años después, sobre todo en mujeres embarazadas y pacientes con toxoplasmosis adquirida que desarrollaron linfadenopatía.^{44, 45}

Las inmunoglobulinas de clase A aparecen poco después que las IgM, teniendo una cinética similar a la última, y persistiendo durante 6-7 meses, aunque puede variar en pacientes adultos y recién nacidos con infección congénita.⁴⁵⁻⁴⁷ Juega un papel importante en la inmunidad de la mucosa oral contra la infección por el parásito.⁴³ Para diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis congénita, su detección es de gran valor, ya que puede ser detectada en ausencia de IgM.⁴⁰

Son pocos los estudios sobre la aparición de anticuerpos IgE. Son detectables durante la fase aguda de la infección y pueden ser producidos por algunos recién nacidos con infección congénita. Su presencia regularmente se relaciona con la presencia de complicaciones, como adenopatías y coriorretinitis en casos de reactivaciones en pacientes inmunodeprimidos.^{40, 48}

Los anticuerpos IgG aparecen 2 a 3 semanas después de la primo infección, alcanzando sus máximos niveles a los 2 meses y persistiendo a lo largo de meses o años.⁴¹⁻⁴³ Juegan un papel importante en la protección al feto, ya que es capaz de cruzar la barrera placentaria.⁴⁰

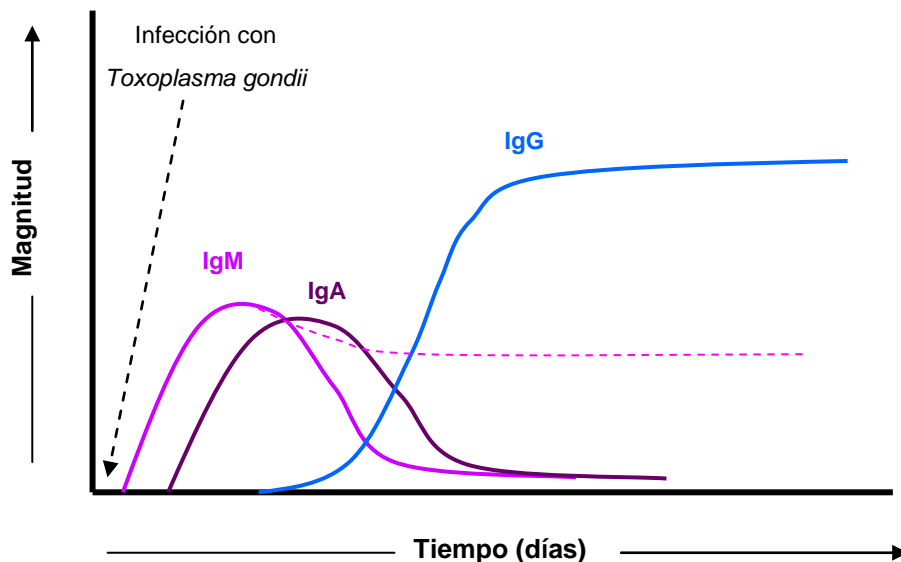


Figura 3. Cinética de la respuesta inmune humoral a partir de una primoinfección con *Toxoplasma gondii*.

Respuesta inmune celular

La infección por *T. gondii* tiene como característica presentar una fuerte y persistente respuesta inmune mediada por células, para protección del hospedero contra el parásito.^{34,43} Durante la fase activa de la infección, en la que hay invasión a células, multiplicación y liberación de taquizoítos, puede haber interacción con células presentadoras de antígenos, las cuales procesarán al taquizoíto y lo presentarán a través de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés).⁴³

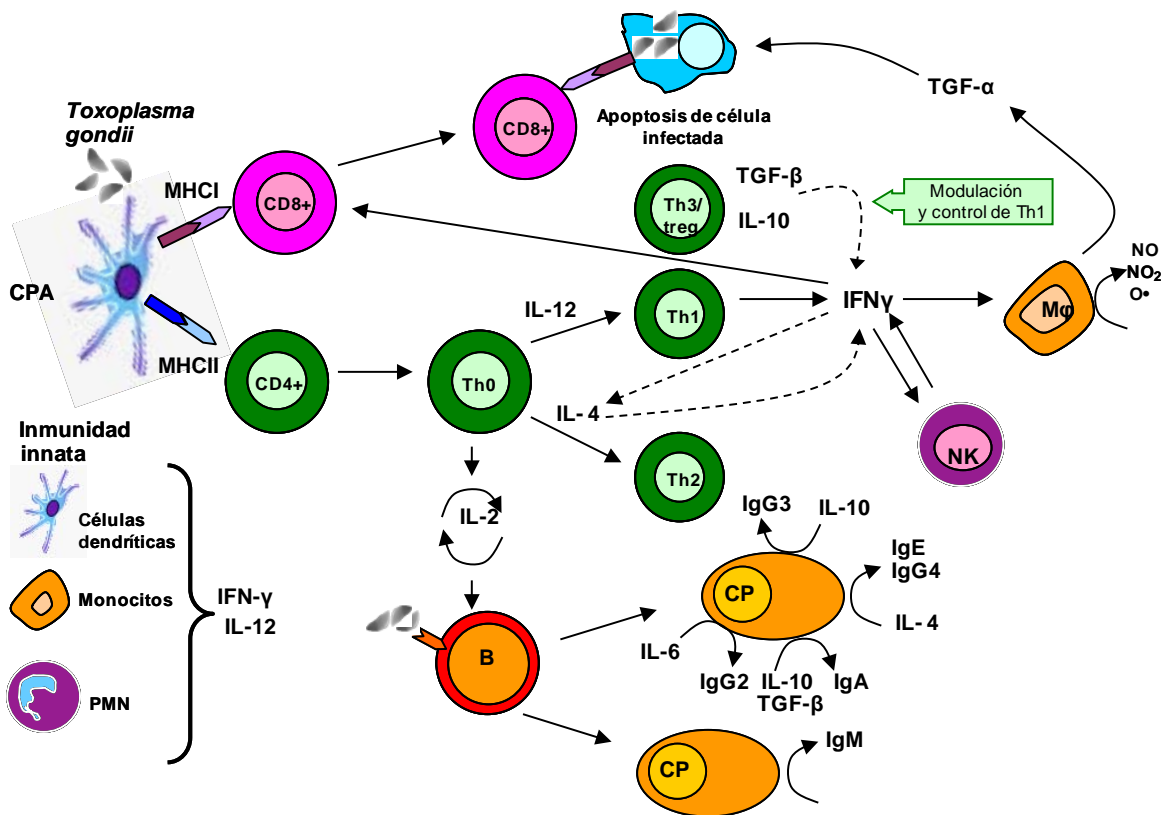


Figura 4. Respuesta inmune celular contra infección por *Toxoplasma gondii*. CPA: célula presentadora de antígeno; MHC I y II: complejo mayor de histocompatibilidad clases I y II; NK: células natural killer; PMN: polimorfonucleares; CP: células plasmáticas; Ig: inmunoglobulina, TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; M ϕ : macrófago; IFN γ : interferón gamma; IL: interleucina; La línea continua y la punteada representan regulación positiva y negativa respectivamente.

Si son presentados por MHC clase I serán reconocidos por los linfocitos T CD8+, llevándose a cabo el proceso de citotoxicidad para finalmente producirse la apoptosis de células infectadas. Por otro lado, si son presentados a través de antígenos clase II, interactuarán con linfocitos T CD4+. Si se encuentran citocinas como la interleucina 12 (IL- 12), se desarrollará una respuesta tipo Th1, para luego liberar interferón – gamma (IFN - γ) que a su vez activará a macrófagos y células NK, que son capaces de controlar la replicación del taquizoíto y activar a más linfocitos T CD8+ y CD4+. ⁴³

Si al inicio de la infección hay IL-4 en el medio, característica de una respuesta tipo Th2, no podrá haber control de la replicación parasitaria. ⁴³ Sin embargo, una respuesta Th1 prolongada o exacerbada provoca una respuesta inflamatoria excesiva, la cual puede incluso ocasionar la muerte al huésped, por lo que debe haber un control mediado por la interleucinas tipo Th3/Treg IL-10 y TGF- β . ⁷⁵

Al inicio de la infección, los linfocitos T CD4+ liberan IL-2 que activan a linfocitos B, los cuales se diferenciarán a células plasmáticas y dan origen a anticuerpos séricos dirigidos contra antígenos del parásito. ⁴³ Por otro lado, algunos antígenos interactuarán directamente con receptores de linfocitos B, los cuales producirán anticuerpos clase IgM característicos de la infección aguda. ⁸

RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO

Con ayuda del marcaje con yodo radiactivo de la superficie de los taquizoitos y la electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas solubilizadas de la membrana, se ha podido demostrar la existencia de cinco proteínas principales cuyos pesos moleculares son 43, 35, 30, 23 y 22 kilodaltones (kDa). ^{49, 50} Dichas proteínas se han estudiado para su uso en vacunas y diagnóstico serológico.

La proteína p30 es la más abundante, la cual constituye el 5% del peso total del taquizoíto y tiene la particularidad de que no se expresa en bradizoitos o esporozoítos. ⁴⁹⁻⁵¹ A través de la clonación del gen de p30 y secuenciación de la proteína, se ha observado que es altamente conservada entre distintas cepas de

Toxoplasma gondii.⁵² Esta proteína es muy inmunogénica, induciendo la producción de anticuerpos IgG IgM e IgA y se ha empleado para el diagnóstico de infección aguda en adultos y recién nacidos con infección congénita.^{50,53-60}

Otra proteína que también ha sido clonada es la p22, la cual se emplea en forma recombinante para detectar IgG en inmunoblots y en el ELISA, aunque presenta una sensibilidad menor con anticuerpos IgA e IgM.^{61, 62}

También se han estudiado antígenos de excreción-secreción, obtenidos a partir de taquizoitos en cultivos de tejidos, los cuales constituyen el 90% del antígeno del parásito que circula en el hospedero.⁶³⁻⁶⁶ Los antígenos más estudiados son el p23 y el p28. La p23 es reconocida frecuentemente por los sueros de los pacientes con infección crónica y con menos frecuencia de aquellos con infección aguda.⁶⁷

DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii*, se pueden llevar a cabo las siguientes técnicas:

Estudios de gabinete

Para reforzar el diagnóstico clínico de la toxoplasmosis, se llevan a cabo estudios como la tomografía axial computarizada (TAC), la resonancia magnética nuclear (RM) y la radiografía para ver calcificaciones cerebrales.

Identificación histológica

La presencia de taquizoítos y bradizoítos a partir de biopsias de tejidos corporales son demostrables con la tinción de Wright, hematoxilina eosina, ácido peryódico Schiff, inmufluorescencia específica y tinción con inmunoperoxidasa.

Aislamiento del parásito

El aislamiento de *Toxoplasma gondii* a partir de líquidos corporales como sangre o líquido cefalorraquídeo, refleja una infección aguda en el paciente; sobre todo después de inocular el líquido en la cavidad peritoneal de ratones sanos y comprobar la presencia del parásito de 6 a 10 días después de la inoculación en el líquido peritoneal. La sensibilidad de este método en el diagnóstico de la infección aguda es de aproximadamente 90%; aunque presenta la desventaja del riesgo de contaminación y el tiempo de espera para la obtención del resultado.¹⁶

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Consiste en efectuar una replicación repetitiva *in vitro* de una secuencia específica de DNA.⁷⁶ Al amplificar o copiar varias veces una misma secuencia se aumenta en forma proporcional la sensibilidad de la misma. El producto amplificado se analiza en un gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio. Clínicamente, se ha empleado con buenos resultados para detectar la presencia de *T. gondii* en líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejidos.⁶⁸

Inmunodiagnóstico

Prueba de Sabin y Feldman

Su fundamento consiste en observar taquizoítos vivos que pierden su afinidad para ser teñidos por el azul de metileno cuando están en contacto con un anticuerpo específico, mientras que los parásitos no tratados por éstos, se colorean intensamente.²¹ Los inconvenientes de este método son que determina anticuerpos totales y que depende del uso de parásitos vivos, por lo que implica un riesgo de contaminación.¹⁶

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Esta prueba consiste en la fijación de taquizoítos en un portaobjetos, los cuales se ponen en contacto con el suero del paciente a distintas diluciones. Posteriormente son adicionados anti-anticuerpos conjugados a sustancias fluorescentes. La respuesta antígeno anticuerpo se identifica por microscopía de fluorescencia. Se han observado falsos positivos en muestras que contienen factor reumatoide y factor antinuclear en la IgM- IFI.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Este método descrito en 1971 por Envall y Perlman, consiste en utilizar anticuerpos conjugados a una enzima que se unen a anticuerpos presentes en el suero del paciente, los cuales conservan su capacidad de unión específica al antígeno. Este sistema consiste en adsorber a una fase sólida el antígeno o el anticuerpo, mientras la enzima es capaz de producir una reacción de óxido reducción, en la cual el sustrato se convierte en un producto colorido.

Existen diversos tipos de ELISA: directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto que sólo detecta anticuerpos. En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima. En cambio, en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno. En los de captura, el conjugado enzima-anticuerpo se une al antígeno antes fijado a un primer anticuerpo, adsorbido a la fase sólida. Las enzimas más empleadas son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG). Los sustratos para la enzima HPR son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos que se oxidan y desarrollan color. La más empleada es la *o*-fenilendiamina (OPD), que continúa en forma soluble después de ser

oxidada. Los sustratos para la FA son el *p*-nitrofenil fosfato y el 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato.⁶⁹

Prueba de Aidez

Este método fue descrito en 1989 por Hedman y se basa en las distintas fuerzas de unión entre el antígeno y el anticuerpo en la infección aguda y la crónica. Estudios demuestran que en las primeras semanas después de la infección, predominan anticuerpos IgG de baja avidez, sugiriendo una fase aguda; mientras que en las siguientes semanas o meses predominan las IgG de alta avidez, lo cual es indicativo de infección crónica. La avidez de anticuerpos IgG se puede determinar por ELISA indirecto, colocando las muestras por duplicado y después incubadas, una de ellas con agentes desnaturizantes como la urea, el cual disocia los complejos antígeno anticuerpo de baja avidez. El resultado es el cociente de la absorbancia de la muestra tratada entre la no tratada con urea. Un valor bajo refleja una etapa más temprana de infección.⁷⁰

Western blot

Es una técnica inmunoenzimática, basada en la unión de anticuerpos específicos presentes en el suero de los pacientes al estar en contacto con antígenos de *Toxoplasma gondii* presentes en una membrana de nitrocelulosa. Los antígenos proteicos son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida, después son transferidos e inmovilizados en la membrana. Posteriormente a la reacción antígeno anticuerpos se le agrega un segundo anticuerpos unido a una enzima, siendo visible la reacción mediante un sustrato y un cromógeno, el cual revelará las bandas en la membrana que reconocieron los anticuerpos específicos. Debido a que es una prueba muy sensible y específica, se ha empleado como prueba confirmatoria.⁷¹

Dot – ELISA

Es una variante del ELISA, también conocida como inmuno punto o dot blot, en el cual se emplea una membrana de nitrocelulosa como soporte para el acoplamiento del antígeno o el anticuerpo. Se utilizan sustratos cromogénicos que al cambiar de color simultáneamente precipitan, dejando una marca oscura en la membrana. Es la base de técnicas rápidas de diagnóstico de uso frecuente en la actualidad.⁶⁹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen varias pruebas de diagnóstico presuntivo de fase aguda de toxoplasmosis que implican la identificación de anticuerpos específicos de clase IgA o IgM por métodos indirectos, como el “western blot” y el ELISA. Sin embargo, los anticuerpos del tipo IgM e IgA presentan una afinidad más baja que la presentada por los de tipo IgG; esto complica su identificación a través de un método indirecto, ya que hay competencia por la unión específica al antígeno en muestras que contengan esta última inmunoglobulina. Por lo tanto, se requiere de una prueba de captura, que permite identificar específicamente anticuerpos IgA o IgM, eliminando así la IgG presente en la muestra.

Existen reportes de aumento en la sensibilidad sin afectar la especificidad, al considerar conjuntamente los resultados de la identificación de IgA e IgM por separado en ensayos de aglutinación-inmunsorbente (ISAGA) y ELISA, pero no se ha reportado la estandarización y validación de un ELISA de captura en el que se determinen ambos anticuerpos en un mismo pozo, en muestras de suero de adultos o de recién nacidos.⁷²

JUSTIFICACIÓN

Para dar un diagnóstico de sospecha de toxoplasmosis aguda se recomienda el uso de dos o tres ensayos de escrutinio, puesto que se puede obtener un resultado negativo por una prueba y uno positivo por otra, siendo la tercera, la que confirma el diagnóstico. Lo anterior es importante, ya que se disminuye el número de resultados falsos positivos, y por ende se evita dar tratamiento (que es altamente tóxico) a pacientes que no lo requieren. También se reduce el número de falsos negativos, con lo que se favorece el tratamiento del paciente infectado.

La determinación de IgA e IgM en la misma muestra, por medio de ensayos separados, aumenta la sensibilidad. Entonces, si se recomienda realizar 3 ensayos para cada isotipo, se tendrían que realizar 6 pruebas de escrutinio por cada muestra. La identificación de ambas inmunoglobulinas en un mismo pozo, reduciría el costo en tiempo e insumos de cada ensayo, con un aumento en la sensibilidad de cada método y garantizaría la identificación de pacientes con ambas o una sola inmunoglobulina.

HIPÓTESIS

- La sensibilidad del ELISA de captura para diagnóstico de toxoplasmosis aumentará si se consideran conjuntamente los resultados de identificación de anticuerpos IgA e IgM anti *Toxoplasma gondii*, ya sea en diferentes o en el mismo pozo

OBJETIVO

- Estandarizar y validar el ELISA de captura de anticuerpos tipo IgA e IgM contra *Toxoplasma gondii* en muestras humanas de suero

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

Estandarización y validación de una técnica; transversal, comparativo.

ESTRATEGIA GENERAL

Fase I. Producción de anticuerpo IgG de conejo biotinilado contra Toxoplasma gondii

A un conejo de la raza Nueva Zelanda, se le tomó una muestra basal, cuyo suero serviría como control negativo. A dicho conejo se le infectó con 30 millones de taquizoítos de la cepa RH. El conejo se sangró, determinándose el título de anticuerpos IgG por ELISA indirecto utilizando un extracto crudo de taquizoítos como antígeno (EC). Los anticuerpos de las muestras de suero que correspondieron a la fase aguda como a la fase crónica de la infección, se purificaron por cromatografía de afinidad con sefarosa – proteína A; la cual es afín a la porción Fc de IgG. Dicha IgG se acopló con biotina, funcionando como conjugado (Figura 5).

Fase II. Estandarización del ELISA de captura de IgA o IgM

Para estandarizar el ELISA de captura se determinaron las concentraciones de anticuerpo de captura (anti IgA y/o anti IgM humanas), las diluciones de suero, las concentraciones de antígeno y la dilución de conjugado (IgG biotinilada), por medio de pruebas de dilución de anti IgA o anti IgM, por curvas de dilución del suero y ensayos de respuesta anti P30 del anticuerpo IgG biotinilado por ELISA indirecto (Figuras 5-7).

El diseño del ELISA de captura de IgA y/o IgM, consistió en forrar placas de poliestireno de alta adherencia con un anticuerpo anti IgA y/o anti IgM comercial. A

estos anticuerpos se les unieron las inmunoglobulinas A y/o M anti *Toxoplasma gondii* que se encuentren presentes en la muestra de suero. Estos últimos reconocieron al antígeno P30 y/o EC de *T. gondii*, que a su vez fue reconocido por el conjugado de IgG anti – *T. gondii* de conejo marcado con biotina. Esta última es una molécula pequeña, fácil de conjugarse a proteínas y que tiene como particularidad ser extraordinariamente afín a la avidina, que conjugada a peroxidasa, funciona como marcador permitiendo obtener una señal más sensible (Figuras 5 y 8)

Fase III. Validación de cada ELISA de captura

Para la validación de las ELISAs de captura de IgA e IgM, se determinará la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos, valores predictivos negativos y el índice de concordancia kappa para ambas pruebas, utilizándose al menos 30 muestras como controles negativos y 30 como controles positivos previamente confirmadas para cada tipo de inmunoglobulina en estudio.

Considerando a la sensibilidad y a la especificidad, como datos cualitativos, se determinaron a través de tablas de doble entrada para su representación numérica. Posteriormente, para determinar un criterio de positividad o negatividad en la prueba, se calculará el punto de corte a partir de curvas ROC, en las que se representan tanto los diversos valores de sensibilidad como de especificidad. El mejor punto de corte corresponderá a aquel en el que se tengan los valores de sensibilidad y especificidad óptimos.

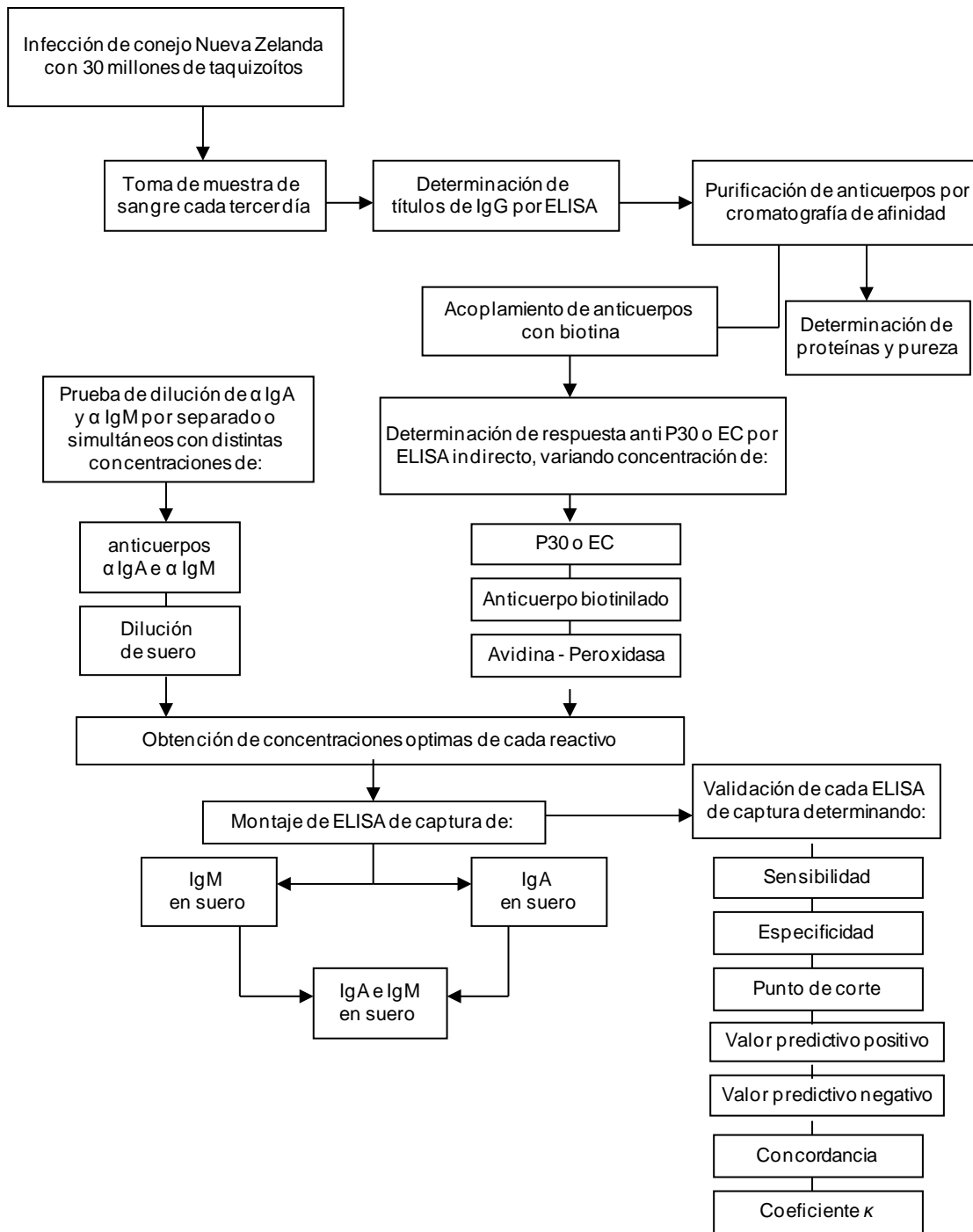


Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia general

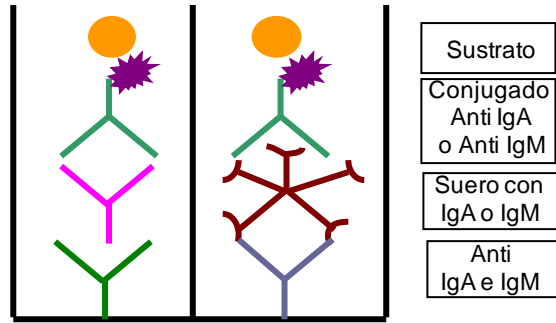


Figura 6. Diseño de ELISA indirecto para pruebas de dilución de anti anticuerpos por curvas de dilución de suero.

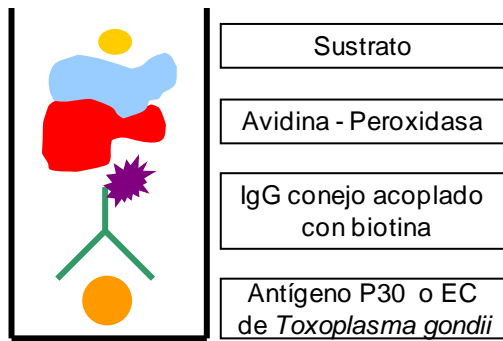


Figura 7. Diseño de ELISA indirecto para ensayos de respuesta de IgG biotinilada a p30 o EC

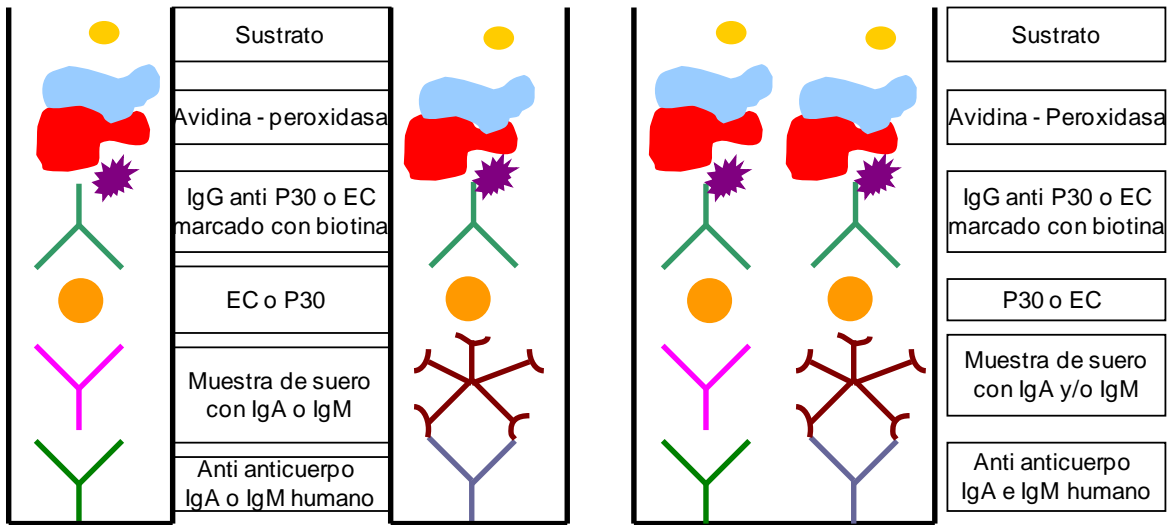


Figura 8. Diseño de ELISA de captura de IgA o IgM por separado (izquierda) o simultánea (derecha).

MÉTODOS DE LABORATORIO

Obtención de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* para infección de conejo

Se descongelaron los taquizoítos y se colocaron en medio RPMI con suero fetal bovino al 9%. Se centrifugaron 7 minutos a 3,700 rpm, y se resuspendieron con solución de NaCl 0.15 M, amortiguada con fosfatos 0.01 M pH 7.2 (PBS). Con 300 μ L de esta suspensión, se infectó un ratón Balb/C vía intraperitoneal, y se dejó tres días para que los taquizoítos se reactivaran. Se realizó lavado de peritoneo, y se sacó el líquido peritoneal con un conteo de 90 millones de células (taquizoitos). Se calculó el volumen que correspondiera a 30 millones y se centrifugaron a 3700 rpm durante cinco minutos, resuspendiéndose en 1 mL de PBS.

Obtención de antígeno de *Toxoplasma gondii*

Los taquizoítos obtenidos del exudado peritoneal de los ratones se resuspendieron en PBS. Se centrifugó a 1,200 rpm 5 minutos, para eliminar *debris* celulares; en caso necesario, se bajó la velocidad de centrifugación hasta obtener un grado de pureza de >90 % de los taquizoítos. Se resuspendió en una solución comercial (Sigma) que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa. En un recipiente con hielo se sonicó 3 veces a 7 hz durante períodos de 1 minuto con descansos intermedios de 5 minutos. Dicho sonicado se centrifugó a 10,000 x g durante 1 hora a 4° C; el sobrenadante se fraccionó y se almacenó a -70° C hasta su uso. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford con el reactivo comercial de Bio-Rad.⁷³

Antígeno P30 (sag1)

El antígeno P30 de *Toxoplasma gondii*, corresponde a una proteína recombinante de la marca Labsystems con una concentración de 20 mg/mL.

Obtención de suero de conejo infectado con Toxoplasma gondii

A un conejo de la raza Nueva Zelanda de 2.5 - 3 kg de peso y 2 – 3 meses de edad, se le tomó una muestra de 3 mL de la vena “marginal” de la oreja para obtener 1.5 mL de suero (suero pre). Posteriormente se infectó con 30 millones de taquizoitos suspendidos en 1 mL, por vía intraperitoneal. El conejo se sangró con intervalos de 7 días durante 4 meses. La sangre obtenida se incubó 15 minutos a 37° C para que coagulara. Se centrifugó a 2,500 rpm 5 minutos. Se determinaron títulos de anticuerpos IgG de cada una de las fracciones de suero de conejo por ELISA indirecto, utilizando el suero pre como control negativo. Se sangró al conejo cuando los títulos fueron mayores a 1:32,000. Se identificaron las muestras y se almacenaron a – 20° C hasta su uso.

ELISA indirecto para suero de conejo

A placas para ELISA de poliestireno (Maxisorp, NUNC), se colocaron a cada pozo 100 µL de antígeno P30 y/o EC diluido a 1 y 2 µg/mL respectivamente, en solución amortiguadora de carbonatos 0.015 M pH 9.6. La placa se incubó a 4° C durante toda la noche. Se lavó 3 veces por 5 minutos, con 200 µl de PBS con Tween 20 al 0.05% v/v (PBS-T). Posteriormente se lavó 2 veces con PBS. A cada pozo se le adicionaron 100 µL de solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-T para bloquear los sitios libres, dejando incubar 30 minutos a 37° C. Se repitieron los lavados. Se colocaron 100 µL en cada pozo de suero de conejo diluido 1:200 con PBS – T y se dejaron incubando 2 horas a 37° C. Se repitieron los lavados. Se

colocaron 100 μL de conjugado anti IgG de conejo - peroxidasa diluido 1:5000 con PBS – T y se dejó incubando 2 horas a 37° C. Se repitieron los lavados. En cada pozo se colocaron 100 μL de la solución de sustrato/cromógeno que contiene, por cada 10 ml de una solución 0.1 M de citratos: 4.5 μl de H_2O_2 al 30% y 4.5 mg de o-fenilendiamina. Se incubó hasta que los pozos correspondientes a los blancos comenzaron a dar fondo. Se añadieron 50 μL de ácido sulfúrico 1N para detener la reacción enzimática. Se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

Purificación de IgG de conejo contra *Toxoplasma gondii*

El suero obtenido del conejo infectado se pasó por una columna de sefarosa con proteína A de *Staphylococcus aureus*, la cual tiene afinidad por la fracción Fc de las inmunoglobulinas que en su mayoría son IgG, quedándose adsorbida por interacciones no covalentes. Se dejó incubando toda la noche a 4° C. La columna se lavó con PBS para eliminar el resto de las proteínas del suero. Se eluyó con solución de glicina 0.1 M pH 2.5 para desprender la IgG de la columna. El eluido anterior se dializó contra PBS para eliminar la glicina. A la IgG obtenida, se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford, utilizando un estuche comercial de Bio – rad ⁷³ y se realizó un análisis electroforético en geles de poliacrilamida al 11 %, de acuerdo al método de Laemmli, ⁷⁴ para verificar su pureza.

Obtención de IgG marcada con biotina

La IgG de conejo se ajustó a 1 mg/mL con amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 8.0, y se dializó contra la misma solución durante toda la noche a 4° C. Se disolvieron 3 mg de N – hidroxí - succinimido éster de biotina en un mililitro de dimetil sulfóxido (DMSO); por cada mg de proteína se adicionaron 200 μL de la mezcla anterior; dejándose incubar durante cuatro horas en agitación intermitente

en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se dializó contra PBS, para eliminar el exceso de biotina.

Inmunopunto o dot de ELISA

A círculos de 7 mm de membrana de nitrocelulosa en tubos de ensaye, se acoplaron 5 μ L de IgG biotinilada y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS-T y dos con PBS, eliminando el sobrenadante. Los sitios libres se bloquearon con 50 μ L de leche descremada al 5% en PBS –T durante 30 minutos a temperatura ambiente y se repitieron los lavados. Las membranas se incubaron con 50 μ L de conjugado avidina – peroxidasa diluida 1:500 en PBS-T por 30 minutos a temperatura ambiente. Se repiten lavados. Se hizo reaccionar con 100 μ L sustrato de dot de ELISA. La aparición de un tono azulado o negro reveló reacción positiva, parándose con H₂O destilada.

Adsorción de anticuerpos anti IgA y anti IgM humanas con reconocimiento inespecífico

Se diluyó IgG de conejo anti *Toxoplasma gondii* de fase crónica, a una concentración de 25 μ g/mL en PBS y se sensibilizaron pozos de poliestireno de alta adherencia con un volumen de 100 μ L. Se dejó incubar a 4° C toda la noche. Se eliminó la solución y se secó. Se lavó 3 veces (5 minutos cada lavado) con 200 μ L por pozo con PBS-T y 2 veces con PBS. A cada pozo se le adicionaron 100 μ L de solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-T para bloquear los sitios libres, incubándose 30 minutos a 37° C. Se repitieron los lavados con PBS-T y PBS. Se agregaron 100 μ L de anti IgA o anti IgM humana obtenidos en cabra en PBS-T a 5 μ g/mL y se incubó 2 horas a 37° C. Se lavaron los pozos con PBS-T y PBS. El sobrenadante se recuperó y se utilizó en el ELISA de captura. Se lavó con PBS-T y PBS. En cada pozo se colocaron 100 μ L del conjugado de IgG anti

cabra-peroxidasa y se dejó incubar 2 horas a 37° C. Se repiten los lavados con PBS-T y PBS. En cada pozo se colocaron 100 µL de solución de sustrato/cromógeno. Se dejó incubar hasta que los pozos correspondientes a los blancos comenzaron a dar fondo. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50 µL de ácido sulfúrico 2N. Se leyó en un lector de ELISA a una $\lambda = 490$ nm.

ELISA de captura anticuerpos para muestras de suero humano

Se diluyeron los anticuerpos de captura en solución amortiguadora de boratos 0.15 M, pH 8.0, a 5 µg/mL, y se sensibilizaron los pozos de poliestireno de alta adherencia con un volumen de 100 µL, dejándose incubar a 4° C durante toda la noche. Se eliminó la solución, vertiendo la placa y secando el exceso sobre una gasa. Se lavó 3 veces (5 minutos cada lavado) cada pozo con 200 µL de solución salina 0.15M amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.2 (PBS), con Tween 20 al 0.05% v/v (PBS-T) y 2 veces con PBS. A cada pozo se le adicionaron 100 µl de solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-T para bloquear los sitios libres, incubándose 30 minutos a 37° C. Se repitieron los lavados con PBS-T y PBS. Se agregaron 100 µL de suero humano a la dilución 1:40 en PBS-T y se incubó 2 horas a 37° C. Se lavaron los pozos con PBS-T y PBS. La mezcla antígeno p30 y extracto crudo (EC) se disolvió en PBS-T 0.05% a 1 µg/mL y 2 µg/mL respectivamente y se adicionaron 100 µL en cada pozo, dejándose incubar 2 horas a 37° C. Se lavó con PBS-T y PBS. En cada pozo se colocaron 100 µL de de la mezcla de conjugado de IgG de conejo anti *Toxo* acoplado a biotina de fase aguda y crónica disuelto en PBS-T 25 µg/mL cada una y se dejó incubar 2 horas a 37° C. Se repiten los lavados con PBS-T y PBS. La avidina peroxidasa se diluyó 1:1000 en PBS-T y se adicionaron 100 µL en los pozos, dejando incubar 2 horas a 37° C y repitiendo los lavados. En cada pozo se colocaron 100 µL de solución de sustrato/cromógeno. Se dejó incubar hasta que los pozos correspondientes a los blancos comenzaron a dar fondo. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50 µL de ácido sulfúrico 2N. Se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

DEFINICION DE VARIABLES

Variable independiente

Grupo: infectado y control. Variable cualitativa, nominales y dicotómicas.

Variables dependientes:

Resultado del ELISA: positivo o negativo. Variable cualitativa, nominal y dicotómica.

Resultado del ELISA: absorbancia. Variable numérica continua

RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de esta tesis fue la estandarización de un ELISA de captura de IgA e IgM contra *Toxoplasma gondii* en muestras de suero, para el cual se llevaron a cabo varios pasos.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO IgG DE CONEJO DE TOXOPLASMA GONDII ACOPLADO A BIOTINA

Para el diseño del ELISA de captura (figura 8), se requirió de la producción de una IgG acoplada a biotina, proveniente de un conejo infectado con taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. En primer lugar se determinó la respuesta de anticuerpos IgG contra el extracto crudo del parásito de las fracciones de suero del conejo el día de la infección y a diferentes tiempos posteriormente. Como se observa en la figura 9, los anticuerpos comenzaron a elevarse a partir del día 21 post infección, hasta llegar al día 42, a partir del cual se mantuvieron constantes.

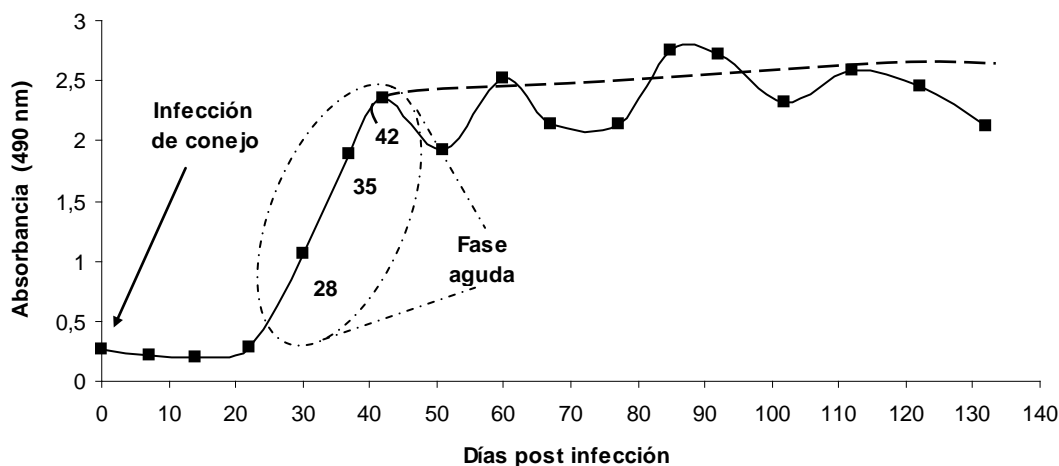


Figura 9. Respuesta de muestras seriadas de suero de conejo infectado contra el extracto crudo de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, por ELISA indirecto. Extracto crudo 2 $\mu\text{g/ml}$, dilución de suero 1:500, conjugado anti IgG de conejo-peroxidasa 1:5000. La línea punteada horizontal representa la tendencia de la infección de fase crónica.

Inicialmente se purificaron los anticuerpos del suero de la última muestra del conejo, que corresponden al día 140. Paralelo a esto, y considerando la respuesta de los sueros al antígeno, se decidió utilizar también las muestras de los días 28, 35 y 42, que contendrían anticuerpos IgG de fase aguda. Lo anterior es importante, ya que para el ELISA de captura se utilizaría antígeno p30, que corresponde a una proteína de la superficie del taquizoíto altamente inmunogénica y que está asociada a la fase aguda de la infección.

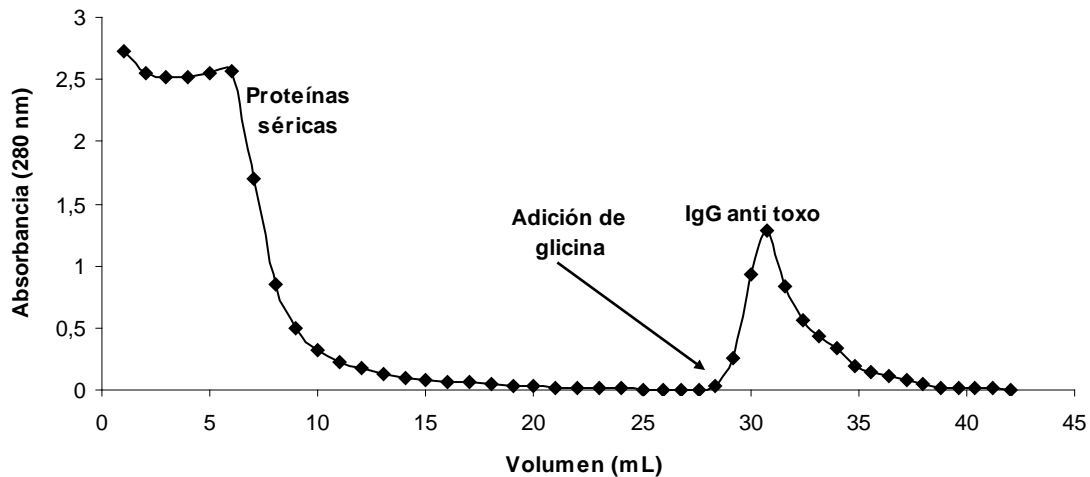


Figura 10. Purificación IgG anti *Toxoplasma gondii* a partir de suero de conejo infectado con taquizoítos, correspondiente a la fase aguda de infección.

La IgG de las muestras de suero de conejo infectado de los días 28, 35, 42 y 140 se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa-proteína A. Las fracciones de proteínas colectadas fueron las que se obtuvieron en el segundo pico (figura 10), es decir, después de la adición de glicina y con una absorbancia mayor a 0.05, a una longitud de onda de 280 nm. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se verificó su pureza por medio de un gel de acrilamida (figura 11), observándose una banda de 150 kDa, que corresponde a la IgG, así como las bandas de 50 y 25 kDa de las cadenas pesadas y ligeras de la misma, reveladas en condiciones reductoras. Como referencia, la banda del extremo izquierdo de aproximadamente 68 kDa corresponde a la albúmina sérica bovina.

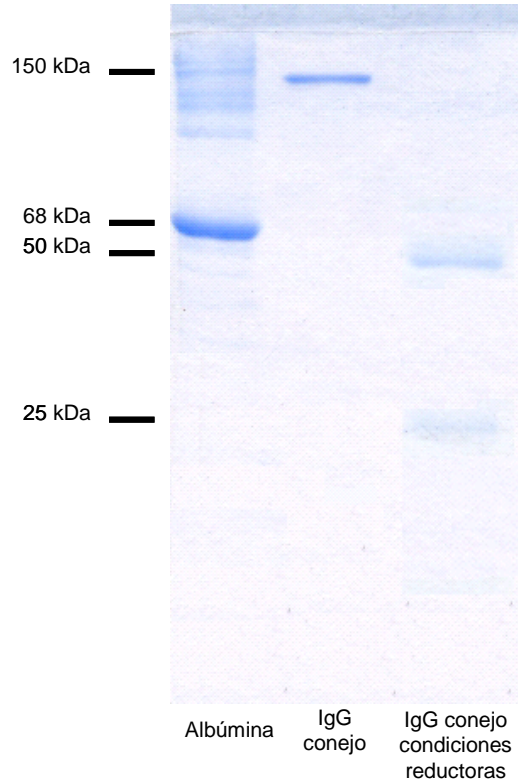


Figura 11. Electroforesis en gel de acrilamida-SDS al 11%, del patrón de bandas de la IgG de conejo purificada, en condiciones reductoras y no reductoras, teñido con azul de Coomasie. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular.

Los resultados anteriores demuestran que efectivamente se logró purificar la IgG del suero del conejo. Se procedió a verificar la actividad de los anticuerpos de fase aguda y fase crónica, por lo que se realizó un ELISA indirecto, utilizando p30 y extracto crudo de taquizoíto como antígeno, a varias diluciones de IgG. La dilución se determinó tomando en cuenta que la concentración aproximada en suero de la IgG es de 10 mg/mL. En la figura 12 puede verse que hay una respuesta similar al extracto crudo entre el suero de conejo positivo para IgG contra *Toxoplasma gondii* y la IgG de fase crónica purificada.

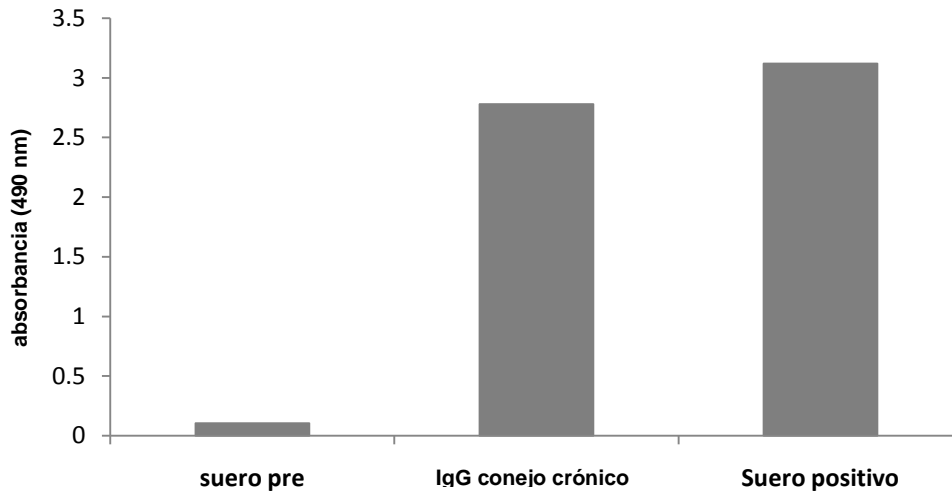


Figura 12. ELISA indirecto de IgG de conejo de fase crónica purificada contra extracto crudo del taquizoíto. EC 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, suero de conejo e IgG purificada de fase crónica 1:500, conjugado anti IgG de conejo 1:5000.

Semejante al ensayo anterior, en la figura 13 se puede observar que la respuesta anti p30 del suero positivo y el de la IgG de fase aguda purificada tienen un comportamiento similar.

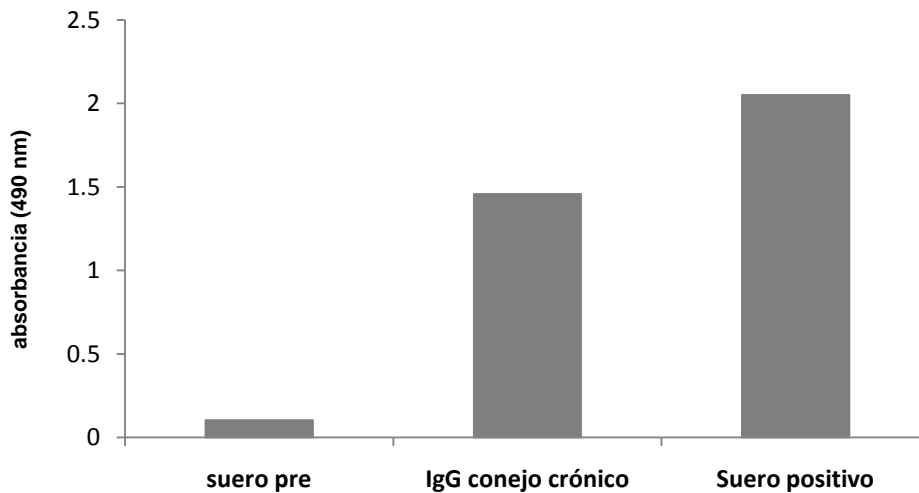


Figura 13. ELISA indirecto de IgG de conejo de fase aguda purificada contra el antígeno P30 de Toxoplasma gondii. P30 a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, suero de conejo e IgG de fase aguda 1:500, conjugado anti IgG de conejo-peroxidasa, 1:5000.

Adicionalmente se llevó a cabo un ensayo para probar la respuesta de la IgG de fase aguda al extracto crudo del taquizoíto, observándose un bajo reconocimiento (figura 14). Así mismo, la respuesta de IgG de fase crónica al antígeno p30, se observó mucho menor en comparación de la IgG de fase aguda (figura 15).

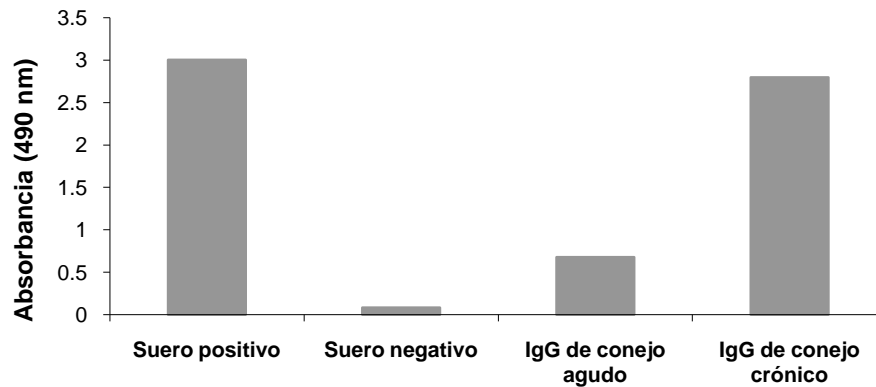


Figura 14. ELISA indirecto de IgG de conejo de fase crónica y fase aguda purificada contra el extracto crudo del taquizoíto. EC 2 µg/mL, suero de conejo en fase crónica e IgG purificada 1:500, conjugado anti IgG de conejo 1:5000.

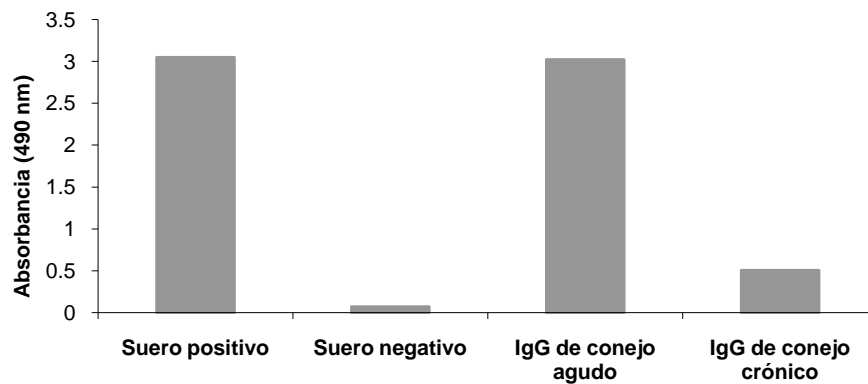


Figura 15. ELISA indirecto de IgG de conejo de fase crónica y aguda purificada contra el antígeno p30. P30 1 µg/mL, suero de conejo 1:500, conjugado anti IgG de conejo 1:5000.

Posteriormente se hizo el acoplamiento de la IgG de conejo de fase aguda y crónica a biotina, lo cual se demostró por medio del Dot de ELISA (figura 16).

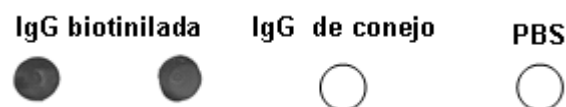


Figura 16. Corroboración del acoplamiento de la biotina a la IgG de conejo por Dot de ELISA.

ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA DE CAPTURA DE IgA O IgM

En esta fase, para estandarizar el ELISA de captura, se realizaron varios ensayos preliminares:

Ensayos de respuesta anti extracto crudo y anti P30 del anticuerpo IgG de fase aguda y crónica biotinilados por ELISA indirecto

Ya acoplados los anticuerpos a la biotina, se volvió a probar su respuesta con ambos antígenos. En la figura 17, se observa que a 50 µg/mL de IgG de fase crónica biotinilada, se obtenía buena respuesta sin utilizar una concentración alta de extracto crudo (2 µg/mL). Esta concentración de biotinilado se utilizó para el resto de los ensayos previos al de captura.

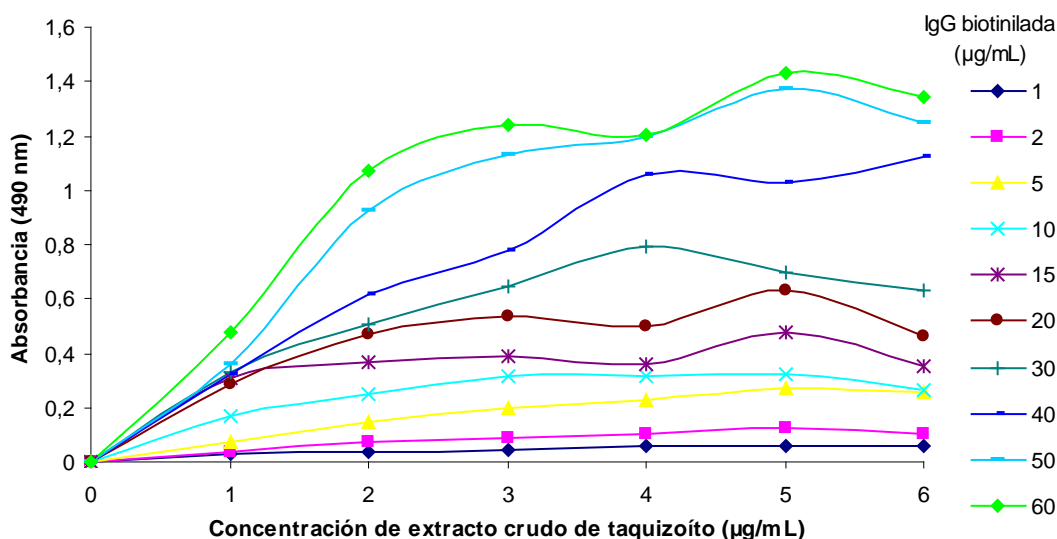


Figura 17. Respuesta del conjugado de IgG de fase crónica acoplado a biotina a varias concentraciones de Extracto crudo de taquizoíto de *Toxoplasma gondii* por ELISA indirecto. Avidina-Peroxidasa 1:4000.

Para el caso de la IgG de fase aguda, se obtuvo una buena respuesta a partir de 50 µg/mL; utilizando una concentración de 1 µg/mL de p30, la cual ya había sido probada en el laboratorio para otros ensayos indirectos (Figura 18).

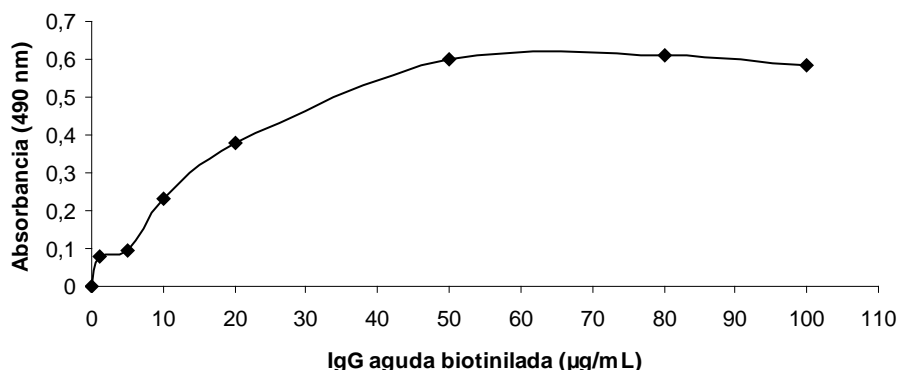


Figura 18. Curva de saturación del conjugado de IgG de fase aguda de conejo, acoplado a biotina contra el antígeno P30 de Toxoplasma gondii por ELISA indirecto. Avidina-Peroxidasa 1:400, P30 1 µg/mL.

Adicionalmente a los dos ensayos anteriores, se practicó un ELISA indirecto para conocer la respuesta de ambos conjugados biotinilados tanto a p30 como al extracto crudo (EC) del taquizoíto. Se vuelve a observar la gran respuesta de la IgG crónica biotinilada al EC, sobre todo a partir de 4 µg/mL de EC, y no así con p30. Para el caso de la IgG de fase aguda, su respuesta a la p30 es más discreta y al EC casi comparable con el suero pre de conejo (figura 19).

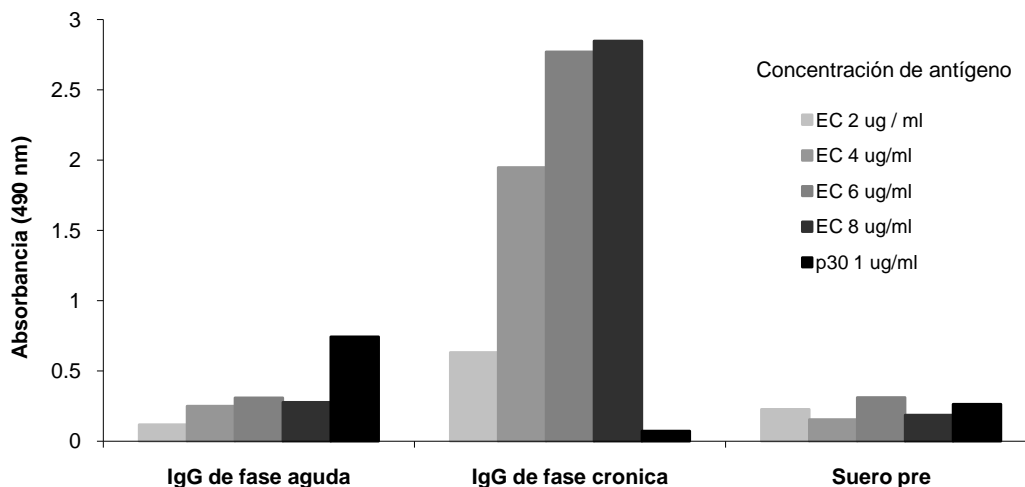


Figura 19. Respuesta observada de IgG biotinilada de fase aguda y crónica al antígeno p30 y extracto crudo (EC) por ELISA indirecto. Concentración de IgG biotinilada aguda o crónica 50 µg/mL, suero pre 1:200 de conejo, Avidina-Peroxidasa 1:4000.

Pruebas de dilución óptima de los anticuerpos anti IgA o anti IgM

La siguiente fase de la estandarización, consistió en realizar ensayos de dilución de los anticuerpos de captura anti IgA o anti IgM humana obtenidos en cabra a distintas concentraciones de suero. En la figura 20 se observa que para el caso de la IgA, a la dilución de suero 1:40, junto a las concentraciones de anti IgA humana 5 o 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se obtiene una mayor respuesta.

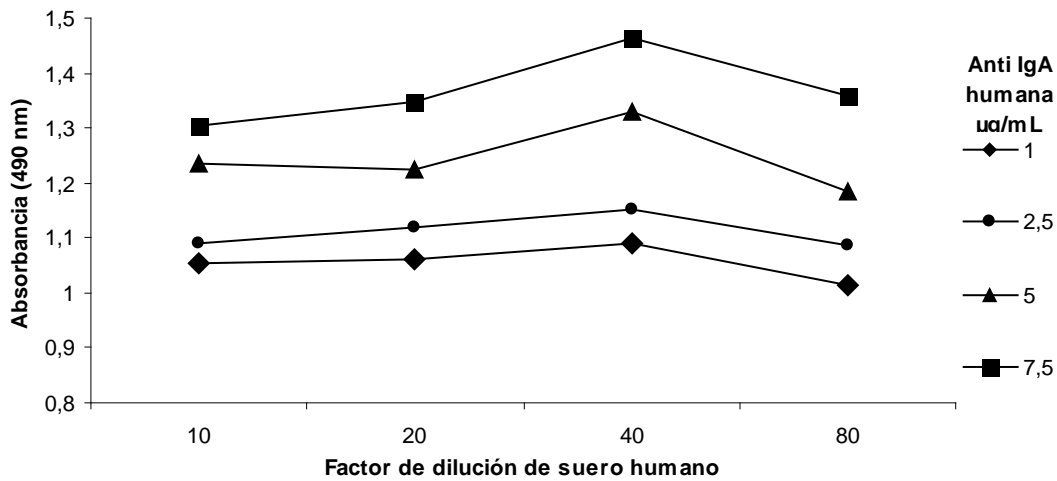


Figura 20. Resultados del ELISA de captura de IgA total, usando varias concentraciones de anti- IgA humana y diluciones de suero. Conjugado anti IgA humana-Peroxidasa 1:1000.

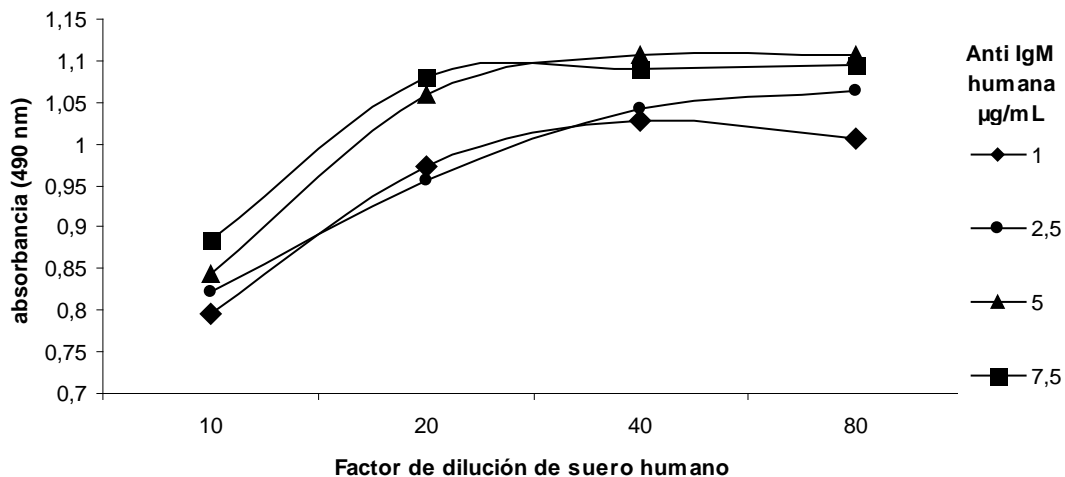


Figura 21. Resultados del ELISA de captura de IgM total, usando varias concentraciones de anti- IgM humana y diluciones de suero. Conjugado anti IgM humana-Peroxidasa 1:1000.

Sin embargo, en la figura 21, se puede observar la respuesta obtenida en la captura de IgM total, en donde no se observa una diferencia en la respuesta a partir de la dilución 1:20 de suero, junto con el anticuerpo de captura a una concentración de a 5 o 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para descartar reacciones inespecíficas entre los anticuerpos de captura y las proteínas del suero, se elaboraron ensayos con el mismo diseño de los dos anteriores, con la única variante de revelar al mismo tiempo con conjugados anti IgA y anti IgM – peroxidasa, tanto para IgA como para IgM. Sin embargo, como se aprecia en la figura 22, ambos anticuerpos de captura reaccionaban cruzadamente con las dos inmunoglobulinas en estudio; aunque se observó una mayor especificidad en el sistema de captura de IgA.

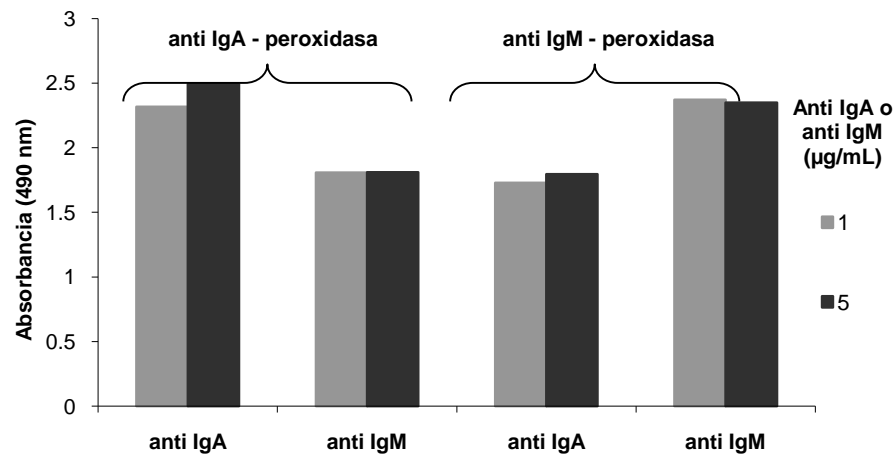


Figura 22. Respuesta inespecífica observada entre los anticuerpos anti IgA e IgM por ELISA indirecto. Concentración de anti IgA y anti IgM 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y conjugados anti IgM y anti IgA peroxidasa 1:1000.

ELISA de captura preliminar

Debido a lo anterior se decidió realizar un ELISA de captura, utilizando sueros positivos a IgA o IgM anti-*Toxoplasma gondii* y un suero referente negativo a anticuerpos, utilizando como antígenos extracto crudo, antígeno p30 y una mezcla de ambos.

En la figura 23 se ve la diferencia de absorbancia en la captura de IgA entre el referente positivo y el referente negativo, principalmente en la combinación en la que se utiliza extracto crudo (EC) y una mezcla de IgG biotinilada de fase aguda y crónica. La desventaja del sistema, es que en el referente negativo se observa un fondo de absorbancia muy alto.

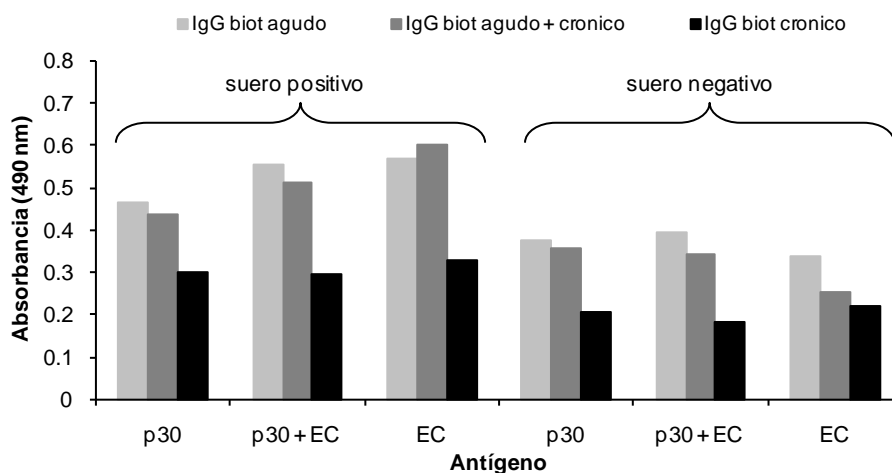


Figura 23. ELISA de captura de IgA anti *Toxoplasma gondii*, utilizando anti IgA 5 µg/ml; suero 1:40; antígeno p30 1 µg/ml, Extracto crudo (EC) 2 µg/ml y p30 1 µg/ml + EC 2 µg/ml; IgG biot aguda, IgG biot crónica e IgG biot aguda + crónica (relación 1:2) 50 µg/ml y conjugado avidita-peroxidasa 1:1000.

En el caso de la captura de IgM (figura 24), no se aprecia una clara diferencia entre el referente positivo y el referente negativo, siendo la combinación de EC con IgG biotinilada de fase aguda la que presentó la mayor diferencia relativa. Como en el caso de la captura de IgA, también se advierte un fondo muy amplio de absorbancia.

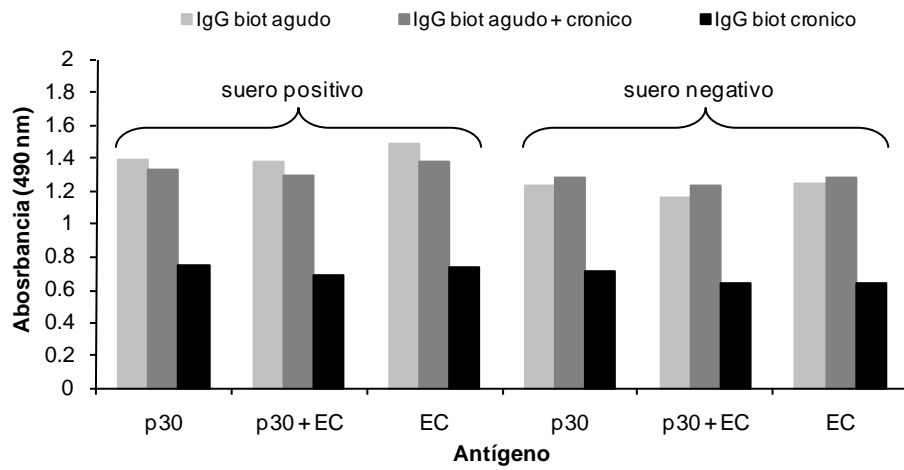


Figura 24. ELISA de captura de IgM anti *Toxoplasma gondii*, utilizando anti IgM 5 µg/ml; suero 1:40; antígeno p30 1 µg/ml, Extracto crudo (EC) 2 µg/ml y p30 1 µg/ml + EC 2 µg/ml; IgG biot aguda, IgG biot crónica e IgG biot aguda + crónica (relación 1:2) 50 µg/ml y conjugado avidita-peroxidasa 1:1000.

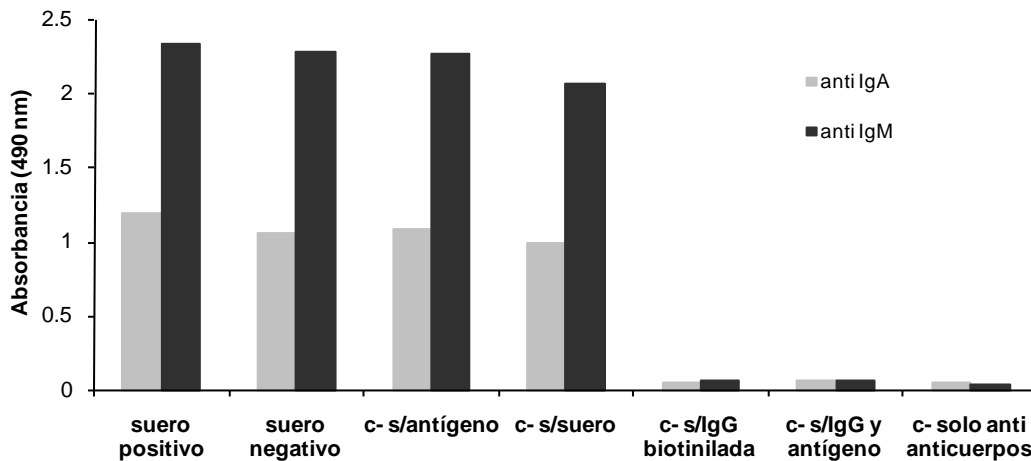


Figura 25. ELISA de captura de IgA y IgM anti *Toxoplasma gondii* con sus respectivos controles negativos de placa. Anti IgA o anti IgM 5 µg/ml; suero 1:40; p30 1 µg/ml + EC 2 µg/ml; IgG biot aguda + crónica (relación 1:2) 50 µg/ml y anti IgA peroxidasa 1:1000.

Por lo anterior, se hizo un ensayo de captura en el que se definieron varios referentes negativos de la placa, en los que se eliminaba el antígeno o suero o IgG biotinilada o bien todos; con la finalidad de determinar con cuáles de los componentes del sistema había reacción cruzada. De acuerdo a los resultados obtenidos, se consideró que posiblemente la IgG de conejo biotinilada reconoce a los anticuerpos de captura o bien al suero humano (figura 25).

Considerando los resultados anteriores, se decidió llevar a cabo una adsorción de anti IgA y anti IgM para eliminar los anticuerpos que pudieran estar reconociendo la IgG de conejo biotinilado y que por tal razón hubiera una absorbancia muy alta en el referente negativo. En la figura 26 se observa la respuesta del anticuerpo de cabra anti IgA humana que quedó en la placa, a la IgG de conejo de fase crónica después de la primera y segunda adsorción, la cual fue disminuyendo.

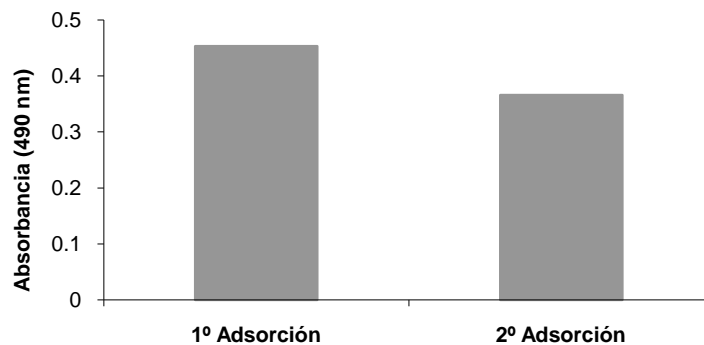


Figura 26. Reconocimiento observado por la anti IgA humana de cabra a la IgG de conejo crónico en la primera y segunda adsorción, por ELISA indirecto. IgG conejo 25 µg/ml, anti IgA humana de cabra 5 µg/ml, conjugado anti cabra-peroxidasa 1:1000.

Se determinó la respuesta a los sueros de conejo y humano, de los sobrenadantes de la 1ª y 2ª adsorción, para así verificar que los anticuerpos que reaccionaban con el conejo se hubieran eliminado. Se percibió una disminución en la respuesta al suero de conejo a partir de la primera adsorción; la respuesta al suero humano también fue menor, pero no significativamente (figura 27).

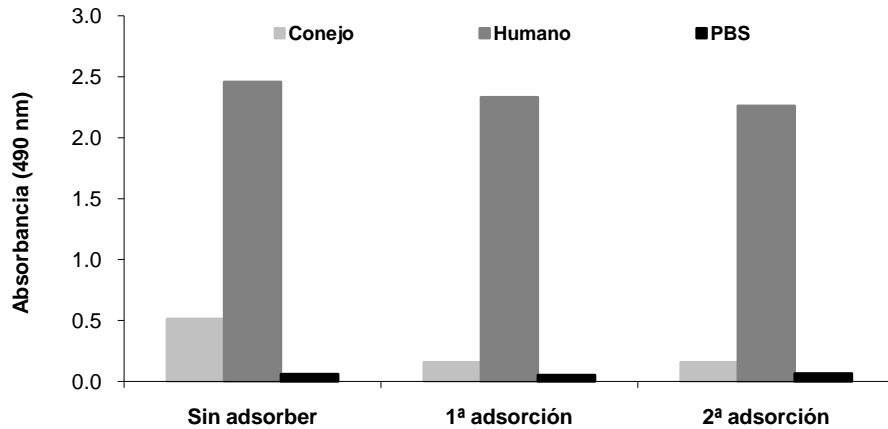


Figura 27. ELISA indirecto de la respuesta a suero de conejo y humano de la anti IgA humana de cabra sin adsorber, a la 1ª y 2ª adsorción. Sueros 1:100, Conjugado anti cabra-peroxidasa 1:1000, anti IgA humana 5 µg/ml.

Del mismo modo se llevó a cabo una adsorción de anticuerpos IgM, pero en este caso la reacción inespecífica de éstos al suero de conejo no cambió, por lo que se realizó un nuevo ensayo de captura con la anti IgM adsorbida (figura 28).

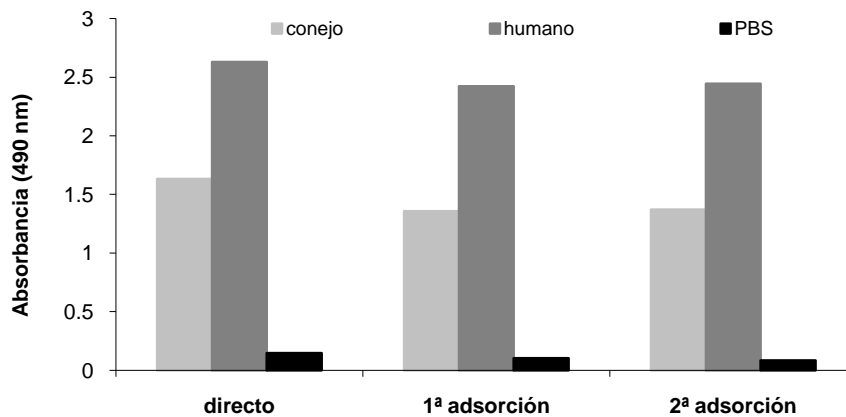


Figura 28. ELISA indirecto de la respuesta a suero de conejo y humano de anti IgM humana de cabra sin adsorber, a la 1ª y 2ª adsorción. Sueros 1:100, Conjugado anti cabra-peroxidasa 1:1000, anti IgM humana 5 µg/ml.

Con los anticuerpos anti IgA adsorbidos una vez, se realizó nuevamente un ELISA de captura con referentes negativos y positivos (figura 29). Se puede ver una disminución en la absorbancia de fondo. Para el caso del referente positivo, se nota una buena respuesta utilizando la mezcla del extracto crudo y p30 del parásito en 1.5 o 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la mezcla de IgG biotinilada de fase aguda y fase crónica a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

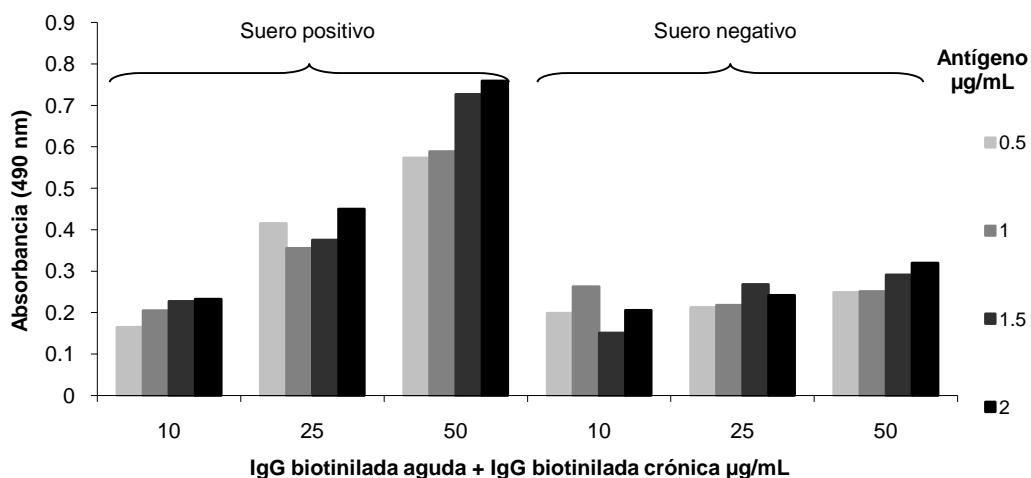


Figura 29. ELISA de captura de IgA anti *Toxoplasma gondii*, utilizando anti IgA adsorbida una vez, a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; suero 1:40; Antígeno 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (EC+ p30 relación 1:3), IgG biot aguda + crónica (relación 1:2) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y conjugado anti IgA peroxidasa 1:1000.

Para determinar si hay reconocimiento inespecífico de los conjugados biotinilados de IgG de conejo a las proteínas del suero humano y a cuáles, se realizó un western blot, transfiriendo en membranas de nitrocelulosa, suero humano y taquizoítos como referente positivo. Ambas se hicieron reaccionar con IgG de conejo biotinilado crónico, agudo, IgG de conejo y conjugado anti IgG humano. Se observa un reconocimiento claro de ambas IgG de conejo biotinilado a las proteínas del suero humano, aunque la de fase crónica es mas fuerte (figura 30).

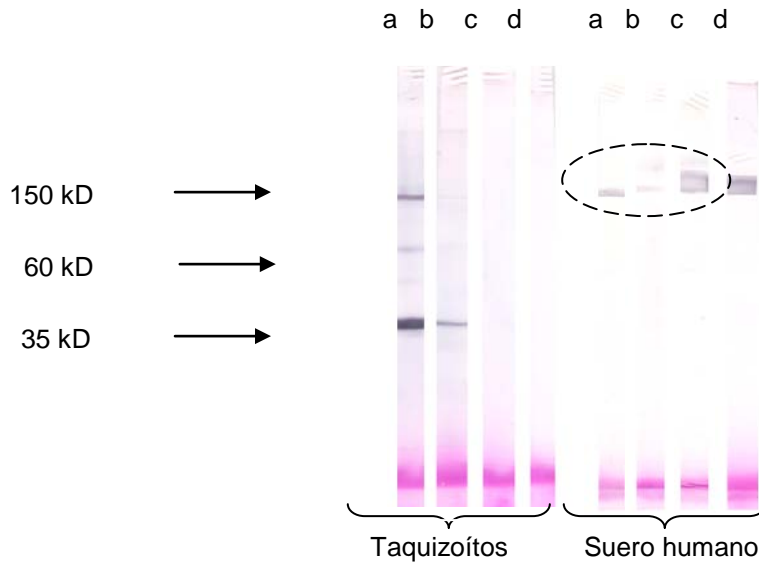


Figura 30. Western blot de taquizoítos o suero humano probados con IgG biotinilada de fase crónica (a), aguda (b), IgG de conejo sin (c) y conjugado anti IgG humana (d). IgG crónica, aguda y sin biotinilar 100 µg/ml, avidina peroxidasa 1:1000, conjugado anti IgG de conejo 1:1000, conjugado anti igG humana 1:1000.

ELISA de captura con IgG biotinilada incubada con suero

Pensando en eliminar las reacciones inespecíficas, se hizo nuevamente un ELISA de captura de IgA e IgM, incubando previamente la IgG de conejo con suero humano a varias diluciones por una hora a 37°C. Se utilizó un suero positivo y uno negativo para cada inmunoglobulina, encontrándose mayor diferencia en las muestras con IgG de conejo incubadas con suero 1:10 para IgA. En el caso de la IgM, solamente se notó disminución en la absorbancia, pero la reacción de los sueros positivos y el negativo fue similar (Figura 31).

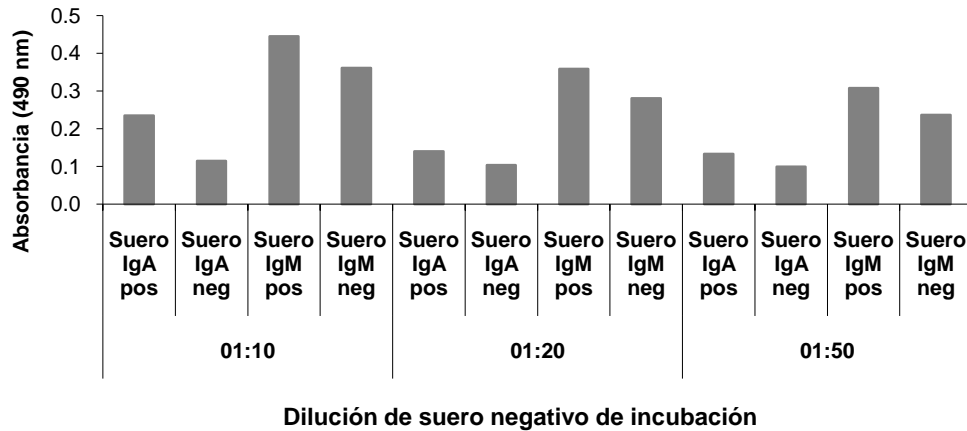


Figura 31. ELISA de captura de IgA e IgM anti Toxoplasma gondii, incubando la IgG de conejo biotinilado con suero humano negativo. Anti IgA y anti IgM 5 µg/ml; muestras de suero 1:40; p30 1 µg/ml + EC 2 µg/ml, IgG biot aguda + crónica 50 µg/ml y avidina - peroxidasa 1:1000

De acuerdo a los resultados anteriores en los que no se logra eliminar el fondo de reacción para la determinación de IgM, se efectuó solamente un ELISA de captura para IgA con varios sueros probados por ELISA indirecto y se compararon gráficamente, encontrándose una correlación positiva, aunque relativamente baja entre ambos métodos (Figura 32).

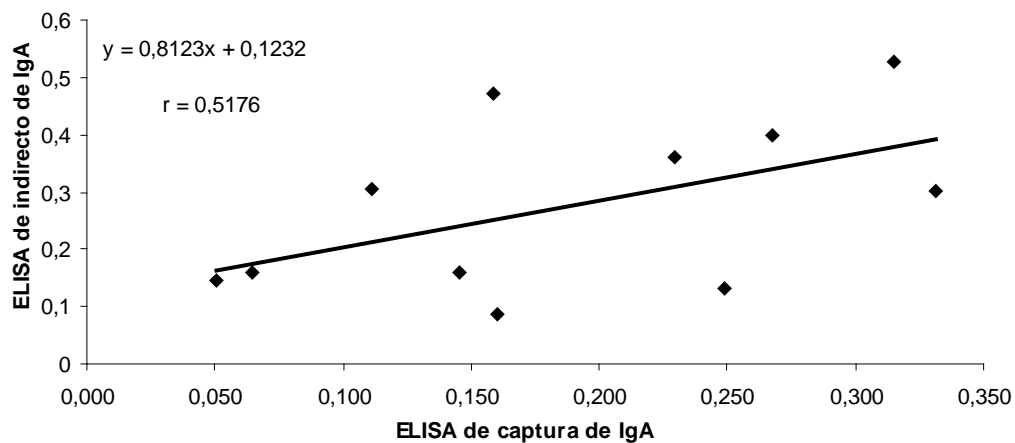


Figura 32. Correlación entre ELISA indirecto de IgA y ELISA de captura de IgA anti Toxoplasma gondii, incubando la IgG de conejo biotinilado con suero humano negativo. Anti IgA, muestras de suero 1:40; p30 1 µg/ml + EC 2 µg/ml, IgG biot aguda + crónica (relación 1:2) 50 µg/ml y avidina - peroxidasa 1:1000.

ANALISIS DE RESULTADOS

La infección por *Toxoplasma gondii* suele ser asintomática en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, en mujeres embarazadas, una primo-infección puede dar lugar a la forma congénita, la cual es muchas veces grave. Durante el embarazo es importante la confirmación de infección aguda, ya que el tratamiento a tiempo evitará la transmisión y presencia de secuelas en el bebé.¹² Por tal razón, es importante demostrar la presencia de anticuerpos de clase IgM o IgA en una muestra sospechosa de toxoplasmosis, pues de ello puede depender el seguimiento de un caso agudo o el descarte de uno crónico. Además, en el caso de la toxoplasmosis congénita estas clases tienen valor diagnóstico en el recién nacido, pues no pasan la barrera placentaria.⁸² Sin embargo, la identificación de anticuerpos IgA e IgM anti *Toxoplasma gondii* por métodos indirectos suele resultar de baja sensibilidad, ya que existe competencia por el antígeno por parte de los anticuerpos IgG, que son de mayor afinidad y concentración en el suero. Por tal razón, se requiere de un ensayo de captura que permita la identificación de los anticuerpos en estudio y, que a su vez, elimine las inmunoglobulinas G presentes en la muestra. De acuerdo con esto, este trabajo se concentró en la estandarización de un ELISA de captura de IgA e IgM en muestras de suero humanas, utilizando un conjugado de IgG de un conejo infectado experimentalmente acoplado a biotina. Aunado a lo anterior, se consideró la determinación simultánea de ambos anticuerpos en un mismo pozo, ya que se ha reportado un aumento en la sensibilidad, además de reducir el tiempo y costo en los ensayos.⁷² Por tal motivo se inició estandarizando los métodos de captura por separado, ya que los resultados servirían de referencia para el método simultáneo. En los resultados previos a la estandarización del ELISA de captura tanto para IgA como para IgM, se reiteró la importancia de obtener anticuerpos anti p30 de *Toxoplasma gondii*, ya que esta proteína se expresa en el taquizoíto durante la fase aguda de la infección, y en la cual se producen ambos anticuerpos. La respuesta anti p30, sólo se observó en los anticuerpos IgG obtenidos en la fase aguda de la infección del conejo, ya que aquellos producidos durante la fase

crónica sólo reconocieron al extracto crudo del taquizoíto en donde predominan otros antígenos.

Originalmente se consideró estandarizar un ELISA de captura que determinara simultáneamente IgA e IgM, pero se decidió no llevarlo a cabo debido a los resultados en los ensayos de dilución óptima de los anticuerpos de captura anti IgA y anti IgM, que presentaban un reconocimiento cruzado entre las dos inmunoglobulinas.

En los ensayos preliminares del ELISA de captura de IgA e IgM, se obtuvo un fondo de reacción muy alto en el suero referente negativo, aunque para el de IgA fue menor. Pero al analizar los negativos en los que se eliminaban uno o dos componentes del ELISA de captura (ya sea suero, IgG biotinilada o antígeno), se observó que la IgG del conejo biotinilada presentaba reacción cruzada tanto con el suero humano como con los anticuerpos de captura anti IgA y anti IgM; aunque el sistema del IgA fue más específico.

Inicialmente se eliminaron las proteínas de los anticuerpos de captura anti IgA y anti IgM, reconocidas por la IgG de conejo biotinilada, adsorbiéndolas en placas forradas con IgG de conejo, disminuyendo así el fondo de reacción; aunque los controles negativos de la placa siguieron presentando fondos altos. Posteriormente mediante western blot, se encontró que la IgG del conejo anti *Toxoplasma gondii*, tanto de la fase aguda como de la crónica, reconocía una proteína de aproximadamente 150 kD del suero humano que corresponde a la inmunoglobulina G. Esto último nos hace pensar que puede haber proteínas expresadas en el taquizoíto que simulen a las del humano y que pudieran funcionar como parte de un proceso de evasión inmunológica del mismo parásito. Para eliminar este reconocimiento inespecífico, se utilizó la IgG biotinilada incubada con suero humano negativo. En el caso de la IgM, no hubo diferencia en la absorbancia entre el positivo y el negativo, por lo que no se volvió a probar el método para esta inmunoglobulina. La razón del resultado anterior se puede deber a la interferencia del factor reumatoide (FR) que pueda estar presente en el suero del paciente. Es importante recordar que el FR se compone de una serie de autoanticuerpos (de la clase IgM) que generalmente reaccionan inespecíficamente

con distintos epítomos de las moléculas de IgG, por lo que se considera el responsable fundamental de la presencia de falsos positivos.⁸¹ En este caso el uso de anticuerpos policlonales, como el de conejo, impide establecer un método de captura de IgM, ya que presenta reacción contra las proteínas del suero humano y a las del mismo anticuerpo de captura y no nos permite eliminar la interferencia del FR; por lo que se considera más viable el uso de anticuerpos monoclonales, pues se pueden escoger algunos que no presenten reacción cruzada hacia el resto de los componentes del ensayo.

Para el caso de la IgA, se observó una diferencia mayor entre el suero positivo y el negativo. Por lo tanto, y considerando que sólo se había probado un suero referente positivo y uno negativo, se utilizaron varios sueros previamente probados por ELISA indirecto de IgA, y se relacionaron al resultado del de captura, encontrándose una correlación positiva, aunque relativamente baja. Esto se puede deber a que en el método indirecto no se elimina la IgG de la muestra, por lo que hay mayor competencia por el antígeno, presentándose falsos negativos; al mismo tiempo, el ensayo indirecto es más sensible que el de captura, por lo que en los casos negativos a IgG u otras clases se detectan valores más altos. Desafortunadamente no se cuenta con un panel suficiente de muestras positivas confirmadas para IgA, por lo que no fue posible determinar la sensibilidad y especificidad del método, lo cual amerita un mayor análisis.

CONCLUSIONES

- La respuesta al antígeno p30 o al extracto crudo del taquizoíto es un criterio para establecer la fase de infección por *Toxoplasma gondii*.
- El anticuerpo policlonal del conejo biotinilado no funciona para el método de captura de IgM.
- El uso de anticuerpos monoclonales es recomendable en ensayos de captura de IgM.
- El objetivo se cumplió parcialmente, ya que se estandarizó el ELISA de captura de IgA, obteniendo una correlación positiva con el método indirecto.

PERSPECTIVAS

Los métodos de captura de anticuerpos IgM e IgA son usados ampliamente para descartar la fase aguda de la infección por *Toxoplasma gondii*. La idea de buscarlos en el mismo pozo sigue siendo un objetivo del laboratorio donde se llevó a cabo el proyecto presente. Sin embargo, las reacciones cruzadas de la IgG de un conejo infectado con las propias inmunoglobulinas del hospedero dificultaron el terminar con un doble ensayo. Los anticuerpos monoclonales contra la p30 serían la fuente más adecuada para el conjugado que revela la presencia del parásito en el ensayo.

Por otro lado, es muy importante que los anticuerpos de captura tengan una alta especificidad por la clase homóloga, y no den reacciones cruzadas con otras, especialmente con IgG. Por ello, deben usarse productos comerciales probados con otras clases o bien producir anticuerpos monoclonales.

BIBLIOGRAFIA

1. Speer CA, Clark S, Dubey JP. 1998. Ultrastructure of the oocyst, sporocyst and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 84: 505-512.
2. Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 607-623.
3. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol; 30:1217-1258.
4. Dubey JP. 2002. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. J Parasitol. 88: 713-717.
5. NICOLLE C & MANCEAUX. 1908. Sur une infection á corpus de Leishman (ous organisme voisins) DU GONDII. C.R. Acad Dci (Paris), 147, 763 – 766.
6. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 167: 8963-896.
7. Dubey, J.P. 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. Journal of Parasitology 84:862-865.
8. Ambroise-Thomas P, Petersen E. 2000. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, Francia. 324 pp.
9. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet. 350: 173-177.

10. Dubey JO, Murrel KD, Fayer R, Schad FA. 1986. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. J Am Vet Med Assoc. 188:1035-1037.
11. Villavedra M, Battistoni J, Nieto A. 1999. IgG recognizing 21-24 kDa and 30-33 kDa tachyzoite antigens show maximum avidity maturation during natural and accidental human toxoplasmosis. Rev Inst Med Trop S Paulo 41:297-303.
12. Galván Ramírez ML, Soto JL, Velasco Castrejón O, Pérez M. R. 1995. Incidence of anti-Toxoplasma antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. Rev Soc Bras Med Trop. 28: 333-337;
13. Jenum PA, Stray-Pedersen B. 1998. Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. J Clin Microbiol. 36: 2907-2913.
14. Roch E. 1965. Toxoplasmosis congénita. Estudios realizados en México. Sal Pub Mex. 7: 509-512.
15. Gross U, Holpert M, Goebel S. 2004. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. Ann Ist Super Sanità 40:65-70
16. Galván-Ramírez ML, Mondragón-Flores R. 2001. Toxoplasmosis humana. Ediciones Cuellar. México. 196 pp.
17. Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C, Llausás A, Tapia-Conyer R, Gutiérrez G, Sepúlveda J. 1991. Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. Sal Pub Mex. 34: 222-229.

18. Boyer KM. 2000. Congenital toxoplasmosis: Current status of diagnosis, treatment, and prevention. *Seminars in Pediatric Infect Dis.* 11: 165-171.
19. Dubey J.P. Toxoplasmosis. 1994. *J Am Vet Med Assoc*, 205:1593-1598.
20. Roch E. 1965. Toxoplasmosis congénita. Estudios realizados en México. *Sal Pub Mex.* 7: 509-512.
21. Sabin AB, Feldman HA. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108:660.
22. Goldsmith RS, Kagan IG, Zárate R, Reyes-González MA, Cedeno-Ferreira J. 1991. Low *Toxoplasma* antibody prevalence in serologic surveys of humans in southern Mexico. *Arch Invest Med (Mex)*. Jan-Mar;22(1):63-73.
23. Varela G, Roch E, Zavala J. 1961. Estudios sobre toxoplasmosis en México. *Sal Púb Méx* 3:451.
24. Roch E, Varela G. 1966. Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en México. Resultados de 29,883 reacciones de Sabin y Feldman efectuados de 1953 a 1965. *Sal Pub Mex* 26:31-49
25. Góngora-Biachi, R., González-Martínez, P., Castro-Sansores, C., Álvarez-Moguel, R., Pavia-Ruz, N., Lara-Perera, D., Alonzo-Salomón, G., and Palacios-Pérez, E. 1998. Anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en pacientes con VIH en Yucatán. *Rev Invest Clín* 50:419.

26. Alvarado-Esquivel C, Alanis-Quiñones OP, Arreola-Valenzuela MA, Rodríguez-Briones A, Piedra-Nevarez L=1J, Duran-Morales E, Estrada-Martínez S, Martínez-García SA, Liesenfeld O. 2006. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric inpatients in a northern Mexican city. BMC Infect Dis. Dec 19; 6:178.
27. Galván-Ramírez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. 2005. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in blood donors of Jalisco, México. Transfusion 45:281-282.
28. Alvarado-Esquivel C, Mercado-Suarez MF, Rodríguez-Briones A, Fallad-Torres L, Ayala-Ayala JO, Nevarez-Piedra LJ, Duran-Morales E, Estrada-Martínez S, Liesenfeld O, Márquez-Conde JA, Martínez-García SA. 2007. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, Mexico. BMC Infect Dis. Jul 13;7:75.
29. Espinosa de los Reyes VM, Machain AE, Estrada VA, García MP. 1964. Toxoplasmosis humana. Estudios de 329 binomios materno-fetales. Academia Nacional de Medicina 1er Centenario. pp322-327.
30. Bustos-Bahena ML, Cañedo-Solares I, Figueroa-Damián R, Ortiz-Alegría LB, Gutiérrez-Castrellón P, Díaz ML, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Hernandez-Olmedo M, Correa D. Jojutla, Morelos: a highly endemic region for *T. gondii* in Mexico. Study of seroprevalence and risk factors in pregnant women with high and low risk obstetric history (sometido a publicación).
31. Zavala-Velázquez J, Guzmán-Marín E, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix ME. 1989. Toxoplasmosis y abortos en pacientes del hospital O'Horan de Mérida, Yucatán. Sal Pub Mex Sep-Oct;31(5):664-8.

32. Roch E, Bravo-Becherelle MA. 1962. Incidencia de toxoplasmosis congénita en una muestra de 2186 nacidos vivos en la Ciudad de México. Rev Salubridad Enf Trop. 22: 31-49.
33. Vela-Amieva, M., Cañedo-Solares, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Pérez-Andrade, M., González-Contreras, C., Ortiz-Cortes, J., Ortega-Velázquez, V., Galván-Ramírez, M.L., Ruiz-García, M., Saltigeral-Simentel, P., Ordaz-Favila, J.C., Sánchez, C., Correa, D. 2005. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72: 142-144.
34. Fatoohi A.F, Cozon G.J.N, Wallon M, Kahi S, Gay- Andrieu Greenland T, Peyron F. 2003. Cellular Immunity to *Toxoplasma gondii* in Congenitally Infected Newborns and Immunocompetent Infected Hosts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22: 181-184
35. Gross U, Lüder CGK, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, Krczal D, Enders G. 2000. Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC Test) for early diagnosis of congenital Toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 38: 3619-3622.
36. Gomez-Martin JE, Montoya-de-Londono MT, Castano-Osorio JC. 1997. A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío, Colombia and application of mathematical models to estimate incident cases using age-stratified data. Am J Trop Med Hyg 57:180-186.
37. Ferrandiz J, Mercier C, Wallon M, Picot S, Cesaron-Delawar MF, Peyron F. 2004. Limited value of assay using detection of immunoglobulin G antibodies to two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA 6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. Clin. And Diag. Laboratory immunology. Pp 1016.

38. Naessens A, Jenum PA, Pollak A, Decoster A, Lappalainen M, Villena I, Lebech M, Stray-Pedersen B, Hayde M, Pinon JM, Petersen E, Foulon W. 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation. *J. Pediatr.* 135:714-719.
39. Pinon JM, Dumon H, Franck J, Petersen E, Lebech M, Zufferey J, Bessieres MH, Marty P, Holliman R, Johnson J, Luyasu V, Lecolier B, Guy E, Joynson DHM, Decoster A, Enders G, Pelloux H, Candolfi E. 2001 Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mother and Newborns and Standard Methods for Postnatal detection of immunoglobulin G, M and A Antibodies. *J Clin Microbiol.* 39:2267-2271.
40. Filisetti D, Candolfi E. 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 40:71-80.
41. Abbas AK, Lichtman AH, Pober SJ. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th edition. WB Saunders Company, Londres, Inglaterra. 553 pp.
42. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Mentis A & Michalas S. 2002 Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn.* 22: 1107-1111.
43. Denkers EY, Gazzinelli RT. 1998. Regulation and Function of T- Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 11: 569-588.
44. Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli MA & Terragna A. 1989. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol;* 27: 2133–2135.
45. Gorgievski-Hrisoho M, Germann D & Matter L. 1996. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol;* 34:1506–1511.

46. Francis JM & Joynson DH. 1993. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 12: 556–559.
47. Sensini A. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect*; 12: 504–512.
48. Foudrinier F, Villena I, Jaussaud R, Aubert D, Chemla C, Martinot F, Pinon JM. 2003. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*; 41: 1681–1686
49. Handman E, Ghoding JW, Remington JS. 1980. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 124:2578.2583.
50. Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER. 1983. Purification of mayor membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monocloantal antibody. *J Immunol*. 130:2407-2412.
51. Sharma SD, Mullenax J, Araujo FG, Elich HA, Remington JS. 1983. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J Immunol*, 11:977-983.
52. Burg L, Perelman D, Kasper L, Ware P, Boothroyd J. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the mayor surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 141:3584.3591.
53. Bulow R, Boothroyd JC. 1991. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol.*, 147:3496-3500.

54. Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FA, Thulliez P, Susuki Y, Remington JS. 1989. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol.*, 27:2031-2038.
55. Potasman Y, Araujo FG, Desmonts G, Remington JS. 1986. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J Infect Dis*, 164:650-657.
56. Cesbron JY, Capron A, Oviaque G, Santoro F. 1985. Use of a monoclonal antibody in double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* mayor surface proteína (p30). *J Immunol Methods*, 83:151-158.
57. Gross R, Roos T, Appoldt D, Heesemann J. 1992. Improved serological dagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulina A (IgA), and IgM antibodies against p30 using the immunoblot technique. *J Clin Microbiol.* 30:1436-1441.
58. Decoster A, Darcy F, Caron A, and Capron A. 1988. IgA antibodies againt to p30 markers of congenital and acute Toxoplasmosis. *Laucetii.* 1104-1106.
59. Huskinson J, Thulliez P, Remington JS. 1986. *Toxoplasma* antigens recognized by muman immunoglobulin A antibodies. *J. Clin Microbiol.*, 24:1050-1054.
60. Khan IA, Eckel ME, Pfefferkorn ER, Kasper LH. 1988. Production of interferon gamma by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (p30) from *Toxoplasma gondii*. *J infect Dis*, 157:937-984.
61. Couvreur G, Sadak A, Fortier B, dubremetz JF. 1988. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol*, 97:1-10.

62. Parmely SF, Sgariato GD, Mark J, Prince JB, Remington JS. 1992. Expression, characterization and serologic reactivity of recombinant surface antigen p22 of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol, 148:1493-1498.
63. Hughes HP, Van Knapen F, Atkinson HJ, Balfour AH, Lee DL. 1982. A new soluble antigen preparation of *Toxoplasma gondii* and its use in serological diagnosis. Clin Exp Immunol, 49:239-246.
64. Hughes HP, Connelly CA, Strangeways JE, Hudson L. 1984. Antigen-specific lymphocyte transformation induced by secreted antigens from *Toxoplasma gondii*. Clin Exp Immunol, 58:539-547.
65. Chumpitazi B, Ambroise TP, Cagnard M, Autheman JM. 1987. Isolation and characterization of *Toxoplasma* exo-antigens from in vitro culture in MRC5 and Vero cells. Int J Parasitol, 17:829-834.
66. Darcy F, Deslec D, Santoro F, Capron A, Charif H, Decoster A, Duquesnei U. 1988. Induction of protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol, 10:553-567.
67. Cesbron-Delauw MF, Guy B, Torpier G, Pierce RJ, Lenzen G, Cesbron JP, Charif H, Lepage P, Darcy F, Lecoq Jp, Capron A. 1989. Molecular characterization of a 23 kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci. USA, 86:7537-7541.
68. Robert-Gagneux F. 2001. Contribution of new techniques for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Clin Lab. 47:135-141

69. Correa D, Mandujano A, Medina Y, Medina E, Mata O, Carpio JC, Zavala A, Ruiz A, Gavilondo J, Ayala M, Vazquez J, Bell H, Dueñas M, Tamplin M. 2000. manual de técnicas modernas en inmunología. Teoría y Práctica. México. INDRE. 95pp.
70. Gonzalez – Henkel HJ. 2006. Determinación de infección aguda y crónica por *Toxoplasma gondii* en grupos de riesgo por medio de un ensayo de avidéz de anticuerpos IgG. Tesis de Licenciatura. UNAM.
71. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels of nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci. 76:4350-4354.
72. Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu F, Peyron F. 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA? Eur J Pediatr. 158: 645-649.
73. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-251.
74. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 B Nature 227: 680-685.
75. Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. 2007. Congenital and acquired Toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. Parasite Immunology. 29, 65-660.
76. Mandujano-Martínez. 2004. En: Memorias del Curso de Inmunología y Biología Molecular de parásitos. Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

77. Fescina R, Simini F, Belitsky R. 1985. Difusión: Evaluación de los procedimientos diagnósticos, aspectos metodológicos. *Sal Perinat.* 2: 39-44.
78. Sales-Carmona VF. 1993. Evaluación de una prueba de diagnóstico. *Comp/Inv Clín Lat Am.* 13.
79. Schulte PA, Perera FP. 1993. Validation. *Molecular epidemiology.* Chapter 3. Pp. 79-105.
80. Ortiz – Alegría B. 2004. Validación de técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas. Tesis de Licenciatura. UNAM.
81. Hamilton RG. Rheumatoid factor interference in immunological methods. *Monogr-Allergy* 1989;26:27-44.
82. Sorensen T, Spenter J, Jaliashvili, Christiansen M, Norgaard-Pedersen B, Petersen E. 2002. Automated time-resolved Immunofluorometric Assay for *Toxoplasma gondii*-specific IgM and IgA Antibodies: Study of More Than 130,000 Filter-paper Blood-spot samples from Newborns. *Clinical Chemistry.* 48:11(1981-1986).

APENDICE

1. *Solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6*

Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar a pH 9.6. Aforar a 1000 mL y mantener a 4°C.

2. *Solución salina de fosfatos (NaCl 0.15M, fosfatos 0.01M, pH 7.2 [PBS])*

Medir 800 mL de agua destilada. Agregar 100 mL de *PB 10X y 8.75 g de NaCl. Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2. Aforar a 1000 mL con agua destilada. Guardar a 4°C.

* PB 10X. 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio monobásico monohidratado) + 11.5 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico anhidro). Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar hasta disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

3. *Amortiguador de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)*

A un litro de PBS pH 7.2 (sol. 2) añadir 500 µL de Tween 20. Guardar a 4°C.

4. *Solución de bloqueo II (albúmina sérica bovina al 1% en PBS-tween20)*

Pesar 1 g de Albúmina sérica bovina (BSA) y aforar a 100 mL de PBS-Tween (3).

5. *Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa*

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD). Añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M. Adicionar 4 µL de H_2O_2 al 30%.

Nota: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

6. *Solución ácido sulfúrico 2N*

Tomar 98.08 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada. Aforar a 1000 mL.

7. *Solución cromógeno/sustrato (dot-ELISA e inmunoelectro-transferencia)*

Pesar 25 mg de 4-cloro-1-naftol. Añadir 5 mL de metanol absoluto y 25 mL de PBS. Agregar 25 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%.

Nota: esta solución se prepara inmediatamente antes de usarla.

8. *Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%.*

Pesar 29.2 g de acrilamida* (99.9% pureza) más 0.8 g de N'N-bis-metilen-acrilamida. Disolver en agua bidestilada y aforar a 100 mL. Filtrar con papel Whatman 1. Guardar en frasco color ámbar a 4⁰ C.

Nota: manejar con cuidado este reactivo porque es neurotóxico.

9. *Amortiguador del gel separador: Tris-Base 2M, pH 8.8*

Disolver 18.15 g de Tris-base (Hidroximetil aminometano o Trizma-base) en 50 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH con HCl 6N hasta un pH de 8.8. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Guardar a 4⁰C.

10. *Lauril sulfato de sodio (dodecil sulfato de sodio) SDS 10%*

Pesar 10 g de SDS. Aforar a 100 mL con agua bidestilada.

11. *Persulfato de amonio al 10%*

Pesar 1 g de persulfato de amonio. Disolver en 10 mL de agua bidestilada. Nota: Se prepara al momento de usarse

12. *Amortiguador del gel concentrador: Tris-HCl 2M pH 6.8*

Pesar 30 g de Tris-base en 30 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH con HCl 10N hasta un pH de 6.8. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Guardar a 4⁰ C.

13. *Amortiguador tris-glicina (para electroforesis)**

Medir 200 mL de Tris-glicina 5X*. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4⁰ C.

*Tris-glicina 5X: 15.0 g de Tris-base + 72.0 g de glicina + 5.0 g de SDS en 1000 mL de agua bidestilada.

Nota: este amortiguador se puede usar 2 o 3 veces en la cámara inferior. Después de cada uso se filtra con papel Whatman No. 1.

14. *Amortiguador de muestra*

Medir 5 mL de SDS 10%. Añadir 37 mg de EDTA, 5 mL de glicerol, 1.25 mL de Tris-HCl 2M pH 6.8 y unos granitos de azul de bromofenol o pironina. Aforar a 50 mL con agua bidestilada. Dividir en fracciones de 1 mL y congelar.

15. *Azul de Coomassie 0.06% (para la tinción de geles)*

Pesar 500 mg de azul de Coomassie R-250. Añadir 150 mL de metanol al 30% y 50 mL de ácido acético glacial al 10%. Aforar a 500 mL con agua bidestilada. Guardar en frasco color ámbar. Mantener a temperatura ambiente.

Nota: ésta solución debe dejarse madurar una semana y filtrarse a través de papel Whatman No. 1 antes de usarse. Todas las veces que se desee.

16. *Decolorante 1 para el gel (metanol-acético-agua)*

Medir 500 mL de metanol absoluto. Añadir 100 mL de ácido acético glacial. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Mantener en frasco color ámbar a temperatura ambiente.

17. *Amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, pH 8.3 metanol 20% v/v)*

Medir 12.5 mL de Trizma-base 2M y agregar 14.49 g de glicina. Añadir 200 mL de metanol. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4⁰ C. Nota no ajustar el pH. El amortiguador oscila entre pH 8.1 y 8.4, dependiendo de la calidad del Tris, la glicina y el metanol. El metanol debe ser de grado analítico, de lo contrario

contiene contaminantes metálicos que interfieren con las láminas de los electrodos. Este amortiguador se puede usar 3 veces, después de cada uso se filtra con papel Whatman 1.

18. Solución de boratos, 0.15 M pH 8.0

Disolver 6.18 g de ácido bórico, 9.54 g de tetraborato de sodio y 4.38 g de cloruro de sodio en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar