

26
36



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA Toxoplasma gondii
EN SUEROS HUMANOS DE MADRE Y PRODUCTO
UTILIZANDO LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA
INDIRECTA.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

GUADALUPE CASTORENA

México, D. F.

1966.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION.

1.- <u>ANTECEDENTES</u>	1
1.1.- Clasificación	6
1.2.- Biología de <u>Toxoplasma gondii</u>	7
1.2.1.- Morfología	7
1.2.2.- Ciclo de vida	9
1.3.- Epidemiología	12
2.- <u>TOXOPLASMOSIS HUMANA</u>	15
A) Congénita	16
B) Adquirida	23
3.- <u>OBJETIVOS</u>	25
4.- <u>MATERIAL Y METODO</u>	26
5.- <u>PROCEDENCIA DEL SUERO</u>	39
<u>RESULTADOS</u>	40
<u>DISCUSION</u>	47
<u>CONCLUSION</u>	49
<u>REFERENCIAS</u>	

INTRODUCCION

La toxoplasmosis es una infección producida por Toxoplasma gondii. (Nicolle y Manceux 1908), que es un parásito estrictamente intracelular, cuyo huésped definitivo es el gato y - otros carnívoros de la familia Felidae, los demás animales incluyendo al hombre son huéspedes intermediarios o accidentales.

Las encuestas seroepidemiológicas y parasitológicas realizadas en diferentes países, muestran que la infección es muy - frecuente en la especie humana, así como en bovinos, porcinos, - ovinos, caprinos a los que ataca en su desarrollo embrionario matándolos, causando grandes pérdidas económicas, es decir, - la toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria con reservorios - potenciales en la vida animal. En el ser humano en estado adulto la enfermedad habitualmente es subclínica. Pero se presentan formas graves especialmente en la del tipo congénito y en individuos inmunodeficientes.

Métodos de diagnóstico.

Los métodos más comunes para el diagnóstico de la toxoplasmosis son las pruebas serológicas: la prueba de Sabin-Feldman, de hemoaglutinación, de Elisa y la prueba de inmunofluorescencia indirecta, las cuales ponen de manifiesto la presencia de anticuerpos específicos.

La prueba de Sabin-Feldman requiere de Toxoplasmas vivos

y éste es un inconveniente para los laboratorios no especializados. La base de la prueba es teñir Toxoplasmas con azul de metileno en presencia de un activador (suero humano negativo más Toxoplasma) y demostrar la presencia de anticuerpos contra Toxoplasma gondii que se fijan a la pared del parásito e impiden que este se colorea con azul de metileno.

La prueba de hemoaglutinación es tan antigua como la del colorante, adquiriendo mayor importancia en los últimos años, tiene la ventaja de utilizar Toxoplasmas muertos en sus fracciones hidrosolubles. Esta prueba aunada a la clínica, puede estar al alcance de los laboratorios no especializados.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta que, a semejanza de la anterior, tampoco requiere de Toxoplasmas vivos. Los reportes con esta prueba han sido valorados con la prueba de Sabin-Feldman y la hemoaglutinación, encontrándose concordancia en más del 95 %, tanto en casos positivos como negativos (13).

Recientemente se han desarrollado técnicas para la determinación de IgM específica contra Toxoplasma, así como de antígenos del parásito circulantes tales como la técnica de Elisa que informa una sensibilidad de hasta 80 % en toxoplasmosis congénita (37).

Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia es esencialmente una técnica histoquímica, para la localización e identificación de anticuerpos -

El anticuerpo específico es conjugado con los compuestos fluorescentes. El anticuerpo conjugado es añadido a las células o a los tejidos y se fija a los antígenos formando por lo menos un complejo inmune.

Goldman en 1952, inició una serie de trabajos con Toxoplasma gondii (17), procedente de exudado peritoneal, ya que - logró colorearlo con una globulina humana antitoxoplasma unida a la fluoresceína. Goldman y Carver en 1959, (5) trabajaron - con coloraciones fluorescentes en toxoplasmosis, marcando los Toxoplasmas incluidos en preparaciones de tejido de ratón, con gelados y parafinados.

1.- ANTECEDENTES.

DESCUBRIMIENTO.- Toxoplasma gondii fue observado por Laverán (1990), en gorriones de Java, pero los datos más fidedignos acerca de la primera observación de este parásito fue establecido por Nicolle y Manceux (1908), en la Academia de Ciencias de París con el hallazgo de un parásito nuevo en frotis de sangre, bazo e hígado, en dos ejemplares de un roedor llamado gondi (Ctenodactylus gondi), capturado en Matmata en el Sur de Túnez. Este roedor pertenece a la familia "Octodontidae", del género Ctenodactylus; de la especie massoni. Inicialmente el parásito fue considerado como un protozoario, y por su parecido con las leishmanias le adoptaron el nombre de Leishmania gondii pero Nicolle (1909) después de examinar 51 gondis, 45 de los cuales estaban infectados, determinó que por su morfología y biología eran diferentes a las leishmanias, por lo tanto consideró que se trataba de un género nuevo, posteriormente por su forma en arco y por haberse encontrado en el gondi, se le denominó Toxoplasma gondii (37).

Por ese tiempo (1909), también Alfonso Splendore, en Brasil, reportó haber observado en vísceras de conejo un parásito de forma reniforme, de cinco a ocho μ de largo por dos y media a cuatro de ancho. F. Mensnil (1909) después de estudiarlos consideró a los parásitos como toxoplasmas; y Splendore los denominó Toxoplasma cuniculi (37).

A partir de esa fecha se reportaron numerosos hallazgos de este género en diferentes animales incluyendo al hombre, creando varias especies del género Toxoplasma y dando origen a una confusión taxonómica. Fueron identificadas las siguientes especies : gondii, Nicolle y Manceux (1909); cuniculi, Splendore (1909); canis, Mello (1910); Talpae, Pro-Waseck (1910); paddae, Marrullaz (1911); avium, Marrullaz (1913); pyrogenes, Castellani (1913); gallinarum, Hepding (1939); hominis, Wolf, Cowen y Paige (1939).

En un principio se supuso que el género Toxoplasma comprendía varias especies, pero un grupo de observadores como Carini (1911), Arantes (1914), Carini y Migliano (1916), Chaton y Blanc (1917) y Mensnil (1918), defendieron la teoría unicista. En un segundo período, una serie de experimentos basados en inoculaciones, infecciones y pruebas de inmunidad cruzada y receptividad en diferentes animales, llevadas a cabo por Sabin (1939), Wolfson (1940), Nobrega y Reis (1942), Ruchman y Johansmann (1948), Christensen y Siim (1951), Wildfuhr (1954), Harboe y Erichsen (1955), Piekarski (1959), y otros, quedó confirmada esta teoría y en la actualidad se acepta que no hay más que una sola especie capaz de infectar al hombre y a los animales, y que es la especie gondii (37).

El primer caso de toxoplasmosis humana es, probablemente el descrito por Castellani en 1913, quien observó al parásito en las vísceras de un niño de Ceylán, publicó al respecto un trabajo

titulado " Notas sobre un protozoario en un caso de fiebre prolongada con esplenomegalia ", denominando al protozoario, Toxoplasma pyrogenes. Posteriormente aparecen en Rusia las comunicaciones de Federovitch, en 1916; Torres, 1917 en Brasil; Chalmers y Kamar, 1920 en los Estados Unidos; Jankú, 1923 en Checoslovaquia, en niños con lesiones oculares; Hertin, 1934 en Chicago; Richter, 1936 en Bostón y Wolf y Cowen, 1937 en Nueva York, en un niño de 32 días de nacido con encefalitis y coriorretinitis.

Estos hechos despertaron el interés de investigadores de todo el mundo dando como resultado el aumento en los números de critos, no sólo por el aislamiento del parásito en casos recién diagnosticados, sino por la revisión de los casos anteriores que habían sido mal clasificados (2).

La infección natural por Toxoplasma gondii se ha encontrado en todas partes del mundo donde se ha buscado (16). En México, las primeras observaciones sobre Toxoplasma gondii fueron hechas por Mooser (1923-1929) en el exudado peritoneal de cobayas, al estudiar cepas de Rickettsias del tifo (37).

El primer caso con diagnóstico de toxoplasmosis en humanos en la República Mexicana es el de un niño de 11 meses, presentado por Palomino Dena. et al en 1950 (29), en el Hospital Infantil de México; Biagi en 1951 (1), efectuó las primeras observaciones epidemiológicas usando la prueba de intradermoreacciones; Varela G., Roch y Vázquez en 1955 (44), aislaron la primera cepa de --

Toxoplasma gondii ; también Varela en 1957 propuso la prueba del Lebistes reticulatus en el diagnóstico de la toxoplasmosis, usando el líquido cefalorraquídeo del enfermo y el pez de ese nombre; Roch E., en 1962 (36) introdujo la reacción del "Dye Test", Gutiérrez Ballesteros empleó la reacción de fijación de complemento - en estudios de toxoplasmosis.

En México mediante reacciones inmunológicas (1), se ha encontrado que, según el área geográfica, se hallan reacciones positivas entre el 15 y 65 % del total de la población, lo que indica un alto número de personas que presentan la infección.

Encuestas realizadas en América usando la prueba del colorante de Sabin-Feldman, han revelado los siguientes datos: Gibson y Coleman (13), encontraron el 91 % de reacciones positivas - en las costas de Guatemala y 50 % en los habitantes de los lugares establecidos a más de 50 pies de altura. Los mismos datos - fueron encontrados en Costa Rica; Thiermann en 1951 (40), en Chile, quien observó el 29 % de casos positivos; Varela, Roch y Zavala en 1961 (45), encontraron el 30 % entre los indios Guambias en Colombia y en colaboración con Muñoz Rivas registraron el 13 % en Bogotá; Roch y Bravo-Becherelle en 1962 en México (35), registraron en un estudio de 2 186 recién nacidos vivos de madres con reacción Sabin-Feldman positiva, 398 niños positivos serológicamente (13 %), de estos 40 presentaron manifestaciones de toxoplasmosis, Morales M. y Cedillo (26), en un estudio realizado en el -

Hospital Infantil de México, revisaron en el período comprendido entre 1964 y 1980, 45 expedientes de pacientes con diagnóstico de toxoplasmosis, en todos los casos el diagnóstico se apoyó en el incremento progresivo en el título de anticuerpos séricos, -- con coriorretinitis activa, cuadro clínico más anticuerpos en líquido cefalorraquídeo. Las pruebas serológicas realizadas fueron las de Sabin-Feldman e inmunofluorescencia indirecta para -- toxoplasmosis.

1.1.- Clasificación. (23).

Clasificación tomada según Levine, N.D., J.O. Corliss., F. E. Cox., G. Deroux., J. Grain., M.B. Hingberg., G.F. Leedale., A.R. Loeblich., J. Lom., D. Lynn., G.E. Marinfield., C.E. Page., G. Poljanski., V. Sprague., J. Vavra., y F.G. Wallace. 1980: A Newly revised Classification of the Protozoa. J. Protozool 27(1): 37-58.

Phylum	Apicomplexa	Levine, 1970
Clase	Sporozoea	Leuckart, 1879
Subclase	Coccidia	Leuckart, 1879
Orden	Eucoccidiida	Léger y Dubogs, 1910
Suborden	Eimeriina	Léger, 1911
Género	<u>Toxoplasma</u>	Bioca, 1957.
Especie	<u>gondii</u>	Nicolle, 1909

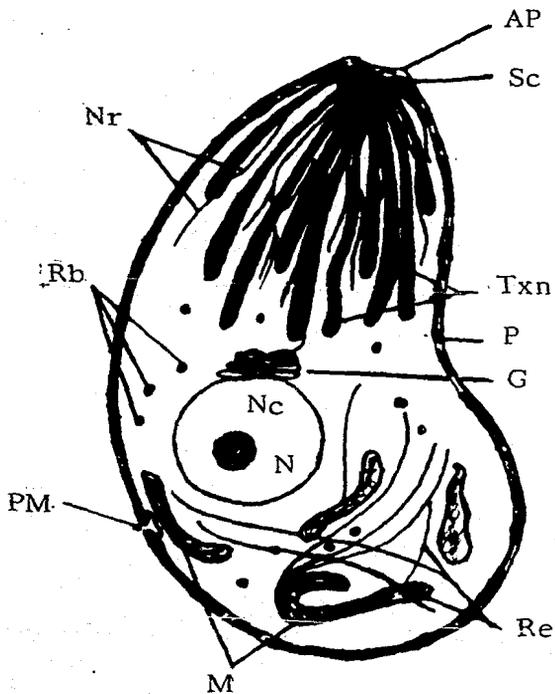
1.2.- Biología de Toxoplasma gondii.

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado. En mamíferos inferiores evoluciona dentro de las células procedentes de las tres capas blastodérmicas, menos en los eritrocitos; en el hombre y animales superiores se encuentra en células altamente diferenciadas, como son las fibras cardíacas, células trofoblásticas del útero, en el cristalino y con gran predilección en las células retículoendoteliales (monocitos, linfocitos) (37). Es un parásito sistémico, se puede localizar en: ojos, cerebro, ganglios, músculo, útero, corazón, pulmón, hígado, bazo, etc. -- Toxoplasma gondii se ha transmitido experimentalmente al: mono, perro, gato, cerdo, ratón, cobayo, conejo y aves. El principal huésped de Toxoplasma gondii desde el punto de vista biológico es el gato y todos los félidos, ya que son los huéspedes definitivos y la fuente de infección natural más importante (2).

1.2.1.- Morfología.- La forma vegetativa o trofozoito es semilunar mide aproximadamente de tres y medio a siete μ de largo por uno y medio μ de ancho (37). Presenta un polo superior fino que termina en forma de cono, su porción inferior es esférica -- dándole al parásito aspecto de pera.

Al microscopio de luz, se distingue: membrana, citoplasma y un núcleo redondo de mayor condensación, en preparaciones teñidas con Giemsa se distingue una membrana granulosa, el citoplas-

FORMA VEGETATIVA O TROFOZOITO DE TOXOPLASMA GONDII



P.-Pared con doble membrana Ap.- Anillo Polar
Sc.- Sistema Conoide Nr.- Nervaduras radiales
Txn.- Toxonemas Rb.- Ribosomas G.- Aparato de
Golgi Re.- Retículo Endoplasmático M.- Mitocon
drias PM.- Micropilo.

ma teñido en azul y el núcleo coloreado en rojo que no es uniforme sino que presenta pequeñas vacuolas en su interior (37). El trofozoito presenta: el aparato de golgi, ribosomas, retículo -- endoplásmico y mitocondrias, el DNA y RNA ha sido estudiado independientemente y puede ser diferenciado del DNA y RNA de la célula huésped. No se conoce el por qué los Toxoplasmas se ven obligados a vivir intracelularmente, y por otro lado se dice que el núcleo de la célula huésped no le es necesario para su sobrevivencia. Se han hecho experimentos (33), de DNA y RNA de trofozoitos marcados con tritium manteniéndolos fuera de la célula y se ha encontrado que se siguen sintetizando al menos por breves períodos de tiempo fuera de la célula. Hay datos que indican que las enzimas mitocondriales están presentes en todo el organismo, y que la necesidad de producción de energía no sea la razón por la que el organismo sea incapaz de vivir extracelularmente.

En las formas intracelulares, los parásitos presentan algunas modalidades: son más pequeños, de forma oval y redonda y se ven acoplados de dos en dos por la parte más plana, formando agrupaciones en el quiste inmaduro. Cuando se observa el exudado peritoneal del ratón infectado, con iluminación de contraste de fases, se ven los Toxoplasmas dentro de una vacuola refringente conservando un aspecto semilunar con un extremo aguzado muy móvil y forma a veces un ángulo con el resto del cuerpo, esta estructura es la trombícula, carece de cilios o flagelos, su locomoción es -

por flexión del cuerpo (37).

Visto al microscopio electrónico, la estructura del toxoplasma es más compleja, se observa una pared formada por un sistema de membranas, una externa y una plasmática, un orificio denominado micróporo y parece ser que este órgano tiene función -- respiratoria, sistema conoide, en la base de éste el cual se encuentra dentro del citoplasma parten dos sistemas de fibras -- llamadas nervaduras radiales y los toxonemas; el sistema de nervaduras radiales tiene función nerviosa y controla los movimientos de la pared; los toxonemas tienen función enzimática y digestiva, presenta también los anillos polares, por medio del conoide el parásito realiza la invasión celular (37).

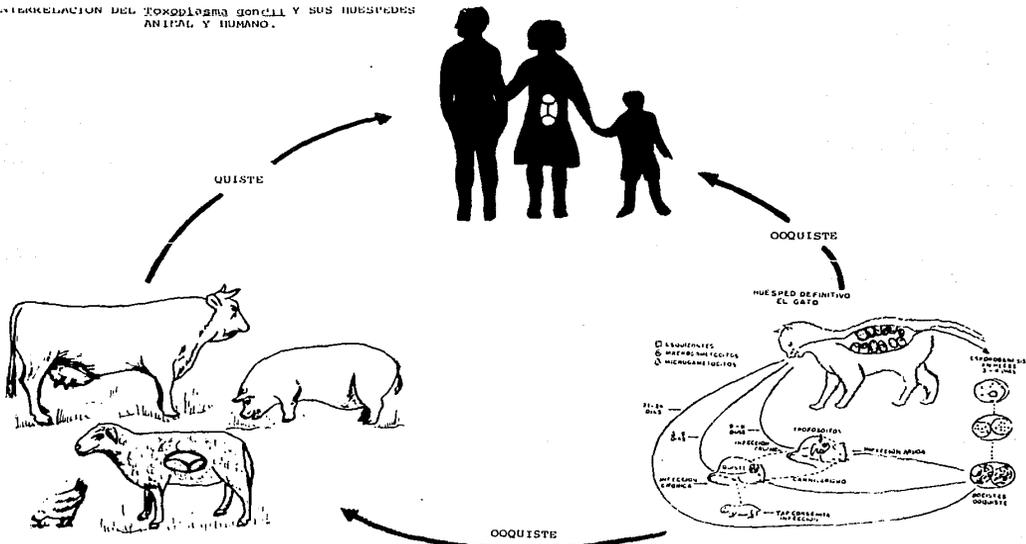
1.2.1.- Ciclo de vida.- Toxoplasma gondii presenta un ciclo de vida que se divide convencionalmente en tres formas (33): a) trofozoito o forma proliferativa (merogonia o reproducción -- asexual), otros nombres propuestos para esta forma son endozoito o taquizoito; b) quistes (otros nombres propuestos son bradizoito o quistozoito); c) ocisto (endodiogenia). El parásito -- presenta dos ciclos en biotipos separados (33), un ciclo enteroepitelial y un ciclo intrainestinal. En gatos, la fase enteroepitelial se inicia con gametogonios y producción ocística con -- esporogonia. Los otros dos estados trofozoito y forma quística -- se producen en el tejido intrainestinal del gato.

La merogonia o reproducción asexual da por resultado la -- formación de merozoitos alojados en el interior de quistes tisulares, cuyo diámetro varía entre 10 y 200 μ m, conteniendo hasta 3 000 organismos; estas formas se asocian con la infección crónica latente. El parásito enquistado permanece vivo, se divide por endodiogenia con formación de dos células hijas a partir de una - célula madre (4).

La ruptura del quiste por las enzimas digestivas, liberan - formas invasoras que tienen la propiedad de penetrar y multiplicarse en el interior del epitelio intestinal del gato y otros felinos, en donde se lleva a cabo una segunda división asexual o esquizogonia, después se generan las formas sexuales o gametocitos y luego de la fusión sexual, aparecen los oquistes, los cuales se eliminan en las heces del gato. Miden de nueve a ocho μ de ancho por catorce de largo, conteniendo en su interior dos esporoquistes, que al madurar forman cuatro esporozoitos cada uno (4). El ciclo enteroepitelial en el gato tiene una duración de - 3 a 21 días y la eliminación de millones de oocistos se prolonga hasta por tres semanas; sin embargo, dependiendo de las condiciones ambientales, el ooquiste esporula de 1 a 21 días y en un medio favorable puede permanecer viable hasta por un año. Tales - formas geoinfectantes se diseminan hasta llegar al huésped intermedio, que puede ser una mujer embarazada, un niño que juega con tierra contaminada o animales diversos que son infectados al

ingerir los parásitos maduros. Las manifestaciones de la toxoplasmosis aguda se deben a la formación de trofozoitos citoinvasores, estas formas pueden permanecer viables por algunas horas o días en las secreciones corporales, en la leche, orina, saliva o lágrimas (33).

INTERRELACION DEL TOXOPLASMA GONDII Y SUS HUESPEDES ANIMAL Y HUMANO.



Ciclo de vida del *Toxoplasma* mostrando las principales vías de transmisión por medio de oocistos del excremento del gato y por la ingestión de trofozoitos o quistes de huéspedes intermediarios. Los días indicados representan el tiempo desde la ingestión del *Toxoplasma* por el gato, hasta la propagación de los oocistos. Los ratones y demás animales se muestran para representar la cantidad de mamíferos y aves que pueden servir como huéspedes intermediarios. La *Toxoplasmosis* congénita puede tener lugar durante la infección crónica como en el ratón, o durante una infección aguda como en el hombre.

1.3.- Epidemiología.

La distribución de la enfermedad es universal. Las variaciones son extremas de un lugar a otro. Las encuestas realizadas para conocer la dispersión de la infección son igualmente variables, encontrándose poblaciones con más del 50 % de anticuerpos contra Toxoplasma gondii.

En la Republica Mexicana., Varela et al. (1962), encontraron el 28.9 % de casos positivos a la prueba del colorante de Sabin-Feldman (45).

La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución universal. Gibson y Coleman (12), compararon sus datos con otros trabajos en relación al clima, y encuentran que la infección es más frecuente en climas tropicales que en regiones frías. La infección humana es muy común, pero la enfermedad clínica es menos frecuente, estimándose que alrededor de un tercio de la población mundial tiene anticuerpos contra Toxoplasma gondii. Sin embargo, la tasa de prevalencia en sujetos seropositivos es más alta en las regiones tropicales o en algunos países como Francia, en donde por razones culturales se consume carne cruda, las cifras alcanzan el orden del 80 % (4).

La importancia de la toxoplasmosis en salud pública reside sobre todo en la gravedad de la infección congénita y sus secuelas.

La infección animal se ha comprobado en todo tipo de áreas geográficas, en unas 200 especies de mamíferos y con menor frecuencia en aves; estos animales pueden ser infectados por transmisión congénita, por ser carnívoros o por ingestión de los ooquistes. La supervisión de la carne de los animales de abasto es de interés muy especial, ya que es una de las fuentes principales de infección humana.

En Europa, se ha comprobado que las tasas del parasitismo están por arriba del 50 % en la carne de ovinos, caprinos y cerdos sacrificados en los rastros, aunque se cree que generalmente los bovinos son más difíciles de infectar, ya que los quistes en sus músculos son menos frecuentes (4).

Jacobs, Remington y Melton, han hecho estudios en estos animales y encontraron que la enfermedad en ovinos se caracteriza por placentitis, abortos en el último mes de preñez en las ovejas; las crías nacen débiles o mueren (18). Los corderos infectados congénitamente sufren de incoordinación muscular, son físicamente débiles. (18). En Nueva Zelanda la toxoplasmosis tiene gran importancia económica, siendo una de las principales causas de mortalidad perinatal en ovinos (17). En Tazmania, Australia, el parásito es la causa etiológica del 46 % de los brotes de abortos y mortalidad en ovinos (16,27).

Los géneros Felix y Lyng, son de gran importancia en la epidemiología de la toxoplasmosis, puesto que eliminan en sus

heces los ooquistes. Los gatos se infectan al ingerir carne -
cruda, de pajaros o ratones con quistes tisulares. Las heces de
los gatos a su vez, son la fuente de infecci3n para los herb3vo-
ros, aves y hombres. Los carn3voros dom3sticos, depredadores y
carroñeros, contraen la infecci3n al consumir carne cruda. El -
hombre se infecta de diferentes maneras: por el consumo de carne
cruda, sobre todo de borregos, cerdos, bovinos y en algunos luga
res tambi3n cabras, la carne de aves y los huevos tienen impor--
tancia secundaria. Otra fuente de infecci3n son los alimentos -
contaminados con ooquistes fecales del gato, cuando las condicio
nes de higiene son deficientes.

2.- TOXOPLASMOSIS HUMANA.

La toxoplasmosis humana permaneció ignorada por los patólogos y parasitólogos durante muchos años. Hoy se sabe que esta enfermedad ya existía desde hace más de cien años.

Por investigaciones clínicas, patológicas y de experimentación, se puede decir que no hay una sintomatología patognomónica de la toxoplasmosis, debido al carácter de invasión y localización sistémica del parásito.

Se conocen dos formas clínicas de toxoplasmosis humana donde la sintomatología varía desde las formas asintomáticas hasta las graves.

A) Forma congénita

- a) Congénita asintomática
- b) Congénita aguda visceral
- c) Congénita meningoencefalomielítica.

B) Forma adquirida

- a) Infección aguda
- b) Infección sub-aguda
- c) Infección crónica

2.1.- Toxoplasmosis congénita.

La toxoplasmosis congénita es el resultado de una infección aguda, adquirida por la madre durante la gestación. La incidencia de las manifestaciones clínicas variará en función de la edad del feto en el momento de la infección, la dosis infectante, la virulencia del parásito y el nivel de resistencia materno fetal (45). Habiéndose observado que la frecuencia de las anomalías es mayor en el tercer trimestre y menor en el primer trimestre del embarazo, aunque la infección puede terminar en aborto espontáneo o prematuro (45).

Los trabajos experimentales de investigación y las comprobaciones clínicas por diversos autores, han confirmado que la toxoplasmosis se puede transmitir por vía trasplacentaria (37). Cowen et al., (7), confirmaron experimentalmente dicha transmisión, inoculando el parásito a los ratones por vía vaginal.

Remington, Jacobs y Melton (32), encontraron quistes de Toxoplasma gondii en útero de mujeres (obtenidos por histerectomía post-mortem), el 12.5 % de enfermas con serología positiva. Werner et al., (37), en un estudio de 47 mujeres con antecedentes obstétricos y serología positiva, en muestras de raspado de endométrio encontraron quistes, considerando que el 30 % de las mujeres con aborto habitual pudiera ser debido a Toxoplasma gondii. Thiermann (41), inoculó ratas con Toxoplasma gondii por vía

intraperitoneal y obtuvo el 7.0 % de transmisión congénita, en ratas con infección aguda, y el 0.4 %, con infección crónica.

Para el mejor entendimiento de lo que acontece en la toxoplasmosis congénita, se anotan a continuación las posibles vías de entrada de los parásitos al producto:

a) Los parásitos circulantes en la sangre materna llegan a localizarse en los espacios intervillosos de la placenta, originando un foco infeccioso, pasan a los vasos de las vellosidades coriales y de ahí al feto. Sabin demostró experimentalmente que la enfermedad se produce por diseminación hemática, a partir del foco de entrada llegando a los vasos y a los tejidos.

b) Los agentes de Toxoplasma causantes de procesos patológicos localizados en la mucosa y en el tejido muscular de la matriz, puede penetrar a través de las membranas del huevo, al líquido amniótico, invadiendo el tracto respiratorio y digestivo del feto, localizándose finalmente en los órganos internos de éstos.

c) Los parásitos de focos infecciosos localizados en los genitales externos o en la cavidad abdominal de la madre pueden penetrar al huevo a través de la membrana.

d) Los parásitos del líquido amniótico, infectan la piel del feto y desencadenan una sepsis fetal a partir del foco de entrada. No obstante, que Toxoplasma gondii puede invadir al niño y al adulto por un sinúmero de vías (ocular, nasal, hemática,

oral, etc.), en el producto intrauterino sólo se ha demostrado la transmisión de la madre al hijo a través del cordón umbilical y la infección del producto en el momento del parto a partir de focos placentarios. Aún cuando no han sido demostradas las otras vías de inoculación de Toxoplasma gondii en el feto, se cree que son factibles de acontecer, y que la madre puede transmitir la infección al feto sólo cuando éste no ha elaborado sus propios anticuerpos.

Al convertirse el huevo humano, primero en embrión y luego en feto, posee cierta autonomía. Este, no es un órgano de la madre propiamente dicho, pues la sangre no lo irriga directamente; por ello se puede considerar que la forma fetal evoluciona en un campo aislado de la madre, pero muy unido a ésta en el proceso de la gestación por lo tanto la transmisión de Toxoplasma gondii de la madre al hijo se verifica a través de las células de los tejidos trofoblásticos del corion y de ahí al cordón umbilical; o también en el momento de desprenderse el huevo a partir de los focos placentarios.

Las infecciones del período embrionario ocurren al final del tercer mes. Generalmente ponen en peligro la vida del embrión, destruyéndolo. Las infecciones durante el período fetal se producen al terminar la organogénesis, generalmente al principio del cuarto mes.

Quando el embrión ha sido infectado tempranamente, la in--

fección puede recorrer todos los períodos o fases de la enfermedad, de acuerdo a la virulencia de la cepa, de la cantidad de parásitos y de otros factores que intervienen en el padecimiento. El niño al nacer puede estar curado pero sin anticuerpos propios: presentar lesiones o nacer aparentemente sano, manteniendo una infección latente o asintomática. Los Toxoplasmas se desarrollan dentro de los linfocitos, monocitos y células linfoides; los primeros están genéticamente preadaptados para reaccionar con unos antígenos y no con otros, y los segundos son intermediarios responsables de las respuestas inmunológicas. De la multiplicación mancomunada de ambos resulta el estado de inmunidad específica. Los agentes que retardan o inhiben la división celular de estos elementos (Toxoplasma en este caso), se consideran como inmunosupresores, originando un estado de inactividad inmunológica que se denomina tolerancia inmunológica.

En las reacciones que acontecen en el período fetal, Toxoplasma gondii se localiza en la placenta, invade al embrión por vía hematogena a través del cordón umbilical, pudiendo suceder que la enfermedad todavía activa, no haya terminado en el momento del nacimiento, y si ya pasó el período de lesiones sistémicas, el recién nacido presentará lesiones cerebroóculares, hidrocefalia, malformaciones congénitas, coriorretinitis, uveitis, trastornos de la conducta (psicomotores), etc., (9).

Cuando la infección sucede antes del nacimiento, en el mo-

mento del desprendimiento de la placenta, el recién nacido no presentará aparentemente ningún trastorno, en este caso el padecimiento es inaparente y posteriormente el niño puede presentar -- ictericia con fiebre o sin ella, poliadenitis, trastornos oculares y pulmonares, motores, mentales etc. En este caso la sintomatología aparece tardíamente, por lo que se trata de una toxo-- plasmosis latente.

Según el estado de las defensas que posea el niño al nacer (inmunidad adquirida pasivamente de la madre), de la actividad -- patógena de la cepa y del número de parásitos introducidos en el organismo, la infección evolucionará de diferentes formas: Puede presentar una infección aguda grave que se observará a los tres -- primeros días del nacimiento con trastornos pulmonares y ocasionando la muerte entre los dos y quince días; trastornos hematóge-- nos que se confunden con fenómenos atribuidos al factor Rh, o -- bien, la forma sub-aguda, que se presenta entre el primero y el -- segundo mes de vida, con manifestaciones clínicas viscerales, -- hepatomegalía con o sin ictericia, esplenomegalia, cardiopatías, fiebre intermitente, trastornos gastrointestinales, cerebrales y oculares (42,43).

Se ha constatado que una madre que ha tenido un hijo con -- toxoplasmosis, esta exenta de tener otro hijo que adquiera la in-- fección in utero (3), esto se explica por la presencia de anti-- cuerpos IgG maternos que impiden la trasmisión en embarazos pos--

teriores (3).

La toxoplasmosis congénita tiene muchas variantes clínicas de las cuales las más importantes son:

a) Congénita asintomática.- En realidad no es posible lesión clínica relacionada con la enfermedad y únicamente se cuenta con reacciones serológicas positivas tanto en la madre como en el producto.

b) Congénita agudo visceral.- En estos caso se supone que la infección se adquiere al comienzo del embarazo y que el parásito tiene oportunidad de invadir prácticamente todos los tejidos del producto. Por esta razón se piensa que esta forma es una de las causas que podrían explicar los abortos de repetición, muertes fetales tempranas y muertes tardías (3).

c) Congénita meningoencefalomielítica, en estos casos la infección se adquiere ya avanzado el embarazo, por lo cual las pacientes manifiestan alteraciones principalmente sobre retículo endotelio, sistema nervioso central y ojos, expresados a la clínica como hidrocefalia, alteraciones del líquido cefalorraquídeo semejante al cuadro anterior, coriorretinitis, calcificaciones intracraneales y alteraciones multiviscerales aparentes.

Se ha demostrado que en el líquido cefalorraquídeo y en retina las concentraciones de anticuerpos neutralizantes y fijadores del complemento, se encuentran mucho más bajos comparados con los circulantes en la sangre, lo cual podría explicar la ex-

tensión de las lesiones en los sitios mencionados (3).

En la práctica no es fácil separar los dos últimos cuadros, ya que la sintomatología es muy variada. Feldman y Miller (3), en 180 casos encontraron coriorretinitis en casi todos los casos y en el 82 % de ellos fue bilateral; Couvreur y Desmonts (8), en 300 casos encontraron coriorretinitis en el 76 %, microcefalia en el 26 % y calcificaciones en el 32 %.

La evolución de los casos de toxoplasmosis congénita sintomática es semejante, independientemente del tipo de lesión, ya que la letalidad es casi igual, sin embargo, es de gran importancia el conocimiento de la tasa alta de secuelas del padecimiento ya que alcanza cifras del 75 al 95 %. Difícilmente se podría asegurar que el porcentaje restante no tuviera alguna secuela y puede deberse a que los métodos clínicos no son capaces de demostrarlo y el paciente se comporta normal.

2.2.- Toxoplasmosis adquirida.

La manifestación más común de la toxoplasmosis adquirida es la linfadenopatía asintomática. Los ganglios linfáticos están aumentados de volumen, sin supuración ni dolor de consistencia moderadamente dura, siendo principalmente afectadas las cadenas cervicales. Ocasionalmente se acompaña de fiebres, mialgias, cefaleas, dolor de garganta, malestar general, hepatosplenomegalia y exantema máculopapular de distribución similar al de la mononucleosis o infección por citomegalovirus. Con frecuencia menor se ha observado un cuadro grave de miocarditis, hepatitis, encefalitis o un síndrome grave de linfadenopatía retroperitoneal que debe diferenciarse de los linfomas. La toxoplasmosis es grave y mortal en sujetos debilitados con inmunodeficiencia celular, con riesgo muy alto en los niños leucémicos o adultos con linfoma, en pacientes con órganos trasplantados bajo terapia inmunosupresora, o con enfermedades malignas. En estos casos es frecuente la encefalitis necrosante y neumonocarditis de curso fulminante; en más del 50 % de estas enfermedades, se han registrado alteraciones motoras, convulsiones, cefaleas, reflejos anormales y trastornos de la conciencia.

En el adulto se pueden resumir los síntomas en tres estados:

a) Infección aguda.- En ella hay invasión en todos los órganos y tejidos; la diseminación del parásito se hace por la

sangre y esta fase puede durar de una a dos semanas.

b) Infección sub-aguda.- Después de la tercera semana -- prácticamente desaparecen los parásitos y Toxoplasma gondii sólo se encuentra en sistema nervioso central y en ojos donde puede perdurar por muchos años. Esto se cree que es debido a la dificultad que los anticuerpos tienen para penetrar en la masa encefálica así como en la barrera hemato ocular.

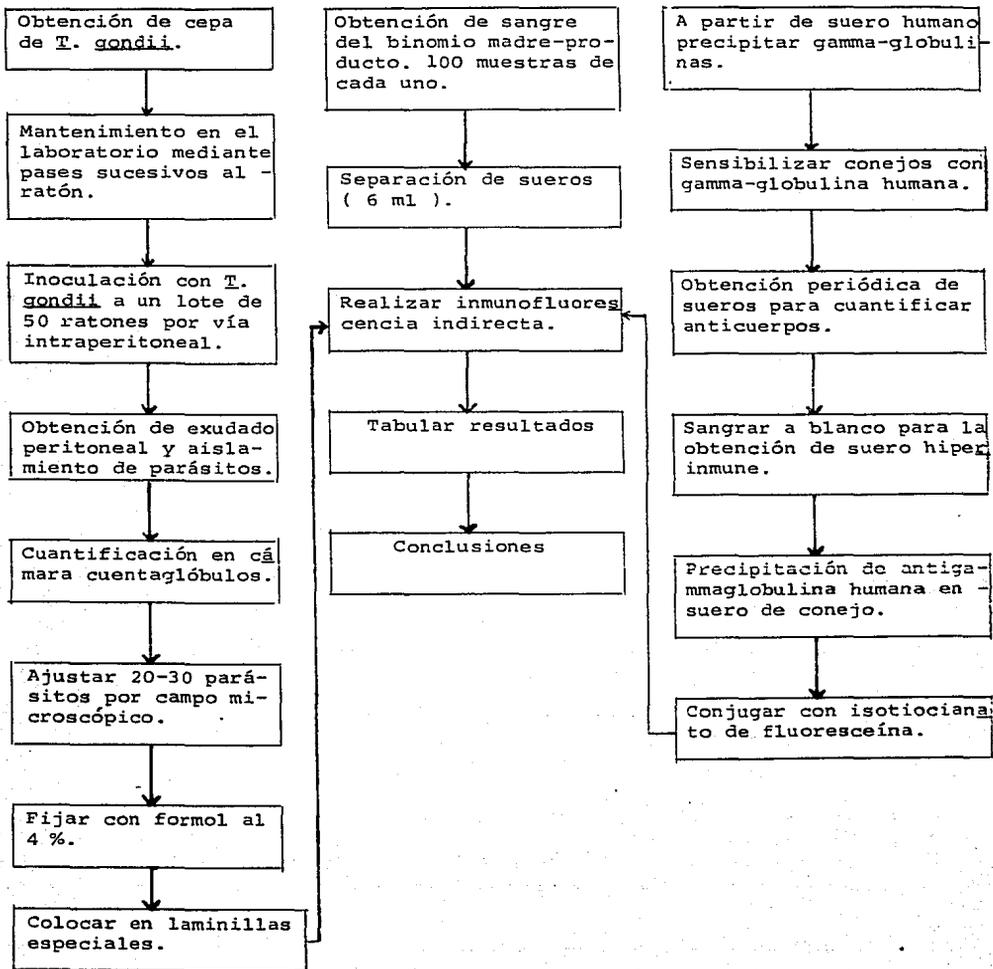
c) Infección crónica.- En esta fase el cerebro es el sitio predilecto del parásito. Los parásitos se encuentran enquistados sin reacción celular aparente alrededor de ellos. Pueden verse también en tumores malignos del cerebro, en corazón y en músculo esquelético, muy raras veces en el pulmón, hígado y bazo. Hay dos tipos de infección crónica de forma benigna, en el que el dolor de cabeza es el único síntoma. En otros casos pueden producirse cambios en la personalidad o dar origen a problemas psiquiátricos (45).

En los consultorios de oftalmología es frecuente observar casos de uveítis granulomatosa o de retinitis focal recurrente; menos frecuentes se ven lesiones de papilitis con atrofia óptica.

3.- OBJETIVOS.

- 1.- Preparación de antígeno de *Toxoplasma gondii* a partir de una cepa que se mantendrá en el laboratorio.
- 2.- Estandarizar la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta para determinar la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*
- 3.- Conocer la prevalencia de anticuerpos antitoxoplasma *gondii*, tanto en la madre como en el producto (sueros humanos) en un grupo de 100 binomios.
- 4.- Correlacionar y tabular los títulos madre-hijo.

ORGANOGRAMA



4.- MATERIAL Y METODO

Obtención de antígeno de Toxoplasma gondii (21,30).

Material:

Matr az Erlenmeyer

Cajas de petri

Pipetas pasteur

Centrífuga

Microscopio

Ratones cepa CDU

Cepa de T. gondii

Formol al 4 %

Amortiguador salino de fosfatos

Sol. salina

Procedimiento:

Para mantener la cepa de Toxoplasma gondii, se inocularon - cinco ratones por vía intraperitoneal con 0.2 ml de solución conteniendo toxoplasmas. El inóculo se prepara mezclando 0.1 de exudado peritoneal de ratón parasitado con 0.9 ml de solución salina. La cepa de Toxoplasma gondii fué proporcionada por el Instituto - de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la Secretaria de Salud.

Para preparar el inóculo para 50 ratones (100 ml), se siguen los siguientes pasos:

Cosecha.

- 1.- Dejar transcurrir tres días a partir de la fecha del inóculo
- 2.- Colectar el exudado con una jeringa No. 25
- 3.- Checar limpieza y abundancia de parásitos
- 4.- Colocar el exudado en un matraz
- 5.- Centrifugar a 200 rpm durante 10 minutos
- 6.- Colectar el sobrenadante
- 7.- Resuspender el sedimento en PBS pH 7.2 y volver a centrifugar a la misma velocidad
- 8.- Repetir la operación anterior tres veces
- 9.- Juntar todo el sobrenadante y centrifugar a 300 rpm durante 15 minutos.
- 10.- Repetir todo el proceso y lavar centrifugando tres veces
- 11.- Resuspender en formol al 4.0 % en PBS pH 7.2 concentrando la suspensión
- 12.- Diluir la suspensión hasta tener aproximadamente de 20 a 30 parásitos por campo
- 13.- Colocar el antígeno en laminillas especiales (una gota por poza, aproximadamente 10 microlitros)
- 14.- Dejar secar a temperatura ambiente
- 15.- Guardar en laminillas especiales hasta el momento de su uso.

Precipitación y purificación de gamma-globulina (14,15,20)

Las sales neutras producen efectos notorios en las proteínas globulares.

A bajas concentraciones, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno al cual se le llama "Solubilidad en salado".

La capacidad de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas depende de su fuerza iónica, de la concentración y del número de cargas positivas y negativas.

Los efectos de este fenómeno son causados por los cambios en la tendencia a ionizarse de los grupos -R dissociables. Cuando la fuerza iónica de la solución aumenta, la solubilidad de las proteínas disminuye; a este fenómeno se le conoce como "Precipitación en salado".

Las bases fisicoquímicas de este fenómeno son complejas; un factor es la elevada concentración de sales, que pueden alterar el agua de las proteínas, reduciendo su solubilidad.

Material:

Centrífuga

Potenciómetro

Equipo de diálisis

Procedimiento:

- 1.- Colocar 50 ml de suero humano en un vaso de precipitados
- 2.- Introducir un magneto y colocar sobre un agitador magnético
- 3.- Ajustar la velocidad de agitación de manera que no forme espuma.
- 4.- Adicionar gota a gota 25 ml de solución saturada de sulfato de amonio
- 5.- Ajustar el pH de la suspensión a 7.8
- 6.- Continuar con la agitación por 2 a 3 horas
- 7.- Centrifugar la suspensión a temperatura ambiente, durante 30 minutos a 3 000 rpm
- 8.- Decantar y desechar el sobrenadante
- 9.- Disolver en el volumen inicial (50 ml), en solución salina isotónica

La purificación de gamma globulina se obtiene mediante dos o más precipitaciones. Para obtener la segunda precipitación se repiten todos los pasos anteriores, en la última sólo se repite hasta la centrifugación.

- 10.- Disolver el precipitado obtenido en la última centrifugación en la mitad del volumen original (125 ml) en amortiguador de boratos.
- 11.- Dializar la solución contra el amortiguador de boratos a 4°C, cambiando la solución por lo menos dos veces al día.

Prueba de sulfatos

Adicionar una gota de solución de cloruro de bario al 10 % a una gota del dializado, si no se forma precipitado blanco de sulfato de bario, indica ausencia de sulfatos en la solución.

Al terminar el dializado se pasa a un tubo de centrífuga de 50 ml y se centrifuga a 4°C durante 30 minutos.

Obtención de antigamma globulina humana en suero de conejo

Se inmunizaron seis conejos con gamma globulina humana mezclada con adyuvante completo e incompleto de Freund. Antes de realizar la inoculación se efectuó un sangrado de prueba (0.5 ml) para checar su negatividad, según el siguiente esquema:

semana	adyuvante	vías de inoculación	inóculo
1	completo	intramuscular y cojinete plantar derecho.	1.0 ml
2	incompleto	intraperitoneal y cojinete plantar izquierdo.	1.0 ml
3	incompleto	intraperitoneal y subcutáneo.	1.0 ml
4	incompleto	intraperitoneal y subcutáneo.	1.0 ml
5	incompleto	intraperitoneal y subcutáneo.	1.0 ml

Antes de realizar cada inoculación se efectuó sangrado de prueba (0.5 ml), para checar evolución de anticuerpos.

Con cada uno de los sueros obtenidos a partir de la segunda semana de inoculación, se realizó la prueba de inmunodifusión para cuantificar anticuerpos. A la quinta semana de inoculación se obtuvieron los títulos deseados y se procedió a sangrar a blanco a los conejos.

Del suero así obtenido, se separaron las gamma globulinas, empleando precipitación del antisuero con sulfato de amonio.

Las gamma globulinas que se obtienen por este medio, son adecuadas para usarse en inmunofluorescencia. La contaminación de la fracción gamma globulina con albúmina se logra disminuir bajando la concentración de sulfato de amonio usado para el proceso de precipitación. La cantidad de seroproteínas precipitadas por una concentración dada de sulfato de amonio, puede variar de acuerdo a la especie animal de donde procede el suero.

Procedimiento:

- 1.- Al suero en constante agitación, se agrega gota a gota un volumen igual a la solución 3.52 M de sulfato de amonio (100 ml).
- 2.- Se deja la mezcla en reposo durante 24 horas a 4°C.
- 3.- Se colecta el precipitado por centrifugación en frío durante 30 minutos.
- 4.- Se decanta y se descarta el sobrenadante.

- 5.- Se añade al precipitado un volumen de agua destilada, aproximadamente la mitad del volumen del suero inicial.
- 6.- Se precipita la gamma globulina empleando la mitad del volumen del sulfato de amonio.
- 7.- Se vuelve a centrifugar y se descarta el sobrenadante.
- 8.- Se hace una tercera precipitación para dejarlo libre de hemoglobina.
- 9.- Dializar la gamma globulina a -5°C contra frecuentes cambios de solución salina, hasta no detectar sulfato de amonio.

Para obtener la determinación de proteínas se empleó el método de Biuret (15), y se purifican pasándolas por columna de intercambio iónico (14,19), gel DEAE-celulosa.

Cromatografía en columna.

Las técnicas cromatográficas son en la actualidad los métodos más ampliamente usados para el fraccionamiento de las proteínas y el aislamiento de las inmunoglobulinas. Una muestra es estratificada sobre la parte superior de una columna de vidrio con un gel sintético y se le permite que fluya a través del mismo. Las características físicas de la molécula proteica da por resultado su retención en la matriz del gel en diversos grados y la elución subsiguiente en condiciones apropiadas permite la separación de las proteínas (14,20).

La cromatografía por intercambio iónico separa las proteínas tomando ventaja de las diferencias en sus cargas eléctricas

La unidad funcional en el gel, es un grupo de carga eléctrica, - absorbido sobre un soporte, habitualmente celulosa. La dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) es usada para el fraccionamiento de las moléculas con carga negativa. La carboximetil-celulosa -- (CM-celulosa) es usada para el fraccionamiento de las moléculas - con carga positiva. El cambio de pH del amortiguador que pasa a través de la columna afecta a la carga de la molécula proteica. El aumento de la molaridad del amortiguador proporciona más iones para competir con la proteína para la fijación del gel. Mediante el aumento gradual de la molaridad o la disminución del pH del -- amortiguador de elución, las proteínas son eluidas en orden creciente del grupo con cargas eléctricas fijadas al gel. La cromatografía en DEAE-celulosa, es una técnica excelente para el aisl~~a~~ miento de IgG, que puede ser obtenida casi libre de todas las -- otras proteínas del suero.

Procedimiento:

Se utilizó resina de intercambio DEAE-celulosa, la cual - fué regenerada con NaOH, alternando con NaCl y agua destilada, y finalmente enjuagando con amortiguador de fosfatos 0.02 M pH 7.8. El adsorbente (empaque) se coloca en la columna y se amolda con - presión de aire, aumentando gradualmente hasta 5 Kg/pulg², para obtener una velocidad de flujo de 1.0 ml cada 90 seg. Se corrió el amortiguador a través de la columna hasta equilibrarla. Una

vez montada la columna se obtienen alicuotas de 0.2 ml de gamma globulinas, obteniendose 20 muestras.

A las muestras colectadas se les cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Lowry (24), empleando la muestra de los tubos que contenían mayor cantidad de proteínas.

Conjugación de proteínas con isotiocianato de fluoresceína (25).

Procedimiento:

El contenido de la muestra se determinó por el método de Biuret, para la cuantificación del total de proteínas.

- 1.- Concentrar la muestra de proteínas hasta tener 10 mg de proteínas por ml. 10 % del volumen total agregando el amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.5 M pH 9.0.
- 2.- Agregar el isotiocianato de fluoresceína en la base de 0.05 mg del colorante por ml. de solución.
- 3.- Poner en agitación a 4°C durante toda la noche, el agitado debe de ser suave para evitar la formación de espuma.
- 4.- Dializar el conjugado en frío contra frecuentes cambios de PBS pH 7.2 hasta que no se detecte más colorante.

Todo el procedimiento debe realizarse en orden y a 4°C para prevenir la desnaturalización de las proteínas del suero por el amortiguador.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (10,31).

Material:

Laminillas de 12 campos

Cámara húmeda

Microscopio de inmunofluorescencia.

Procedimiento:

Reconstituír el conjugado fluorescente antigamma globulina humana en una dilución de 1:4 (1 %) de azul de Evans en PBS pH 7.2

Tomar 0.1 ml de conjugado reconstituído y agregar 0.9 ml - de PBS pH 7.2., obteniendo una dilución óptima del conjugado de - 1:10. Esta es la dilución que se utilizó en todas las pruebas.

Desarrollo de la prueba.

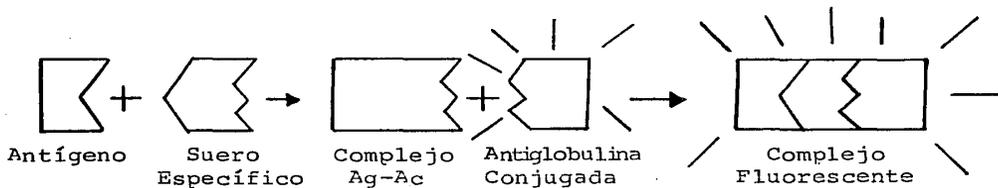
- 1.- Descongelar las laminillas especiales que contienen el antígeno.
- 2.- Dejar secar a temperatura ambiente
- 3.- Colocar en tubos de ensaye 0.7 ml de PBS pH 7.2 y 0.1 ml de suero problema, para lograr una primera dilución de 1:8.
- 4.- Tomar 0.2 ml de esta dilución y agregarla al tubo siguiente que contiene 0.2 ml de PBS pH 7.2, y se continúa el procedimiento hasta obtener una dilución de 1:64.
- 5.- Colocar con micropipeta una gota de la solución (PBS y suero problema, aproximadamente 10 microlitros), en cada poza de la

laminilla, debidamente marcada para su identificación posterior.

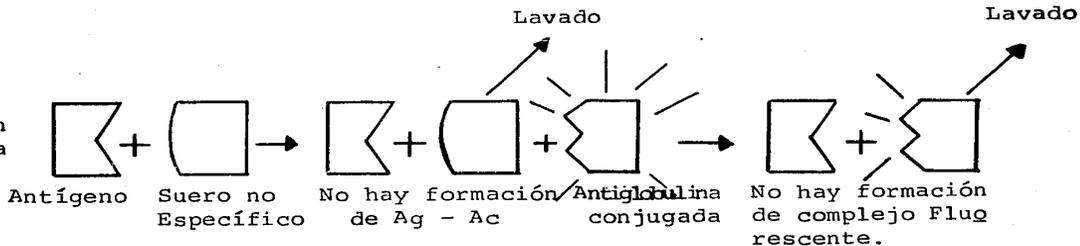
- 6.- Hacer la misma operación con los controles positivo y negativo en cada laminilla.
- 7.- Colocar las laminillas en cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos.
- 8.- Colocar las laminillas en cubetas que contienen PBS pH 7.2 y lavar durante 10 minutos por dos veces.
- 9.- Lavar con agua destilada durante 5 minutos, para eliminar el exceso de amortiguador.
- 10.- Secar a temperatura ambiente, apoyando el lado inferior de la laminilla sobre papel filtro a fin de absorber el exceso de solución.
- 11.- Cubrir los círculos con 0.05 ml de solución óptima del conjugado antihumano diluído con azul de Evans.
- 12.- Colocar las laminillas en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
- 13.- Repetir los lavados descritos anteriormente
- 14.- Secar a temperatura ambiente
- 15.- Agregar una gota de glicerina tamponada (una parte de solución de tampón fosfato más nueve de glicerina), y colocar un cubreobjetos.
- 16.- Observar al microscopio de fluorescencia y evaluar los resultados obtenidos de la siguiente manera:

REACCION DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA

Reacción
Positiva



Reacción
Negativa



La reacción se considera negativa cuando los organismos -
fluorescen rojo púrpura; también se considera negativa cuando el
polo anterior del Toxoplasma fluoresce verde amarillo, sin exten-
derse esta fluorescencia a la periferia y sin llegar al polo pos-
terior (fluorescencia polar), se presenta en las primeras dilu-
ciones y usualmente desaparece en las diluciones mayores de 1:64.

La reacción es positiva cuando la fluorescencia verde se -
extiende por toda la periferia del organismo. Esta reacción pug-
de ser muy intensa aún en las diluciones más bajas, en los sue-
ros fuertemente positivos. Cuando se hace la determinación del
título se debe encontrar la máxima dilución del suero que muestre
aún fluorescencia definida, la intensidad de la fluorescencia es-
tá en relación directa con la concentración de anticuerpos.

Si el suero problema es positivo a la dilución de 1:64 y --
1:128, se deberá retitular con mayores diluciones.

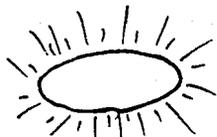
Las reacciones positivas a partir de una dilución sérica -
de 1:64 poseen valor diagnóstico y evidencian una toxoplasmosis
pasada o en su estado inicial.

INTERPRETACION DE LA OBSERVACION AL
MICROSCOPIO DE Toxoplasma gondii EN
LA REACCION DE INMUNOFUORESCENCIA
INDIRECTA.



POSITIVO

Verde Amarillento
en la periferia.



Organismo Verde
Amarillento.



NEGATIVO

Tinción Polar
Verde Amarillento



Organismos
Rojos.

5.- PROCEDENCIA DE LOS SUEROS.

La obtención de los sueros fué posible gracias a la colaboración del personal del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la UNAM., de donde se obtuvo el suero humano para la elaboración del conjugado; La obtención del suero control positivo fué proporcionado por el Q.F.B. Jaime García Rosales del Laboratorio de Parasitología del I.N.P. Los 200 sueros del binomio madre-producto se obtuvieron de pacientes del Hospital de Gineco-Obstetricia Dr. "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social. El suero control negativo se tomó de una persona sana que no había tenido contacto con el parásito.

Obtención de los sueros.

Se tomaron muestras de sangre (10 ml), de vena periférica de la madre, la muestra del producto se tomó del cordón umbilical en el momento del parto (10 ml). Las muestras se colocaron en tubos de ensaye estériles debidamente rotulados con fecha, nombre y número de paciente; una vez clasificados los sueros se envasaron en alicuotas y se guardaron en congelación a -20°C hasta el momento de su uso en las pruebas para toxoplasmosis.

RESULTADOS

En el cuadro 1 y gráfica 1 se muestra la distribución por grupo de edad de las 100 madres bajo estudio y los resultados en inmunofluorescencia indirecta, observando que 80 muestras fueron negativas y el resto (20), resultaron positivas. El mayor número de casos positivos se encontró entre los 20 a los 34 años. El grupo de los veinte a los 24 presentaron 7 casos positivos; el grupo de 25 a 29 años presentó 5 casos positivos y en el grupo de 30 a 34 años también se presentaron 5 casos positivos, así mismo, el mayor título de dilución 1:4096, correspondió al grupo de 20 a 24 años.

También se pudo observar que el mayor número de sueros positivos (10), correspondió a la dilución 1:64.

En la gráfica 2 se muestra la relación en los títulos de los sueros del binomio madre-producto en inmunofluorescencia indirecta para toxoplasmosis, observando que 18 sueros corresponden a los productos y 20 a las madres, lo que aparentemente indica una correlación adecuada.

En el cuadro 2 se observa el porcentaje de positividad de los 200 sueros del binomio madre-producto estudiados con inmunofluorescencia indirecta para toxoplasmosis, mostrando que a igual número de sueros positivos de la madre, al producto le corresponde un porcentaje igual, es decir, de 20 casos positivos en los --

R E S U L T A D O S

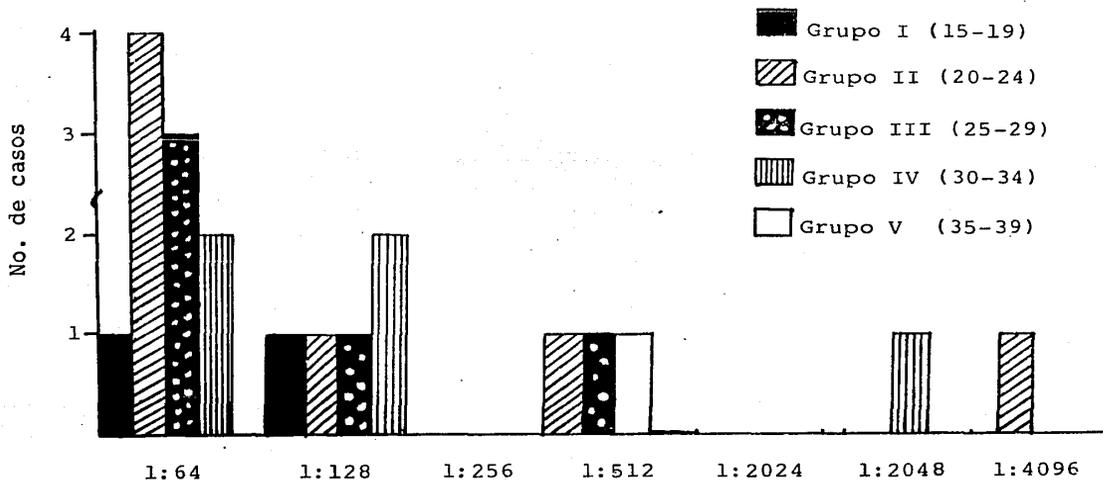
CUADRO 1

Distribución por grupos de edad de las madres bajo estudio y resultados en inmunofluorescencia indirecta - para toxoplasmosis.

edad (años)	No. sueros negativos	<u>positivos recíproca del título</u>						
		64	128	256	512	1024	2048	4096
15-19	7	1	1	0	0	0	0	0
20-24	36	4	1	0	1	0	0	1
25-29	19	3	1	0	1	0	0	0
30-34	12	2	2	0	0	1	0	0
35-39	4	0	0	0	1	0	0	0
40-44	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	80	10	5	0	3	1	0	1

GRAFICA 1

Frecuencia con que se presentaron los diferentes títulos de positividad, con relación a grupos de edad de las madres, en inmunofluorescencia para toxoplasmosis.



sueros de las madres corresponde un 20 % y un 80 % de casos negativos; de los sueros de los productos corresponde un 18 % de positivos y 82 % de negativos.

El cuadro 3 muestra la frecuencia y porcentajes de los 20 y 18 casos positivos en los diferentes títulos de dilución del binomio madre-producto respectivamente, observando que el 50 % de los casos positivos de las madres corresponden a la dilución 1:64 y un 5 % corresponde a la máxima dilución de 1:4096.

De los 18 sueros positivos de los productos también el 50 % corresponden a la dilución de 1:64 y uno de ellos 5.55 % también presentó un título de dilución de 1:4096.

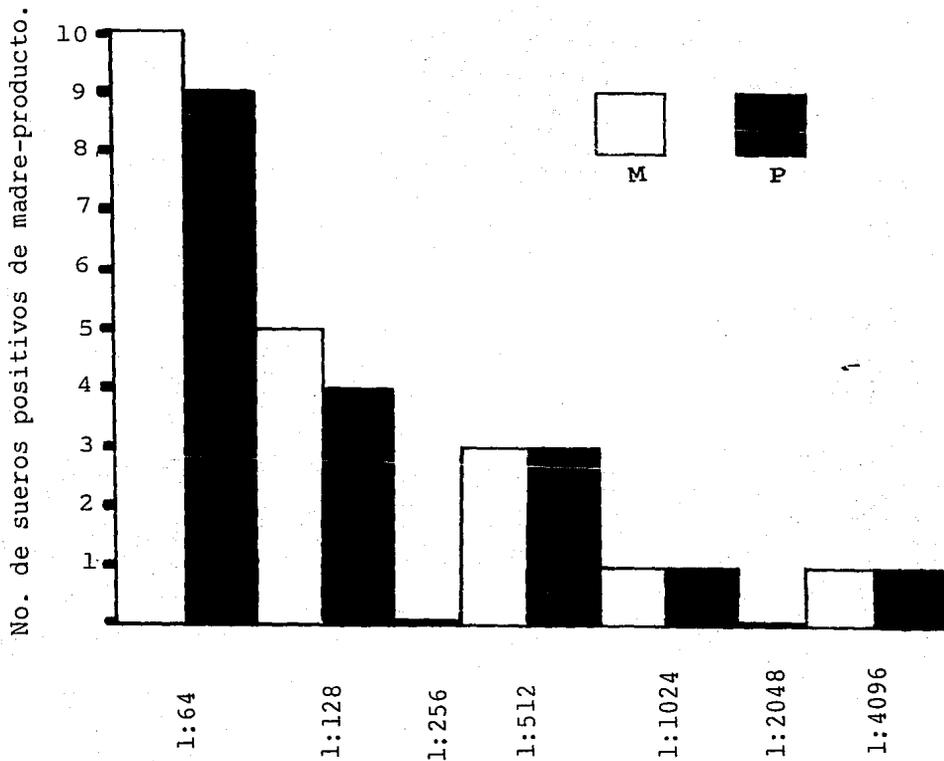
CUADRO 2

Porcentaje de positividad en 200 sueros del binomio madre-producto estudiados en inmunofluorescencia indirecta para toxoplasmosis.

	No. sueros	positivos	%	negativos	%
Madre	100	20	20	80	80
Producto	100	18	18	82	82
Total	200	38	19	162	81

GRAFICA 2

Relación de los títulos de los sueros del binomio madre-producto en inmunofluorescencia para toxoplasmosis.



CUADRO 3

Frecuencia y porcentaje de los 20 y 18 casos positivos en los diferentes títulos en el binomio madre-producto respectivamente, en inmunofluorescencia indirecta para toxoplasmosis.

recíproca del título	No. de sueros positivos madre	%	No. de sueros positivos producto	%
64	10	50	9	50
128	5	25	4	22.2
256	-	-	-	-
512	3	15	3	16.7
1024	1	5	1	5.55
2048	-	-	-	-
4096	1	5	1	5.55
Total	20	100	18	100

DISCUSION

Las muestras de los 200 sueros (100 madre, 100 producto) - que se tomaron en el Hospital de Gineco-Obstetricia Dr. "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social, pertenecen a pacientes de diferentes zonas, tanto del Distrito Federal - como del Estado de México, revelando un 20 % de positividad en -- los sueros de las madres y un 18 % de positividad en los sueros - de los productos a diferentes títulos de dilución, solamente un - binomio de todo el lote reveló un título muy alto de 1:4096.

En los cuadros 1 y 2 se condensan las observaciones de las pruebas realizadas, en varios de los sueros se observó la aparición de fluorescencia inespecífica, así como la fluorescencia polar considerando éstas como negativas, esta fluorescencia se presenta usualmente en las primeras diluciones y desaparece en diluciones mayores de 1:64.

Los resultados del cuadro 1 muestran que hay una positividad total de 20 %, encontrándose que los títulos más altos se dan en los rangos de edad entre los 20 y 24 años (1:4096), y entre -- los 25 y 29 años de edad en una paciente que presentó un título de 1:1024.

El cuadro 2 muestra el porcentaje de positividad y negatividad del total de los sueros (200), de los cuales 162 resultaron negativos que corresponden al 80 % en las madres y 82 % a --

Los productos y la mayoría de los títulos positivos tanto de la madre como del producto (50 % cuadro 3) corresponden a la dilución de 1:64, esto refleja que la madre pudo haber obtenido la infección por toxoplasma gondii y dicha infección esté en su primera fase o se trate de una infección de tiempo atrás. De los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir, que la positividad con la madre es directamente proporcional, y que solamente en dos casos aislados se presentó positividad únicamente en la madre, apoyando las investigaciones que se han hecho acerca de que la madre pasa la infección al producto.

CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos en la prueba de inmunofluorescencia para toxoplasmosis nos permiten explicar los resultados al final de las pruebas. La frecuencia de la infección toxoplásmica es relativamente baja; la existencia de animales domésticos como perros y gatos, sugiere una probable fuente de infección común a cada familia.

La ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida no parece representar un factor importante en las madres encuestadas, dado el bajo componente de carne en su dieta. Se plantea que en las colonias pobres la contaminación del suelo con oocistos de Toxoplasma gondii a través de las deposiciones del gato, tenga -- una mayor importancia cuantitativa en la transmisión de la infección, por lo que es necesario profundizar y reenfocar el estudio epidemiológico.

El diagnóstico clínico de toxoplasmosis presenta dificultades debido al carácter generalizado de la enfermedad, porque puede presentarse como infección subclínica, ya que aún en presencia de síntomas puede no haber elevación de anticuerpos en las pruebas serológicas, a pesar de ser una infección de distribución mundial se le considera poco frecuente, tal vez por falta de confirmación de la enfermedad, por no tener siempre al alcance las pruebas de laboratorio específicas, debido al costo alto de las mismas.

Para el diagnóstico de la toxoplasmosis es conveniente que se verifiquen dos o más pruebas diferentes en el mismo suero, y repetirse dicha prueba por dos o tres veces con intervalos cortos de tiempo, para verificar si los títulos aumentan o disminuyen.

Es importante establecer las características epidemiológicas de la prevalencia de infección, haciendo resaltar a la población en edad reproductiva, en embarazadas, en mujeres con abortos de repetición y en las que tienen antecedentes de muerte neonatal o prematuros sin causa aparente. Son de gran importancia los títulos positivos en mujeres potencialmente fértiles ya que la parasitosis cursa como infección. La prueba de Inmunofluorescencia indirecta es de gran utilidad ya que puede detectar la enfermedad a tiempo y puede normar la conducta terapéutica.

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Biagi, F.: 1951. Cutirreacciones con toxoplasmina en Tampico. Rev. Méd. Hops. Inf. Méx. 14:191.
- 2.- Biagi, F.: 1976. Datos actuales sobre biología y epidemiología de la toxoplasmosis. Gac. Méd. Méx. 3:2.
- 3.- Calderón, J.: 1976. Conceptos clínicos de infectología. Toxoplasmosis. 3(2)
- 4.- Carrada, B.T. 1983: La toxoplasmosis problema de salud pública, avances y perspectivas. Bol. Méd. Hosp. Méx. 40:(7).
- 5.- Carver, R.K., y Goldman, M. 1959: Staining Toxoplasma gondii with fluorescein labeled antibody. III. the reaction in frozen an parafin section. Am. J. Clin. Path. 32:(2).
- 6.- Coons, A.H., Kaplan, M.H. 1950: Localitation of antigen in tissue cells. II. Improvement in a metod for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exper. Med. 91:1-13.
- 7.- Cowen, D. and Wolf, A. 1950: Experomental congenital toxoplasmosis to the placenta and fetus following vaginal infection in the pregnant mouse. J. Exper. Med. 92:103-116.
- 8.- Couvereur, J. and Desmonts, J.G. 1962: Congenital and materal toxoplasmosis review of 300 congenitale cases developed. Med. Neurol. 4:519.
- 9.- Faust, E.C. Roussell, P.F. Jung. 1974: Parasitología clínica. Barcelona. 235-235.
- 10.- Fletcher, S. 1965: Indirect inmunofluorescent antibody technique in the serology of Toxoplasma gondii. J. Clin. Path. 18:193-199.

- 11.- Goldman, M. 1957: Staining Toxoplasma gondii with fluorescein labeled antibody. I. The reaction in smears of peritoneal exudate. J. Exp. Med. 105:549-556.
- 12.- Gibson, G.L. Eyles, D.E. Coleman, N. and Smith, C.S. 1956: Serological response of a rural negro population to the Sabin Feldman cytoplasm modifying test for toxoplasmosis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 5:772-783.
- 13.- Gibson L. and Coleman. 1958: The prevalence of toxoplasmosis antibodies in Guatemala and Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 7:334-338.
- 14.- Harbae, N. and A. Ingild. 1973: Immunization isolation of immunoglobulin. Estimation of antibody titre. Scand. J. Immunol. Suppl. 1. 161-164.
- 15.- Haide, K. H. Haupt., and H.G. Schwick. 1968: Plasma protein fractionation. J. Clin. Path. 545-567.
- 16.- Jacobs, L. 1962: Toxoplasmosis. New. Z. Med. J. 61:(35)
- 17.- Jacobs, L. C.G. Moyle and R. Ris. 1963: The prevalence of toxoplasmosis in New Zealand sheep and cattle. Am. J. Vet. Res. 21: 687-695.
- 18.- Jacobs, L., J.S. Remington and M.I. Melton. 1967: A survey of meat samples from swine cattle and sheep for the presence of encysted toxoplasma. J. Parasitol. 46:135-136.
- 19.- Kabat, E.A. M. Meyer. 1968: Cromatografía de intercambio. Inmunoquímica experimental. Prensa Mex. 574-580.
- 20.- Kabat, E.A. M. Meyer. 1969: Gamma globulina. Inmunoquímica experimental. Prensa Mex. 722-725.
- 21.- Kawamura, A. 1977: Fluorescent antibody techniques and their applications. Preparation of materials. University Park. Press. 63-64.

- 22.- Kelen,A.,L.Ayllon and N.A.Labzoffski . 1962: Indirect - fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. Canada. J. Microbiol. 8: 35-39
- 23.- Levine,N.D.,J.Corliss., E.F.Cox., B.M.Honigberg., F.G. - Leedale., Loeblich.,J.Lom., D.Lynn., G.E.Merinfeld., C.E. Page., G. Poljanski., J.V.Sprague y G.F. Wallace. 1980: - A newly revised clasification of the protozoa. J. Protozool. 27(1): 37-59.
- 24.- Lowry,O.H., Rosenbrough., A.L. Farr and. R.J. Randall. 1959: Protein measurement with the folin phenol, reagent. J. Biol.Chem. 195-265.
- 25.- Marshall,J.D., W.C.Evelang., and C.Smith. 1958: Conjugation of protein with fluorescein isothiocyanate. Bacteriology immunology, and infectus disease branch. Armed Forces Institute of Pathology. Washington. Soc. Exper. Biol. Med. 98: 898.
- 26.- Morales,E.M., R.Cedillo. 1982: Dificultades en el diagnóstico tico de la toxoplasmosis. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 39:5
- 27.- Munday,B.L. 1975: Prevalence of toxoplasmosis in Tasmanian meat animals. Aust. Vet.J. 51:315-316.
- 28.- Organo de la Asociación Mexicana de Infectología, A.C. - Infectología. 1984. Año 4. Num.2 feb. 29.
- 29.- Palomino Dena,F.,R.Soto y L.Villegas. 1950: Un caso de - toxoplasmosis. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 7(1): 24-39.
- 30.- Poetchke,G. 1984: La fluorecencia en la investigación - inmunológica. Rev. Zeiss. 35. 16-19.
- 31.- Procedural Guide Immunofluorescent antibody test for toxoplasmosis. U.S. Departament of. Health, Education and - Welfare, Public Health Service. Immunology Series. 1975.

- 32.- Remington, J.S., Jacobs, L. and Melton. 1960: Chronic toxoplasmosis infection in the uterus. J. Lab. Clin. Med. 56:879-883.
- 33.- Remington, J.S., Desmots., 1976: Infectious disease of the fetus and newborn infant. Philadelphia. W.B. Saunders. 191-332.
- 34.- Robertson, P.W., Kertz. 1975: Modified fluorescent antibodies to the toxoplasma gondii in congenital infection. J. Clin. Microbiol. 2:461-462.
- 35.- Roch, E., Bravo-Bechérelle. 1962: Incidencias de toxoplasmosis congénita en una muestra de 2186.00 nacidos vivos en la ciudad de México. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. Méx. 220-221
- 36.- Roch, E. 1962: Métodos y pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la toxoplasmosis. Salud publ. Méx. 11:161.
- 37.- Roch, E. 1971: Compendio de toxoplasmosis. Edit. Patria. Méx. Ia. ed.
- 38.- Sánchez, I.L., S.J. Martínez., R.M. Sosa. 1984: Respuesta inmune en la toxoplasmosis. Rev. Infec. 4:2 37-39.
- 39.- Sulzer, J.A. and E.C. Hall. 1967: Indirect Fluorescent antibody test for parasitic disease. Statistical study of variation in the indirect fluorescent antibody test for toxoplasmosis. Am. J. Epidem. 86:2 401-406.
- 40.- Thiermann, E. 1951: La reacción de Sabin Feldman en el diagnóstico de la toxoplasmosis. Bol. Inf. Parasit. Chile no 6:54-55.
- 41.- Thierman, E. 1957: Transmisión congénita del Toxoplasma gondii en ratas con infección leve. Biol. Chile. 33:59-57.

- 42.- Thiermann, E., W. Apt. y G. Niedmann. 1966: Conceptos actuales sobre infecciones intrauterinas por Toxoplasma gondii y su importancia en obstetricia. Bol. Chil. Parasitol. - 21:(2). 51-57.
- 43.- Thiermann, E. E. Menard., E. Pérez., A. Atias. 1975: Frecuencia de la infección por Toxoplasma gondii en niños del área hospitalaria Occidente de Santiago. Rev. Méd. Chile. 103:2.
- 44.- Varela, G., E. Roch., y A. Vázquez . 1955: Virulencia, cultivo, polisacáridos, toxonas y la prueba del colorante estudiados con cepas de Toxoplasma gondii. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. Méx. 15(2): 73-80.
- 45.- Varela, G., J. Zavala. 1961: Estudios sobre toxoplasmosis en México. Salud. Públ. Méx. 3:451-453.