

121  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION COMPARATIVA EN LA OBTENCION  
DE BIOMASA DE TOXOPLASMA GONDI A  
PARTIR DE RATON Y CELULAS "VERO"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**MACIAS MUÑOZ PABLO**

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON  
FALLA DE COPIA



## **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

Introducción	
1.0.- Historia de <u>Toxoplasma gondii</u> .....	1
2.0.- Taxonomía .....	4
3.0.- Biología .....	5
3.1.- Morfología .....	6
3.2.- Locomoción .....	8
3.3.- Formas Morfológicas .....	8
3.4.- Ciclo de Vida .....	11
4.0.- Epidemiología .....	14
5.0.- Cuadro Clínico .....	19
6.0.- Diagnóstico .....	21
7.0.- Prevención y Tratamiento .....	22
8.0.- Inmunidad .....	25
9.0.- Justificación del Trabajo .....	27
10.0.- Organograma .....	30
11.0.- Objetivos .....	31
12.0.- Material y Metodo .....	32
12.1.- Material .....	32
12.2.- Reactivos .....	33
12.3.- Material Biológico .....	33
12.4.- Material para el cultivo de <u>L. gondii</u> en ratón.....	34
13.0.- Procedimiento .....	35
13.1.- Cultivo de <u>Toxoplasma</u> en ratón .....	36
13.2.- Cultivo de <u>Toxoplasma</u> en células "Vero" .....	37
13.3.- Purificación parcial de <u>L. gondii</u> .....	37
13.4.- Obtención de toxoplasmas concentrados .....	38
13.5.- Fijación de <u>L. gondii</u> .....	39
13.6.- Inmunización y Reto .....	40
14.0.- Resultados .....	43
15.0.- Discusión .....	44
16.0.- Conclusión .....	50
16.1.- Cultivo .....	50
16.2.- Purificación .....	50
16.3.- Inmunización .....	50
17.0.- Referencias Bibliográficas .....	51

## I N T R O D U C C I O N

Parece ser que el género Toxoplasma fué observado por Laveran en 1900 (26), en gorriones de Java, pero la descripción positiva de este género esta registrada el 26 de Octubre de 1908 en una nota de Nicolle y Maceaux enviada a la Academia de Ciencias de Paris y con base a estudios posteriores y por su forma de arco fué llamado Toxoplasma gondii, el 8 de Febrero de 1909 .

Es un parásito intracelular obligado y es el agente causal de la enfermedad humana llamada Toxoplasmosis, que en mamíferos evoluciona en cualquier célula de las tres capas blastodérmicas menos en eritrocitos pero en aves si son parasitados. Se reproduce intracelularmente, llegando a su célula hospedera al momento de ser fagocitado o penetrando directamente en ella gracias a un factor intensificador de la penetración (16). Sin embargo se han encontrado temporalmente en forma libre extracelularmente, en líquidos orgánicos como : líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y vitreo, leche, lágrimas, líquido ganglionar, orina, saliva, placenta y heces (26).

Toxoplasma es un parásito cosmopolita y se puede localizar, no solo en el ser humano sino en diferentes animales salvajes y domesticos, siendo los mas afectados, los felinos, ovinos, caprinos, porcinos, cánidos y roedores, no escapando las aves a esta parasitosis (10). El gato y algunos felinos son los hospederos definitivos<sup>6</sup> y los demás animales incluyendo al ser humano son hospederos intermediarios.

Presenta tres formas morfológicas (6) que son :

- 1).- Taquizoito (Trofozoito): Es la forma causante de la fase aguda de la enfermedad.
- 2).- Quiste : Es la forma de resistencia y responsable de la fase crónica (latente) del padecimiento.
- 3).- Oocisto : Forma originada de la gamogonia y encargada de la diseminación.

La Toxoplasmosis es un padecimiento que presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas y localización en el hospedero, esto hace difícil su diagnóstico clínico y estudio parasitológico razón por la cual se ha recurrido a los estudios inmunológicos para detectar respuesta inmune humoral o celular o ambas en el paciente que cursa este padecimiento.

Por su característica de parásito intracelular obligado no se puede cultivar en medios sintéticos y solamente en cultivo de tejidos o en animales de laboratorio susceptibles de ser infectados y fácil de trabajar como pueden ser: ratas, ratones o hámster, inoculándolos intraperitonealmente, pero esto ocasiona contaminación biológica en la cosecha obtenida, por lo que se debe realizar algún método de purificación.

## 1.0.- HISTORIA DE Toxoplasma gondii

Se conoce Toxoplasma gondii desde el 26 de Octubre de 1908 por una nota de Charles Nicolle y L. Manceaux a la academia de Ciencias de Paris relacionada con el hallazgo de un nuevo parásito, el cual lo habían observado en frotis de sangre de bazo e hígado de dos ejemplares del pequeño roedor Ctenodactylus gundi (Pallas,1778), que pertenecen a la familia Octodontidae, estos roedores habían sido capturados en Matmata, que se localiza al Sur de Túnez, los autores creyendo que su microorganismo se trataba de una Leishmania lo denominaron Leishmania gondii. Sin embargo Nicolle envió otra carta dirigida a Mesnil el 22 de Diciembre del mismo año en donde le reportó que de 51 gondis examinados 45 estaban infectados con este parásito y que por su morfología y biología se trataba de un nuevo género y en consecuencia diferente al de Leishmania, así que decidieron cambiarle el nombre y por su forma de arco y por haber sido encontrado en el gondi lo denominaron Toxoplasma gondii, (del griego toxon, arco), hecho que comunicaron el 8 de Febrero de 1909 (6).

En 1909 Alfonso Splendore en Brasil reporto el hallazgo de un parásito de forma reniforme en las vísceras de un conejo, el microorganismo media de 5 a 8  $\mu$  m de largo por 2.5 a 4  $\mu$  m de ancho, entonces F. Mensnil (1909) se encargó del estudio de los microorganismos y concluyó que se trataban del género Toxoplasma, así Splendore los denominó como Toxoplasma cuniculi. (26).

Después de esa fecha fueron muchísimos más reportes de hallazgos del parásito encontrado en diversos animales e incluso en el hombre y cada autor nombraba una nueva especie, lo que provocó que se crearan diversas especies para el mismo género originando una confusión taxonómica, entre las especies formadas tenemos : gondii Nicolle y Manceux (1909); cuniculi Splendore (1909); canis Mello (1910); paddae Marrullaz (1913); gallinarum Hepding (1939); hominis Walf, Cowen y Paige (1939), etc.. (26) .

El primer caso de Toxoplasmosis humana fué reportado por Castellani en 1913 en vísceras de un niño de Ceylan y lo llamó Toxoplasma pyrogenes, este hallazgo lo publicó en un trabajo titulado " Notías sobre un protozoario en un caso de fiebre prolongada con Esplenomegalia ", Los sucesivos casos humanos reportados fueron hechos por Fedorovitch en Rusia (1916); Jankú en Checoslovaquia (1923); Chalmers y Kamar en U. S. A. (1920); Torres en Brasil (1927), este reporte fué de un niño de dos días de nacido lo que le confiere ser el primer caso de Toxoplasmosis congénita. Wolfy Cowen en Nueva York (1937), lo encontraron en un niño de 31 días de nacido y ellos mismos en un lactante muerto de encefalomieltis y determinando al agente patógeno como Toxoplasma hominis .

En México la primeras observaciones del T. gondii fueron realizadas por Mooser (1923-1929), al revisar el exudado peritoneal de cobayos , cuando se encontraba estudiando cepas de Rickettsias del tifo (26). El primer caso de Toxoplasmosis con diagnóstico se presentó en un niño de 11 meses que fué reportado por Palomino et al. (22) en 1950 en el Hospital Infantil de México .

Como se nota en un principio se suponía que el género

Toxoplasma comprendia varias especies, lo que despertó el interes de muchos autores en la revisión de su taxonomia (4) , e incluso un grupo de investigadores como: Carini (1911); Arantes (1914); Carini y Migliano (1916); Chatton y Blanc (1917); Mesnil (1918), quienes defendieron la teoria unicista que postula la existencia de una sola especie y posteriormente al realizarse una serie de experimentos basados en inoculaciones, infecciones y pruebas de inmunidad cruzada y receptividad en numerosos animales llevados a cabo por autores como: Sabin (1939); Wolfson (1940); Nobrega y Reis (1942); Ruchman y Johansmann (1948); Cristensen y Siim (1951); Piekarski (1959) y otros, se pudo confirmar dicha Teoria y de esta forma se llego a la conclusión de que solo existe una sola especie, siendo esta el : Toxoplasma gondii Nicolle y Maceaux, 1908 .



## 2.0.- TAXONOMIA

Toxoplasma gondii es un Protozoario perteneciente al grupo de los Sporozoarios y aunque su clasificación es un poco variable según el autor consultado, en el presente trabajo seguiremos la clasificación de Levine N. D. et. al. (1980) ya que es la clasificación más reciente que se tiene de los Protozoarios (15).

Phylum	Apicomplexa	Levine 1970 .
Clase	Sporozoa	Leuckart 1879 .
Subclase	Coccidia	Leuckart 1879 .
Orden	Eucoccidiida	Léger y Duboscq 1910 .
Suborden	Elmerlina	Léger 1911 .
Género	<u>Toxoplasma</u>	
Especie	<u>gondii</u>	Nicolle 1909 .

### 3.0- B I O L O G I A .

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que en mamíferos evoluciona dentro de cualquier célula que proceda de las tres capas blastodérmicas, excepto en eritrocitos. Pero los glóbulos rojos del embrión de la gallina y del canario son parasitados por el toxoplasma (Wolfson, 1942) (20,31). La penetración a las células se realiza gracias a un Factor Intensificador de la Penetración (Penetration Enhancing Factor o P. E. F.), el cual desempeña un papel más importante que la propia fagocitosis (16) y su localización en el hospedero es prácticamente en cualquier órgano: ojo, cerebro, ganglio, músculos, útero, corazón, pulmón, hígado, bazo, etc., aunque se le puede localizar con mayor frecuencia en células retículoendoteliales (macrófagos, linfocitos, monocitos, células parenquimatosas). Algunos autores consideran a la toxoplasmosis como la infección más frecuente en el sistema nervioso central y suele producir alteraciones focales neurológicas sobre todo convulsiones (27).

La enfermedad humana producida por este Protozoario es conocida como Toxoplasmosis y es considerada actualmente como la parasitosis más extendida en el mundo. Según Roch (1971), uno de cada tres individuos a nivel mundial lo presenta. El haberle reconocido el carácter antropozootico lo eleva a ser considerado como una zoonosis cosmopolita este concepto fué introducido por Virchow a la terminología médica, para designar las enfermedades de los animales que pueden ser transmitidas al hombre. Un grupo de expertos reunidos en 1959 por la O. M. S., definía la zoonosis como Infecciones y

enfermedades naturales transmitidas entre los animales vertebrados y el hombre, (32). Y al toxoplasma como un parásito eurixeno (cuando muchas especies de animales les sirven de reservorio a un mismo parásito) (32).

El ser parásito intracelular obligado le confiere una característica biológica importante, al ser cultivado, ya que esto sólo se puede realizar en cultivos de tejidos (12) o bien en cavidades peritoneales de algunos animales de laboratorio que sean susceptibles a su patogenicidad y además fáciles de ser trabajados como pueden ser ratones, ratas o cobayos .

Ocasionalmente se localizan extracelularmente en líquidos orgánicos como pueden ser: Humor acuoso y humor vítreo, leche, líquido ganglionar, orina, saliva, lágrimas, placenta y heces. (26).

El hospedero definitivo de T. gondii es el gato y todos los felinos que es, donde realiza su reproducción sexual (Gamogonia), y todos los demás organismos incluyendo la especie humana son hospederos intermediarios.

### 3.1 MORFOLOGIA .

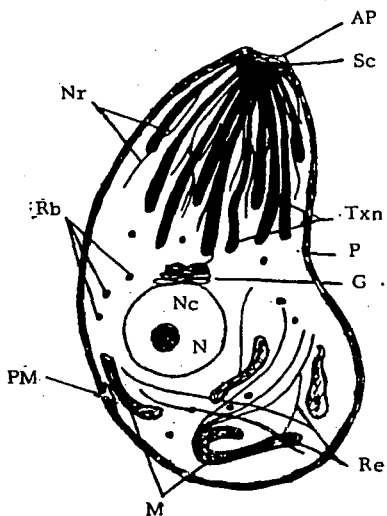
En su estado Trofozoito, el parásito se divide activamente, debido a esto varios autores prefieren llamarlo como forma Proliferativa o Taquizoito (32). Su apariencia es arqueada semejante a una media luna y mide de 4 a 7  $\mu$  m de largo por 2 a 4  $\mu$  m de ancho (6), presenta un polo superior fino que termina en forma de

cono y el inferior es esférico lo que le confiere al parásito el aspecto de una pera. Posee su membrana celular, el núcleo con una localización paracentral y su citoplasma que es refringente, presenta aparato de golgi, ribosomas retículo endoplasmico rugoso, mitocondrias y granulos de volutina que contienen glucoproteinas. Carece de órganos de locomoción y su desplazamiento lo realiza por flexión del cuerpo y deslizamiento. Se tinte fácilmente con Giemsa o Wright (14). Con dicha tinción y May Grunwald-Giemsa, se distingue una membrana a veces granulosa, con citoplasma de color azul y núcleo rojo.

Su extremo anterior es aguzado y muy móvil en ocasiones forma un ángulo con el resto del cuerpo y esto se llama trombicula que es el organelo que le sirve al parásito para invadir la célula hospedera (26).

Con ayuda del microscopio electrónico se ha observado que el microorganismo presenta un sistema de membranas, una externa continua de 25 Å aproximadamente de ancho, un espacio refringente de 30 a 35 Å de grueso y una membrana plasmática de 25 Å de grueso interrumpida en pequeños tramos. Posee un pequeño orificio llamado Micrópilo que se sospecha tiene funciones respiratorias. En el polo superior y en contacto con la pared (formando parte de ella), se distingue una condensación en forma de cono truncado, es el Sistema Conoide cuyo vertice esta formado por un anillo de 0.15 a 0.25  $\mu$  m de diámetro es el anillo polar, y parece comunicarse con el medio exterior, de la base del conoide surgen dos tipos de sistemas fibrilares, uno de ellos muy fino y submembranoso en número de 8 a 10 separadas por un espacio de 0.18 a 0.3 micrómetros, llamadas

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.- Mitocn  
drias PM.- Micropilo.

nervaduras radiales, estas fibras tienen función nerviosa o de relación y control de los movimientos de la pared. Las otras fibras que son más gruesas, cilíndricas ectoplásmicas osmófilas y uniformes en su estructura interna, se llaman toxonemas, este sistema de fibras tienen funciones enzimáticas y digestivas. Por medio de este sistema conoide el toxoplasma realiza la invasión celular (26) .

### 3.2.- L O C O M O C I O N .

Este microorganismo no posee órganos de locomoción, pero logra su movimiento por tres formas: movimientos ondulatorios de la pared del cuerpo que se dirigen del extremo inferior al extremo superior (sistema conoide), y este movimiento está bajo el control del Sistema de Nervaduras Radiales submembranas; movimientos circulatorios y finalmente movimientos de tirabuzón logrando esto cuando fija el sistema conoide.

### 3.3.- F O R M A S      M O R F O L O G I C A S .

1. Forma Taquizoítica (Trofozoito), mide de 4-7  $\mu$ m de largo por 2-4  $\mu$  m de ancho, tiene forma arqueada semejante a una media luna. Esta forma es la causante de la fase aguda de la enfermedad y se le observa en el interior de diversas células donde se multiplica y les produce lisis celular, liberando entonces nuevos taquizoitos, los cuales invadirán las células adyacentes o bien son fagocitados. Esta forma es muy lábil y en consecuencia sensible al

jugo gástrico susceptible de ser destruido por las quimioterapias (6). Aunque es parásito intracelular obligado se desconocen las causas precisas de esta característica ya que en ambientes extracelulares pueden llevar a cabo síntesis de RNA y DNA (32), sin embargo no sobrevive a la desecación o al efecto de los jugos digestivos del hospedero. El parásito penetra a las células de cualquier tejido gracias a factores mecánicos y enzimáticos que modifican la membrana de la célula hospedera (32). En consecuencia se dice que el núcleo de su célula hospedera no le es indispensable para su sobrevivencia. Se han llevado a cabo experimentos (24), empleando DNA y RNA marcados con tritium en su estado taquizoito, estando fuera de su célula hospedera y se ha observado que la síntesis de los ácidos nucleicos se continua, aunque sea por pequeños períodos de tiempo en estas condiciones extracelulares. Hay reportes que refieren la presencia de enzimas mitocondriales presentes en todo el microorganismo y en consecuencia se niega que la necesidad de energía sea la causa por la que es incapaz de vivir extracelularmente.

2. Forma Quística. Terminada la multiplicación taquizoítica, la cual depende de la acción de mecanismos inmunitarios (18). Los parásitos se alojan en varios tejidos, sobre todo en el miocardio, el cerebro y las tunicas oculares en forma de quiste, que es el estado responsable de la infección crónica (latente). En virtud de una tolerancia y una adaptación recíproca entre el agresor y el hospedero esta fase de la afección es asintomática. El quiste mide de 20 a 200  $\mu$  m, su tamaño tan variable depende del número de microorganismos que contenga y que van de 50 a 3000 parásitos (26). En este estado presenta una forma esférica cuando se localiza en el

cerebro y alargada si se encuentra en fibras musculares, como resultado de la aparición de inmunidad se alojan en el interior del quiste los pequeños microorganismos llamados Bradizoitos, que se multiplican lentamente. Esta forma es resistente al jugo gástrico y a los medicamentos Anti-toxoplasma, su vida es prolongada y logra permanecer en este estado por varios años e incluso toda la vida y son capaces de sobrevivir hasta 3 horas en los jugos digestivos del estómago (14).

Se ha mencionado que la formación del quiste depende de la inmunidad desarrollada por el hospedero, pero también se les ha observado en animales inmunosuprimidos así como en cultivo de tejidos, lo cual sugiere otros factores involucrados en su formación (26). Dentro del quiste hay cientos o miles de bradizoitos con dimensiones variables que pueden alcanzar hasta  $20 \mu\text{m}$  y esta forma puede resistir hasta 30 días las temperaturas de refrigeración (14).

Algunos estudios como los de Frenkel *et al.*, y de Hutchinson *et al.*, mostraron una nueva forma de presentación del toxoplasma que es el Oocisto.(28)

3. Forma Oocisto (u Ooquiste). En el gato y en algunos otros felinos que son los hospederos definitivos se produce un ciclo parasitario en las células epiteliales del intestino (6) donde ocurre multiplicación esquizogónica seguidas por un ciclo gametogónico y el resultado de este ciclo sexual es la formación del Oocisto, el cual tiene forma esférica de alrededor de  $10 \mu\text{m}$  de diámetro y en el medio exterior y en condiciones ambientales y es muy resistente a las condiciones ambientales (frio, sequedad, desinfectantes como el hipoclorito de sodio), (27). Por lo mismo



representan una fase muy importante en la diseminación y dispersión del parásito, llegando a hortalizas, jardines y zonas de recreo donde contaminan a los niños, el agua y los alimentos (6), aunque requieren de oxígeno y humedad (14) para realizar la esporogonia y así llegar a tener la capacidad de infectar (10,27).

Cuando se ha producido la infección con quistes, en el gato se encontraran los oocistos en sus heces entre el tercero y quinto día después de la infección. Si es con taquizoitos apareceran los oocistos de 7 a 10 días después, pero si se ha parasitado con oocistos procedentes de otros gatos entonces la aparición de oocistos en heces se efectuará después de 20 a 24 días, el número de oocistos que se eliminan junto con la materia fecal puede llegar a ser de 10 millones diariamente en periodos de unos 20 días (32).

#### 3.4.- C I C L O        D E        V I D A

La reproducción asexual de Toxoplasma gondii, se efectua por fisión binaria longitudinal, comenzando su división en el polo superior, bien sea por amitosis o por mitosis, realizandoló en un tiempo aproximado de 6 horas (Cross y Anigstein, 1949) (26). Los parásitos continuan su reproducción intracelular hasta lizar su célula hospedera, aproximadamente en un tiempo de 24 hrs.. Los taquizoitos libres, tienen dos caminos a seguir, y el que sigan dependerá de varias condiciones como son, el pH del medio (Norrby y Luke, 1967), elaboración de factores de penetración por parte del toxoplasma y que la división se realice dentro de células fijas de

tejidos u órganos o en células móviles como monocitos, linfocitos, macrofagos, neutrofilos, etc.. En el primer camino los parásitos invaden las células adyacentes y la rapidez e intensidad dependerá del desarrollo del P. E. F..(16). En el segundo camino, en caso de que la célula hospedera sea móvil, los parásitos se agrupan o enquistan dentro de ésta, ocupando material del citoplasma para formarse una nueva membrana poco refringente, que contiene a los toxoplasmas originando el quiste y después al quiste maduro, que es la forma de resistencia, entonces la reproducción se hace lenta, y después de 4 a 10 meses la reproducción es aun más lenta y en esta forma el microorganismo se protege por meses o incluso años, hasta su desenquistamiento momento en el cual puede originar formas clínicas cistas o formas recidivantes o llegar a calcificarse, por lo que el quiste es una de las formas infectantes activas de la toxoplasmosis.

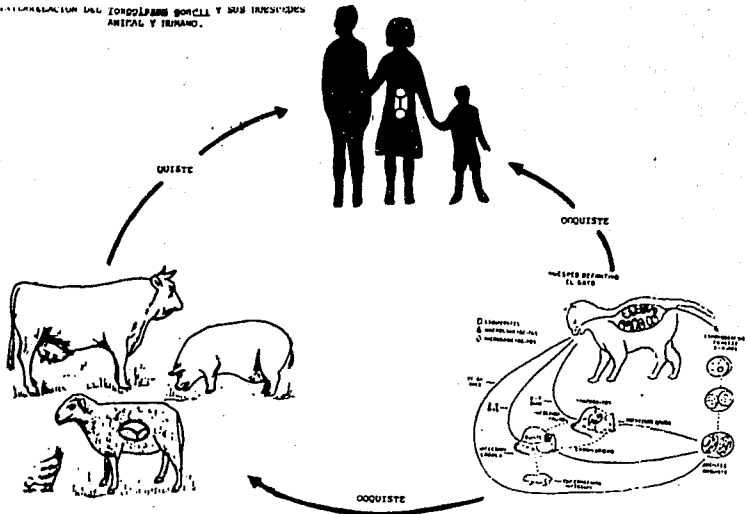
Otro mecanismo de reproducción es por endodiogenia que consiste en que el núcleo de la célula madre, produce 2-yemas, que crecen sin llegar a separarse del núcleo, hasta dar origen a 2 toxoplasmas dentro de la célula madre y posteriormente llega la separación (8,23).

Frenkel et al., 1970 (23) observaron la fase de reproducción sexual del microorganismo en el epitelio del gato, considerandolo entonces como el hospedero definitivo. El gato y otros felinos se infectan en la naturaleza principalmente por la ingestión de quistes presentes en la carne de otros animales. Los esporozoitos liberados de los oocistos ingeridos por el gato o los taquizoitos que salen de la forma quística después del desenquistamiento producido por los jugos digestivos del hospedero,

llegan al intestino del gado y penetran en las células epiteliales donde comienzan su reproducción asexual por esquizogonia que originará a los merozoitos que pueden continuar con otras esquizogonias o bien realizar su reproducción sexual por gamogonia y producir entonces los macrogametos y microgametos que después de la fecundación originaran al oocisto, el cual saldra junto con la materia fecal del gato. Si las condiciones ambientales son favorables en humedad y temperatura de 20 a 24 °C, el parásito continua su reproducción por esporogonia durante 1 a 3 dias, tiempo en que llega a alcanzar su estado infectante. Cada oocisto contiene 2 esporoblastos y cada uno de ellos 4 esporozoitos. (Esporogonia) (23,32).

Con lo anterior mencionado nos damos cuenta que el gato siendo un animal domestico juega un papel importante en el aspecto epidemiológico, para el hombre a diferencia de los demás felinos. Los hospederos intermediarios son diferentes especies de mamíferos tanto carnívoros como herbívoros, aves y el mismo hombre, en todos la infección se inicia con la ingestión de quistes presentes en la carne de animales que se encuentran parasitados o bien por los oocistos que llegan a contaminar diversos alimentos y el agua. Además en todos los animales es posible el paso del parásito via placentaria originandose las infecciones "in útero". Ahora bien la transmisión congénita en el hombre (26). puede llevarse a cabo durante la infección aguda. Dado que el parásito puede vivir durante horas o incluso dias en varios artrópodos hematófagos se sospecha que los insectos y garrapatas pueden también actuar como hospederos intermediarios, interviniendo en la transmisión del parásito. (9,10).

TRANSFORMACION DEL TOXOPLASMA GONCII Y SUS INFECCIONES ANIMAL Y HUMANO.



Ciclo de vida del Toxoplasma mostrando las principales vías de transmisión por medio de ooquistes 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 ooquistes. 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.

#### 4.0- EPIDEMIOLOGIA .

La toxoplasmosis es una enfermedad muy difundida en nuestro país como lo revelaron, hace varios años los estudios de Varela y Roch (34,35), se puede decir que se desconoce la situación epidemiológica actual a nivel nacional. No obstante la experiencia que se tienen en otros países, indica la gran magnitud del problema. Ambroise-Thomas et. al. (1), encontraron en Francia que de 12,000 sueros probados había 7,000 positivos a la reacción de Sabin-Feldman. El microorganismo se encuentra en todos los ordenes de mamíferos y en algunas aves y probablemente también en reptiles (20,26). Las tres formas morfológicas que presenta el parásito durante su ciclo de vida tienen cada una la capacidad de infectar, por supuesto bajo condiciones diferentes. En caso del quística, infectará a través de la ingestión de carne cruda o mal cocida. El oocisto es adquirido por la ingestión de cualquier alimento contaminado por la materia fecal del hospedero definitivo. En cambio el taquizoito, debido a su labilidad y a los cambios ambientales requiere condiciones especiales que faciliten su arribo a otro hospedero. En la actualidad la vía transplacentaria es considerada como la más frecuente para que esta forma llegue a parasitar a su nuevo hospedero, esto ya ha sido ampliamente demostrado en animales y en el hombre (23).

Los hospederos definitivos del parásito son el gato y otros felinos como el linco, el puma, y el jaguar que se contaminan por los oocistos o bien cuando se alimentan de otros animales que

albergan al parásito. Con lo que respecta a la diseminación de la parasitosis es de capital importancia la contaminación del suelo, ya que además del gato pueden infectarse otros animales como los bovinos caprinos, porcinos, perros, roedores y aves, desarrollandose en ellos una infección asintomatica o inaparente. Experimentalmente se ha determinado en ratones que su susceptibilidad o resistencia genetica se puede deber a sus mecanismos inmunológicos. (29). En los estudios de Williams et. al. describe por lo menos 2 genes que determinan la supervivencia después de la infección con toxoplasma (13)

En el caso del ser humano, se infecta por la ingestión de oocistos esparcidos en el ambiente o por la ingestión y contaminación a través de los hospederos-transportadores, cuando la carne cruda o poco cocida forma parte de los habitos alimenticios, ocasionalmente pueden ingerirse quistes toxoplásmicos localizados en tejidos animales y resistentes a la digestión clorhidro-péptica, en el intestino delgado se liberan los bradizoitos, atraviesan la mucosa intestinal y producen la infección. En una investigación serológica realizada en animales que el hombre utiliza como fuente alimenticia Guillo y Desmonts (6) encontraron serologia positiva en 72 % de los carneros, un 4 % de los bovinos y un 9 % en los caballos por lo tanto, es de aceptación unanime que la infección del hombre se realiza por la via oral al ingerir alimentos contaminados.

Otros factores que estan en relación con la prevalencia de la toxoplasmosis aparte de la población de gatos, son el clima, altitud sobre el nivel del mar, habitos de alimentación y susceptibilidad al desarrollo de la infección. Al tratar de encontrar la relación entre ellos, se han visto diferencias cuya explicación no

es totalmente satisfactoria. Por ejemplo, es aceptado por algunos investigadores que la frecuencia de la infección es mayor en las regiones tropicales o aquellas más cercanas al Ecuador, pero la prevalencia de anticuerpos en mujeres embarazadas cuyas edades fluctúan entre los 15 a 35 años, es muy semejante en países como Francia y Centro América, pero muy diferente a las de Nueva York y Londres. De cualquier manera hay acuerdo unánime, que en países como México, de acuerdo a encuestas realizadas por Roch y Varela (1971) con la reacción de Sabin y Feldman, la tercera parte de la población está infectada y la positividad aumenta con la edad, superando valores de 70 % después de los 50 años.(32).

Se ha establecido que la forma congénita de la toxoplasmosis se transmite por vía placentaria. Es admitido que la mujer que se infecta durante la gravidez logra transmitir al producto una enfermedad congénita de un amplio espectro sintomatológico que puede producir repercusiones graves para el recién nacido. Entre los trabajos que existen relativos a la prevalencia de anticuerpos antitoxoplasma en la mujer de edad reproductiva y en particular en la embarazada pueden destacarse los realizados en Nueva York, Londres y París. En cuanto a Nueva York de 4,048 mujeres embarazadas el 32 % presentaban serología positiva, en tanto que Londres de 3,169 solo el 22 % presentó serología positiva, pero en flagrante contraste se encuentra París donde la serología positiva alcanzó el 87 % de 1,206 mujeres embarazadas que fueron estudiadas. Según Desmonts y Couvreur (6) entre las mujeres que contraen la enfermedad durante la preñez el riesgo de infección fetal alcanza el 41 % .

Hay que mencionar la importancia que tiene la época en

que ocurre la infección materna, cuando esta es cercana a la concepción pocas veces se contamina el feto. Cuando sucede en el primer trimestre la contaminación fetal es poco común (17 %), pero muy grave. La infección materna en el tercer trimestre del embarazo ocasiona una contaminación fetal frecuente (65 %), pero mucho menos grave y se presenta con formas asintomáticas. En el segundo trimestre los resultados obtenidos son intermedios (25 %). (10,19). Finalmente la toxoplasmosis durante el embarazo puede ocasionar abortos o bien después del parto el niño, puede presentar una infección aguda grave que puede ser observada clínicamente a los tres días posteriores al nacimiento, pero también puede presentarse en forma asintomática, y un análisis serológico puede dar una respuesta de la presencia o ausencia de toxoplasma (2).

La toxoplasmosis tiene una amplia distribución en Venezuela (5). En este país se realizó un estudio serológico mediante IgG en pacientes obstétricos, oftalmológicos y pediátricos, así como en enfermos con diversas manifestaciones clínicas atribuibles a toxoplasma y en individuos asintomáticos, para establecer la prevalencia y relación cuantitativa de anticuerpos para T. gondii, y en todos los casos clínicos que recibieron tratamiento específico se curaron, excepto los niños con síntomas neurológicos, las embarazadas tuvieron niños sanos los cuales no obstante recibieron tratamiento preventivo,

El índice de infección toxoplásmica varía de región a región. Niedman et al., (6) han referido índices que están próximos al 90 % para la isla de Pascua, En San Pablo, Brazil empleando la



reacción de Sabin-Felman encontró una positividad de 18.4 % en niños de 10 años y de un 67 % en la población general. En realidad las investigaciones serológicas en las regiones más diversas han demostrado un hecho común: El índice de infestación por toxoplasmosis aumenta con la edad, En el adulto las cifras llegan de un 40 hasta un 80 % según el área geográfica estudiada. También se ha concluido que la infección es más frecuente en regiones calientes y húmedas que en la frías o secas y aparece más común entre quienes están en contacto con los animales según lo demuestra la investigación realizada por Vaagecon quien empleo como antígeno la toxoplasmina . Las áreas rurales son las más afectadas y el padecimiento se manifiesta en forma esporádica, excepcionalmente se han descrito pequeñas epidemias (6). Aunque la infección humana es muy común la enfermedad clínica es menos frecuente, estimaciones hechas mencionan que al rededor de un tercio de la población mundial presenta anticuerpos para Toxoplasma gondii. Pero la tasa de prevalencia en sujetos seropositivos se incrementa muchísimo en algunos países, como es el caso de Francia donde el consumo de carne cruda es común por razones culturales lo que incrementa sus datos hasta un 80 % (8).

Algunos laboratoristas se pueden infectar de manera accidental a través de la manipulación de animales y material de laboratorio infectado (23) y desarrollar formas graves de la parasitosis, otros mecanismos de transmisión que se han mencionado incluyen las transfusiones de sangre ya que el parásito, se ha visto que puede permanecer viable en el interior de los leucocitos, hasta el año de 1980 fue posible demostrar la transmisión a través de la leche materna.

La infestación por toxoplasma hasta hace poco tiempo no se había observado en los esquimales de Alaska y en consecuencia se admitía que no existía entre ellos, no obstante, recientemente se han descrito títulos serológicos positivos en esta población (6). Con esta observación es más comprensible el dato mencionado por la O. M. S., que de una población mundial estimada en, 3,500,000,000 había 1,100,000,000 individuos parasitados con este microorganismo (26).

Por lo anteriormente mencionado, la propagación de la toxoplasmosis en la naturaleza puede verificarse de alguna de las siguientes formas :

1. De animal a animal: la más frecuente
2. De animal a hombre: frecuente
3. De hombre a hombre: la forma congénita frecuente, la forma adquirida menos frecuente
4. De hombre a animal: rara.

### 50.- CUADRO CLINICO

El cuadro clínico de la toxoplasmosis varía desde las formas asintomáticas hasta los cuadros diseminados a encefalitis y causar incluso la muerte del individuo (10). La infección en tejidos sin posibilidad de regeneración como el sistema nervioso (12) o bien la retina y músculos dan como resultado manifestaciones clínicas más evidentes que en órganos como el hígado, pulmones, riñones o ganglios que tienen un mayor grado de reserva funcional y capacidad de adaptación (14).

El cuadro clínico se puede dividir en : adquirido y congénito. Los adquiridos son:

- a). Toxoplasmosis ganglionar que es la forma clínica más frecuente.
- b). Toxoplasmosis ocular, donde se tendrán limitaciones visuales e incluso la pérdida del ojo.
- c). Toxoplasmosis generalizada Se presenta proliferación del parásito parénquima visceral, necrosis e infiltración celular en miocardio, pulmones hepatitis y la localización encefálica es rara pero posible. (33).

Es frecuente que la manifestación fundamental se presente por encefalitis con alteraciones en estado de conciencia confusión, letargo, desorientación o estado de coma, y manifestaciones como parálisis, convulsiones y signos de hipertensión intracraneana (vómitos, cefalea) y alteraciones en los reflejos osteotendinosos.

En la Toxoplasmosis congénita, las manifestaciones clínicas en el recién nacido son: edema y necrosis de retina, lesiones en el estrato pigmentario de conos y bastones, inflamación de coroides y retina (coriorretinitis). En sistema nervioso central provoca zonas de inflamación que pueden ocasionar obstrucción de Silvio, causando hidrocefalia o bien microcefalia (10). Para situar la importancia de la toxoplasmosis en la alteración del volumen craneal en niños de 2 años, se puede mencionar que el 6 % de los hidrocefálicos y el 1.7 % de los microcefálicos son de etiología toxoplasmática, y en cuanto al retraso mental infantil en México por esta enfermedad según Biagi lo estableció en por lo menos 2,000 casos por año. (14).

#### 40.- DIAGNOSTICO

El diagnóstico definitivo se logra al aislar e identificar el parásito, para lograr esto existen varios procedimientos de laboratorio, uno de ellos es la biopsia cerebral, de medula ósea y placenta o la obtención de fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, ventricular, humor acuoso, esputo o sangre, para esto se recurre a la inoculación de animales susceptibles como el ratón blanco, hámster dorado, embrión de pollo y siembra en cultivo de tejidos.(11,19) La diagnosis inmunológica es el método más práctico y el que resuelve en gran parte los problemas que se presentan para demostrar, aislar e identificar a Toxoplasma gondii. (2).

La detección y cuantificación de anticuerpos permite valorar la fase evolutiva en que se encuentra el padecimiento sobre todo si se conjuntan dos o tres pruebas, ya que se pueden presentar resultados negativos en una y positivos en otra por ejemplo si con la prueba de Sabin-Feldman el resultado fuera negativo con ELISA puede salir positivo ya que esta es una prueba más confiable y mucho más sensible (36).

Entre las pruebas serológicas que se pueden efectuar se menciona : (7).

- 1.- ELISA ( Enzime linked immunosorbent assay ).
- 2.- Inmunofluorescencia indirecta.

- 3.- Hemaglutinación indirecta.
- 4.- Reacción de fijación del complemento.
- 5.- floculación.
- 6.- Sabin-Feldman.

Algunas presentan ventajas sobre otras pero todas tienen una alta sensibilidad, y si se llevan a cabo dos o más pruebas los resultados son más confiables (11). Con respecto a la inmunidad celular es valorada con fines epidemiológicos mediante intradermoreacción con toxoplasmina que da resultados positivos a partir del primer mes y se prolonga incluso hasta un año después de haber padecido la infección (10).

El resultado de las pruebas inmunológicas no es el diagnóstico en si, ya que estos resultados siempre se deben correlacionar con las manifestaciones clínicas del paciente y en títulos serológicos sospechosos se deben efectuar titulaciones seriadas con intervalos de 15 a 30 días.

No se debe olvidar que el diagnóstico definitivo solo se obtiene mediante la demostración del agente causal que aunque es difícil, debe intentarse (11).

## 7.0.- PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Las medidas preventivas deben concentrar su atención principalmente en el hospedero definitivo, así las fuentes y mecanismos más importantes de infección son:

2. Gatos domésticos, por la eliminación fecal de oquistes, idealmente deben ser entrenados para defecar en recipientes para ser colectadas de inmediato y lavar con jabon y agua hirviente el lugar donde defecan.
2. Los gatos deben ser alimentados con carne cocida, seca o enlatada y evitar el contacto con gatos "callejeros".
3. Evitar el contacto intimo con los gatos, esto es especialmente importante con las mujeres embarazadas.
4. Remover la reciente materia fecal del gato, tan rápido como sea posible, ya que la materia vieja debe ser considerada especialmente como un peligro porque después de, al menos 2 días los oocistos presentes han alcanzado su maduración y se han hecho infectantes.
5. Evitar el comer carne cruda o mal cocida ya que los quistes tisulares requieren temperaturas de 66 °C o tratamiento de ahumado o curación de carnes frías para su destrucción. La congelación a -20 °C no garantiza la inactividad de los quistes, pero al menos reduce considerablemente el número de bradizoitos.
6. Lavar perfectamente bien todo tipo de alimentos vegetales y frutas, tomar leche pasteurizada ya que estos productos se han mencionado como fuentes de infección.
7. Se debe tener una buena higiene personal, lavarse las manos cuidadosamente antes de ingerir alimentos, evitar comer en la calle o tomar aguas preparadas en lugares que no garanticen una buena higiene.
8. En la prevención de la toxoplasmosis congénita, la mujer

embarazada debe evitar el contacto con gatos y no debe limpiar los recipientes donde se recogen las evacuaciones de los gatos o el lugar donde defeco.

En cuanto a su tratamiento se debe mencionar que en el caso de inmunización activa, las vacunas experimentales con parásitos vivos han mostrado ser dafinas y los microorganismos muertos no confieren suficiente protección, Couvreur emplea el siguiente tratamiento :

- a). Pirimetamina + Sulfadiazina durante 21 días: La pirimetamina por vía oral en dosis de 1 mg/kg/día (14) en tomas de 2 a 3 días la sulfadiazina en dosis de 50 a 100 mg/kg/día por vía oral y tomas cada 12 horas. (6).
- b). La sulfametazina, sulfamerazina y sulfapirazina a dosis de 150 mg/kg/día en 4 dosis por vía oral durante 3 semanas todas las anteriores sulfas son sinérgicas con la pirimetamina (8 veces la simple adición), respecto al toxoplasma. El efecto antifólico (ac. fólico, miembro del complejo vitamínico B), de la pirimetamina y la sulfadiazina, causan una depresión reversible, La administración diaria de 3-10 mg de ácido fólico (sal cálcica) disminuye la toxicidad sin inhibir el efecto terapéutico
- c). Acido fólico, 5 mg dos veces por semana mientras el paciente este recibiendo pirimetamina y sulfadiazina.
- d). Prednisona o metilprednisona, de 1 a 2 mg/kg/día vía oral en 2 tomas.
- e). La clindamicina a dosis de 25 mg/kg de peso vía intramuscular, y

periocular ha demostrado actividad terapeutica en la retinocoroiditis

En la mujer embarazada el tratamiento debe ser cauteloso ya que la pirimetamina puede ocasionar efectos teratogénicos (formación y desarrollo de monstruosidades), demostrado en animales de laboratorio, por tal motivo se ha proscrito su empleo en embarazadas.

También existen experimentalmente métodos y tratamientos utilizando radionúclidos (30), donde proponen los autores la utilización de un nuevo radio fármaco donde los anticuerpos antitoxoplasma marcados con indio-113 metastable permiten obtener imágenes de toxoplasma extracelular y así llegar rápidamente a un diagnóstico diferencial sobre todo en problemas encefálicos. También descubrieron a nivel experimental en animales de laboratorio una respuesta terapéutica muy favorable y atóxica utilizando anticuerpos marcados con iodo-131, sin embargo para ser utilizados en el ser humano por supuesto que se requiere un mayor número de estudios.

## 8.0.- I N M U N I D A D .

Los parásitos invaden las células del hospedero en cuyo interior se multiplican, por lo cual producen la lisis celular con la liberación de taquizoitos los cuales infestan las células contiguas y así continua el proceso destructivo y solo logra detenerse con el



desarrollo de la inmunidad celular y humoral, además la destrucción de tejidos puede ocurrir hasta en ausencia de microorganismos lo cual indica un proceso inmunológico. (7). Pero existen lugares poco accesibles a los anticuerpos circulantes como es el sistema nervioso central y el ojo por lo cual aquí no se detiene el proceso destructivo en forma rápida. Protegidos dentro de sus células hospederas de las acciones de los anticuerpos los microorganismos se multiplican y forman los quistes hasta en presencia de anticuerpos y complemento en el espacio intersticial, hecho ya demostrado "in vitro" (6).

En 1963 Langer menciona haber observado varios casos de mujeres que presentaban abortos habituales o que daban a luz mortinatos, muchas de ellas fueron tratadas contra toxoplasma y después tuvieron niños normales, esto sugiere que la infección crónica (latente), era la responsable de los fracasos en la gestación. Ahora bien, existen varios factores que influyen en el hecho de que la toxoplasmosis sea asintomática (27), y estos pueden ser :

- 1). Virulencia de la cepa de Toxoplasma.
- 2). Susceptibilidad individual del hospedero.
- 3). La edad del hospedero
- 4). Grado de inmunidad adquirida por el hospedero.

## 9.0.- JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El presente trabajo forma parte de un proyecto que tiene entre sus objetivos producir reactivos que sirvan en la detección de la toxoplasmosis por medio de métodos inmunológicos. Esta enfermedad es una parasitosis que presenta diversidad, tanto en su localización en el hospedero, como en sus manifestaciones clínicas, (32). Lo que complica su diagnóstico clínico y parasitológico, aunado a un alto costo de los estudios clínicos. En la actualidad se emplean métodos inmunológicos para determinar la respuesta inmune humoral y celular o ambas en el individuo parasitado con Toxoplasma gondii y se considera a la inmunofluorescencia directa o indirecta como un buen método para identificar toxoplasmas en los tejidos, sin embargo el aislamiento del agente causal es la prueba más segura para demostrar una infección, aunque el aislamiento de T. gondii "in vivo" es muy difícil (23), pero se logra inoculando a los animales susceptibles como el ratón blanco, hámster dorado, embrión de pollo y siembra en cultivo de tejidos. (12).

Los problemas inherentes en el aislamiento e identificación de T. gondii, pueden ser casi resueltos al utilizar los métodos inmunológicos, por esta razón las investigaciones serológicas juegan un papel importante, así en el laboratorio

clínico, resulta más práctico y seguro la detección de respuesta inmune humoral y/o celular en el hospedero infectado por este parásito, la detección y cuantificación de anticuerpos permite valorar la fase de evolución en que se encuentra el padecimiento, siendo más eficaz el resultado, cuando se conjuntan dos o más pruebas, además repitiendolas con intervalos de tiempo de 15 a 30 días, una elevación de éstos puede indicar actividad del proceso, su descenso mejoría o al permanecer estables es probable que se trate de una toxoplasmosis infecciosa. con esto se tendrá un seguimiento que permita evitar el riesgo de una transferencia de toxoplasma "in útero", (11,19).

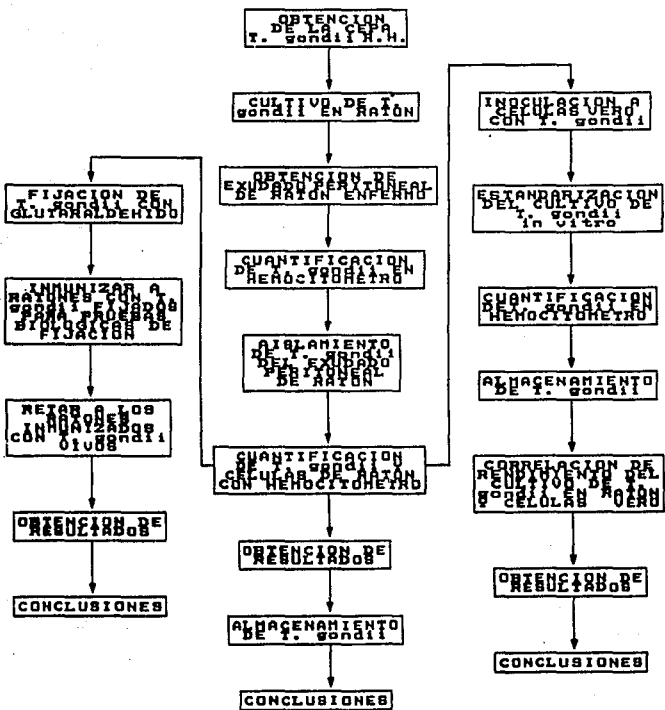
Con todo lo anteriormente mencionado nos damos cuenta de la importancia que tiene el diagnóstico clínico e inmunológico en la detección de la toxoplasmosis, en consecuencia es de suma importancia contar con una cantidad de antígeno suficiente, que permita llevar a cabo dichas pruebas, así el primer objetivo del trabajo con T. gondii, fue establecer condiciones y optimizar el cultivo del microorganismo que permita pasar, después a la producción de antígeno para efectuar pruebas inmunológicas en animales de laboratorio, y detectar anticuerpos contra T. gondii.

con el primer objetivo cumplido se puede optimizar la cantidad de antígeno producido, conociendo en que momento del cultivo se tienen más toxoplasmas y que método ocupar para eliminar células que contaminan al microorganismo, realizándose esto de una manera cualitativa y cuantitativa, en consecuencia estar en condiciones de llevar a efecto las pruebas inmunológicas experimentales a escala mayor con los reactivos obtenidos, y de efectuar trabajos paralelos

que permitan reafirmar el conocimiento de su morfología, ciclo de vida, patogenicidad, biología y demás aspectos inherentes del T. gondii, para esto se requiere contar con una gran producción de parásitos durante su cultivo.

En la cosecha obtenida del cultivo en ratón, se tiene el problema de contaminación con células del hospedero, lo que llevo a emplear cuatro métodos diferentes para eliminar estas células, ya que una vez que se tiene el antígeno y se emplea en pruebas inmunológicas se corre el riesgo de llegar a tener reacciones cruzadas o inespecíficas que ocasionan resultados difíciles de interpretar o incluso falsos o de una índole diferente a los intereses del trabajo. En la bibliografía revisada se mencionan varios métodos (centrifugación, filtración con membrana de  $3.0 \mu$  m de porosidad), que se aplicaron y otras desarrolladas en el laboratorio de Investigación del Instituto Nacional de Higiene dependiente de la Secretaría de Salud, que fueron; filtración a través de agujas de insulina y adherencia a "perlas de vidrio".

18.0.- ORGANOGRAMA



## 11.0- OBJETIVOS

- 1). Establecer y optimizar el cultivo de Toxoplasma gondii en ratón . y cultivo de tejidos, en el laboratorio.
- 2). Correlacionar los resultados de ambos métodos de cultivo seleccionando el más eficaz para obtener una mayor cantidad de Antígeno.
- 3). Determinar el rendimiento en la purificación de T. gondii, del exudado peritoneal de ratón, con diferentes técnicas.
- 4). Evaluar la respuesta inmune en ratones al inmunizarlos con Toxoplasmas fijados.

## 120.- MATERIAL Y METODO

### 121.- MATERIAL

- 1). Autoclave.
- 2). Baño Maria marca MAPSA modelo BMT - 8
- 3). Botellas de cultivo Corning de 25 cc..
- 4). Hemocitómetro .
- 5). Centrifuga Bekman .
- 6). Estuche de disección.
- 7). Estufa Hotpack modelo 305540 .
- 8). Jeringas de 5.0, 3.0 y 1.0 ml., con agujas de insulina.
- 9). Material de cristalería usual de laboratorio.
- 10). Microscopio de cultivo de tejidos.
- 11). Membrana Millipore de 3.0  $\mu$  m de porosidad.
- 12). Microscopio Optico.
- 13). Microscopio para cultivo de tejidos
- 14). "Perlas" de vidrio.
- 15). Potenciómetro Corning modelo 12.
- 16). Sistema de filtración Swinnex.
- 17). Tubos de policarbonato de 50 ml. para centrifuga Bekman.
- 18). Viales de diferente capacidad .

## 12.2.- REACTIVOS

1. Fenol al 10 %
2. Etanol.
3. Na Cl al 0.85 % .
4. Medio 199.
5. Glutaraldehido
6. Cloroformo o Eter .
7. Tripsina.

## 12.3.- MATERIAL BIOLÓGICO

- 1). Ratones blancos Cepa I. N. H.  
de 18 a 20 gr. de peso
- 2). Cultivo de Tejidos, en ,  
Células "Vero"



12.4.- Material para cultivo de Toxoplasma gondii en ratón.

1. Cepa de T. gondii , R. II .
2. Ratones Blancos.
3. Jaulas especiales para ratones.
4. Jeringas de 5.0 y 1.0 ml. con agujas de insulina.
5. Hemocotómetro.
6. Microscópio óptico.
7. Matraz de 200 ml .
8. " Perlas " de vidrio.
9. Estufa Hotpack modelo RC5C .
10. Viales de 2 a 10 ml. .
12. Tubos de policarbonato Sorvall de 50 ml. .
13. Potenciómetro Corning modelo 12 .
14. Membranas Millipore de 3.0  $\mu$ m de porosidad.
15. Cloroformo o Eter .
16. Material de protección como : bata  
guantes de cirujano  
cubre-bocas, etc.

### 13.0.- PROCEDIMIENTO

Toda la metodología descrita a continuación se llevó a cabo, empleando material estéril y en condiciones asepticas.

Una vez obtenida la cepa de Toxoplasma gondii R.H., del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, se mantuvo a través de pases sucesivos en ratones inoculandoles intraperitonealmente de 0.05 y/o 0.1 ml. de exudado peritoneal de ratón enfermo a ratón sano, y la cosecha se efectuó via lavado peritoneal con solución salina estéril al 0.85 % .

Para efectuar la "cosecha" y el "pase" cada 3 ó 4 días (20), se tiene que inocular por ratón 0.05 ó 0.1 ml. de exudado peritoneal, esto es 500,000 ó 1,000,000 de taquizoitos respectivamente, estas cifras van a variar según el número de microorganismos que se hayan desarrollado, después de efectuar el "pase" el resto de la "cosecha" fué sometida a la purificación parcial de T. gondii (eliminación de células de ratón de la "cosecha").

### 13.1.- CULTIVO DE Toxoplasma EN RATON

1. Sacrificar con cloroformo los ratones ( 10 ) enfermos de Toxoplasmosis.
2. Limpiar la piel de la zona ventral con alcohol.
3. Desprender la piel del ratón con mucho cuidado para evitar rasgar o romper el peritoneo.
4. Inyectar intraperitonealmente 4.0 ml., de NaCl esteril al 0.85 % utilizando agujas de insulina.
5. Mover el ratón, "agitandolo"
6. Cosecha: extraer con ayuda de jeringas de 5.0 ml., el exudado peritoneal donde ya estan suspendidos los toxoplasmas en solución salina.
7. De requerirse los 3-últimos pasos se repiten de 3 a 4 veces más por ratón para obtener la mayor cantidad posible de microorganismos.
8. Colectar el exudado en un matraz.
9. Efectuar la cuenta de células del ratón y del parásito en el hemocitómetro.
10. Pase: con este exudado se inocularon intraperitonealmente 10 ratones sanos, para continuar cultivando al toxoplasma.

### 13.2.- CULTIVO DE Toxoplasma EN CELULAS " VERO ".

1. Se efectuó el cultivo en 10 botellas de cultivo Corning de 25 c.c. / curva de crecimiento.
2. Pase: se inocularon 10 botellas de cultivo, que tienen una monocapa de células " Vero " y 8.0 ml. de medio 199, ajustando el inóculo a 1,000,000 de taquizoitos / caja .
3. Estas cajas se dejan en la estufa Hotpack a 37 °C.
4. Cada 24 horas se efectuó la cuenta de microorganismos en el hemocitómetro.
5. Cosecha: se colecta el medio 199 de las botellas de cultivo con ayuda de una jeringa, y el medio se elimina de los parásitos, siguiendo la técnica para obtener toxoplasmas concentrados.
6. Se concentran los toxoplasmas y se colocan en viales pequeños, guardando la muestra en el congelador .

### 13.3 PURIFICACION PARCIAL DE T. gondii

Para la eliminación de células de ratón de la "cosecha", que pueden ser más antigenicas que el propio microorganismo, y así evitar reacciones cruzadas al emplear los toxoplasmas o el antígeno, en las diferentes pruebas inmunológicas, se ensayaron varios métodos como son:

- a). Incubación-adherencia con " perlas " de vidrio a 37 °C.

- b). Centrifugación (17,29).
- c). Filtración con membranas de policarbonato (millipore) de 3.0  $\mu$  m, de porosidad (36).
- d). Filtración del exudado con agujas de insulina.
- a). El método de Incubación-adherencia, consiste en hacer que las células de ratón, se adhieran a las paredes del matraz y a las "perlas" de vidrio. Después de la cosecha se coloca el exudado peritoneal en el matraz con "perlas" en cantidad suficiente para que cubra el exudado y se dejó en la estufa Hotpack a 37 °C, de 2 a 3 hrs., al pasar este tiempo se colecta el exudado en otro matraz y se procede a la cuenta, para determinar su eficiencia.
- b). La centrifugación se realizó con una centrifuga Bekman a 500 r. p. m. / 3 min., a una temperatura de 4 °C antes de la centrifugación se llevó a cabo una cuenta celular en el hemocitómetro y después se revisó tanto el sobrenadante como el precipitado, para observar la eliminación de células y partículas de tejido de ratón .
- c). En la filtración con membranas, se emplearon membranas Millipore preparadas en un filtro Swinnex, realizando antes y después de la filtración la cuenta celular.
- d). En lo que respecta, a la filtración realizada con agujas de insulina, la cosecha se hace pasar a través de la aguja en 5 ocasiones, también se realizó un conteo celular, antes y después de la filtración.

#### 13.4.- OBTENCION DE TOXOPLASMAS CONCENTRADOS

La muestra que se obtiene del cultivo en Células " Vero " y de cada método de aislamiento se centrifugaron a 6,000 r.p.m. / 5 min., realizando los siguientes pasos.

- 1). Ajustar la centrifuga Sorvall a 4 °C .
- 2). Centrifugar la muestra en tubos de policarbonato a 6,000 r. p. m. / 5 min..
- 3). Eliminar el sobrenadante .
- 4). El precipitado se resuspende con NaCl esteril al 0.85 % empleando un volumen igual al exudado peritoneal "cosechado", y se repite la centrifugación.
- 5). Se repiten los 3 - últimos pasos 5 veces más, para lavar bien el material biológico.
- 6). El último precipitado se resuspende en una mínima cantidad de NaCl esteril al 0.85 % ( 2.0 ml. ) .
- 7). Se colecta el precipitado, que son los toxoplasmas en un vial pequeño y se guarda en el congelador.

#### 13.5.- FIJACION DE T. gondii

Para fijar los toxoplasmas se llevaron a cabo los siguientes pasos :

- 1). Ajustar la centrifuga Sorvall a 4 °C .
- 2). Centrifugar la muestra en tubos de policarbonato a 6,000

r. p. m. / 5 min..

- 3). Eliminar el sobrenadante .
- 4). El precipitado se resuspende con Na Cl esteril al 0.85 % empleando un volumen igual al exudado peritoneal "cosechado", se repite la centrifugación.
- 5). Agregar glutaraldehido al 6.0 % al segundo precipitado y resuspenderlo.
- 6). Dejar reposar 30 minutos.
- 7). Eliminar el fijador, repitiendo los puntos del 1 al 3 cuando menos 10 veces más.
- 8). El último precipitado se resuspende en una minima cantidad de NaCl esteril al 0.85 % ( 2.0 ml. ) .
- 9). Se colecta el precipitado, que son los toxoplasmas en un vial pequeño y se guarda en el congelador.

#### 13.6.- INMUNIZACION Y RETO

Con los microorganismos fijados se realizaron inmunizaciones a varios lotes de ratones, Los primeros 6 lote fueron inóculados con 0.1 ml. de cultivo de toxoplasmas fijados sin concentrar y el número de toxoplasmas vivos ocupados en el reto, para el primer evento fué de 14,950. ( se trato de ajustar el inóculo a 15,000 ) y en los sucesivos experimentos se retaron con un número lo más cercanos a 1,500 toxoplasmas / ratón , ya que el primer resultado de mortandad indicó que no se dio una respuesta inmune favorable.

En la inmunización con un número pequeño de toxoplasmas y su posterior reto se llevaron a cabo los siguientes pasos :

- 1). Se hicieron lotes de 10 ratones.
- 2). Se realizaron 5 inmunizaciones a cada ratón / lote ( una cada semana con 0.1 ml. de toxoplasmas fijados, sin concentrar
- 3). A la semana de la última inmunización se sangraron en blanco , todos los ratones.
- 4). El Suero Anti-Toxoplasma fué neutralizado agregandole un 50 % de su volumen, de exudado peritoneal de ratón enfermo y se incubo a 37 °C / 30 mdn.
- 5). El número de toxoplasmas en el suero a inocular a ratones sanos fué ajustado específicamente para cada lote.
- 6). Para el reto, se inóculo este Suero + Toxoplasmas vivos a ratones sanos.
- 7). Los ratones testigos fueron retados con el mismo número de Toxoplasma que su respectivo lote experimental, pero el suero fué sustituido por Na Cl esteril al 0.85 % .
- 8). Se llevaron a cabo observaciones diarias, anotando mortandad de ratones / día.

Los 5 siguiente lotes se inmunizaron y retaron con un número específico de toxoplasmas y fueron trabajados de la siguiente forma :

- 1). Se realizaron 3 inmunizaciones a cada ratón / lote ( una cada semana ) con : 500,000 ; 1,500,000 ; 2,500,000 y 5,000,000 de



toxoplasmas para los lotes 1, 2, 3 y 4 respectivamente, el 5to. lote que representa el testigo fué inmunizado con 0.1 ml. de Na Cl esteril al 0.85 % .

- 2). A la semana de la primera inmunización, fueron sacrificados dos ratones de cada lote para revisar su exudado peritoneal.
- 3). A la semana de la última inmunización se retaron los ratones con 2,485,000 Toxoplasmas vivos. ( se ajusto lo más posible a 2,500,000 )
- 4). Se llevaron a cabo observaciones diarias, anotando la mortalidad de ratones / día / lote .

Los 3 últimos lotes fueron inmunizados con toxoplasmas concentrados y se trabajaron de la siguiente forma :

- 1). Se realizaron 3 inmunizaciones a cada ratón / lote ( una cada semana ) con 0.1 ml. de toxoplasmas fijados y concentrados.
- 2). En los ratones testigos también se realizaron tres inmunizaciones pero con 0.1 ml. de Na Cl esteril al 0.85 % , una cada semana
- 3). A la semana de la última inmunización se retaron los ratones con 1,490 toxoplasmas vivos. (ajustando lo más posible a 1,500)
- 4). Se llevaron a cabo observaciones diarias, anotando la mortalidad de ratones / día / lote .

#### 14.0.- RESULTADOS

Se observa en el cuadro 1 la cantidad de taquizoitos y células de ratón / ml. obtenidas en diferentes cosechas del cultivo en ratón.

El cuadro 2 representa los promedios de crecimiento / día de Toxoplasma gondii , en cultivo de tejidos y el promedio de las 5 curvas de crecimiento realizadas, mostrando la gráfica 1 este desarrollo poblacional.

En el cuadro 3 se muestra la correlación de resultados de la propagación de T. gondii , en ratón y células "Vero" La gráfica 2 contiene la correlación de rendimiento del crecimiento poblacional en las 2 formas de cultivo.

Los resultados obtenidos en la Purificación de T. gondii , con el método de Incubación-Adherencia. Se observan en el cuadro 1 y gráfica 3

En el cuadro 4 se tienen los resultados alcanzados en la purificación del microorganismo empleando el método de centrifugación y la gráfica 4 nos representa estos resultados.

En el cuadro 5 se observan los resultados de recuperación de toxoplasma y eliminación de células de ratón con el método de, filtración con membrana y la gráfica 5 representa estos datos.

En el cuadro 6 se exponen los datos de recuperación y eliminación celular, con el método de filtración con agujas de insulina y la gráfica 6 se refiere a estos resultados.

CUADRO No. 1: Rendimiento de la Purificación de *Toxoplasma gondii* con el Método de Incubación-Adherencia.

T = Taquizoitos  
C-R = Celulas de Raton

No. de Celulas/ En Exudado Peritoneal	No. de Celulas de Taquizoitos de Purificación	% De Taquizoitos Recuperados % De Celulas de Raton Eliminadas
C-R : 19,750,000	C-R : 16,904,000	C-R : 85.65
C-R : 19,600,000	C-R : 10,169,000	C-R : 51.87
C-R : 14,700,000	C-R : 8,335,000	C-R : 56.69
C-R : 12,450,000	C-R : 8,850,000	C-R : 71
C-R : 12,100,000	C-R : 16,250,000	C-R : 134.26
C-R : 12,200,000	C-R : 11,550,000	C-R : 94.67
C-R : 12,000,000	C-R : 7,750,000	C-R : 64.58
C-R : 12,000,000	C-R : 12,250,000	C-R : 101.66
C-R : 11,450,000	C-R : 14,450,000	C-R : 126.20
C-R : 12,900,000	C-R : 13,250,000	C-R : 102.67
C-R : 12,100,000	C-R : 19,750,000	C-R : 163.22
C-R : 12,750,000	C-R : 9,700,000	C-R : 75.33
C-R : 12,150,000	C-R : 12,000,000	C-R : 98.76
C-R : 12,000,000	C-R : 8,450,000	C-R : 70.41
C-R : 12,000,000	C-R : 7,250,000	C-R : 60.41
C-R : 12,000,000	C-R : 12,450,000	C-R : 103.75
C-R : 12,300,000	C-R : 8,450,000	C-R : 68.69
C-R : 12,300,000	C-R : 11,250,000	C-R : 91.46
C-R : 12,250,000	C-R : 11,000,000	C-R : 89.79
C-R : 12,250,000	C-R : 8,250,000	C-R : 67.35

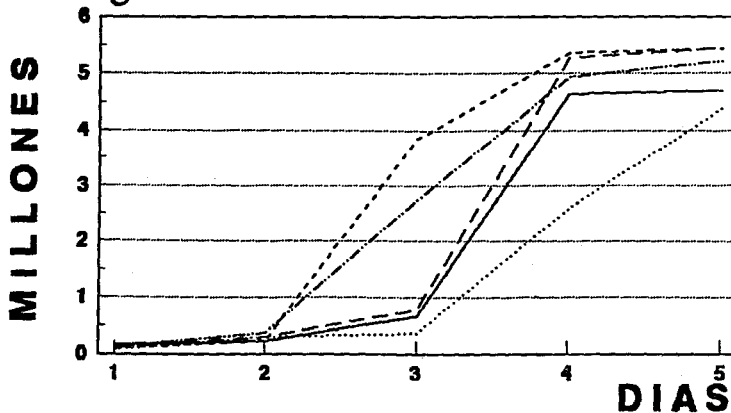
CUADRO No. 1 bis

No. de Celulas/ Peritoneal en Exudado	No. de Celulas después de la purificación	% De Taquixitos Recuperados % De Celulas de Raton Eliminadas
c-h : 3,500,000	c-h : 3,500,000	c-h : 82.10
c-h : 4,400,000	c-h : 2,400,000	c-h : 54.9
c-h : 3,950,000	c-h : 3,250,000	c-h : 75.18
c-h : 3,500,000	c-h : 4,550,000	c-h : 78.2
c-h : 3,950,000	c-h : 4,750,000	c-h : 78.0
c-h : 3,200,000	c-h : 3,000,000	c-h : 78.7
c-h : 3,350,000	c-h : 3,750,000	c-h : 82
c-h : 3,700,000	c-h : 2,150,000	c-h : 63.2 <sup>2</sup>
c-h : 3,030,000	c-h : 3,300,000	c-h : 71.7
c-h : 3,150,000	c-h : 3,500,000	c-h : 76.3

**CUADRO No. 2 : Rendimiento del crecimiento de T. gondii en células UERO.**

No. de Eventos	No. de Taquizoitos Inoculados / Botella	No. de Taquizoitos / ml.	Promedio del crecimiento de Taquizoitos/ml/día				
			1	2	3	4	5
1	1,035,000	129,375	175,000	225,000	650,000	4,637,000	4,700,000
2	1,000,000	125,250	100,000	250,000	3,650,000	5,350,000	5,437,000
3	900,000	122,500	83,000	300,000	362,000	2,590,000	4,390,000
4	990,000	123,750	120,000	300,000	700,000	5,275,000	5,450,000
5	1,050,000	131,250	127,000	301,000	2,750,000	4,950,000	5,225,000
<b>X</b> de Taquizoitos.	<b>1,011,000</b>	<b>126,425</b>	<b>121,000</b>	<b>291,200</b>	<b>1,600,000</b>	<b>4,562,000</b>	<b>5,040,000</b>

# CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *T. gondii* EN CELULAS "VERO"

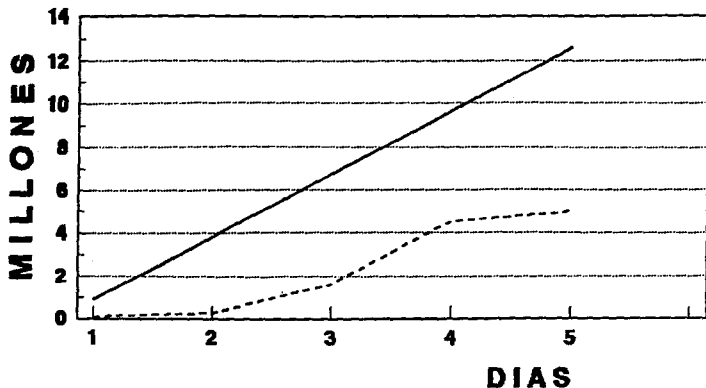


**CURVA 1**   **CURVA 2**   **CURVA 3**   **CURVA 4**   **CURVA 5**

CUADRO No. 3 : Correlacion de Rendimiento del Cultivo de T. gondii en Raton y Celulas UERO .

No. de Raton	X de Taquizoitos Inoculados /cultivo Raton	X de Taquizoitos /ml.	X de Exudado Peritoneal / Cosecha					X de Ganancia de Taquizoitos / Cultivo	
			1	2	3	4	5		
18	913499	<u>12,396,668</u>	Crecimiento Maximo 29,200,000					35	1,378
			Crecimiento Minimo 5,950,000						
No. de Botella Inoculadas / Cultivo	X de Taquizoitos Inoculados /Caja	X de Taquizoitos /ml.	X de Taquizoitos / ml / Dia.					X de Medio 199 / Cosecha	X de Ganancia de Taquizoitos / Cultivo
18	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000	78	498.52

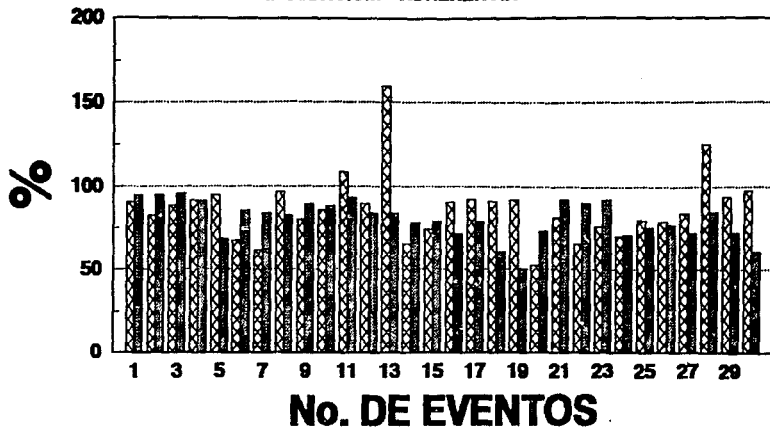
**CORRELACION DE CRECIMIENTO  
POBLACIONAL DE T. gondii EN  
RATON Y CELULAS VERO**



**RATONES C. "VERO"**



**RENDIMIENTO DE LA PURIFICACION DE  
T. gondii CON EL METODO DE  
INCUBACION - ADHERENCIA**



**% DE TAQUIZOITOS RECUP.**

**% DE CEL. DE RATON ELIMIN.**

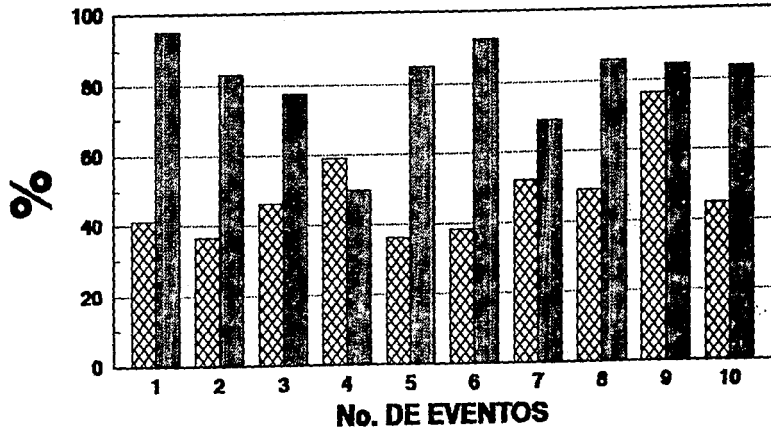
**GRAFICA No. 3**

CUADRO No. 4: Rendimiento de la Purificación de Toxoplasma gondii con el Método de Centrifugación

T = Taquizoitos  
C-R = Celulas de Raton

No. de Celulas en Exudado Peritoneal	No. de Celulas despues de la Purificacion	% De Taquizoitos Recuperados % De Celulas de Raton Eliminadas
T: 12,400,000 C-R: 98	T: 5,100,000 C-R: 5	T: 41.12 C-R: 94.89
T: 16,250,000 C-R: 30	T: 5,900,000 C-R: 5	T: 36.30 C-R: 83.3
T: 15,800,000 C-R: 53	T: 7,300,000 C-R: 12	T: 46.20 C-R: 77.35
T: 13,650,000 C-R: 26	T: 8,050,000 C-R: 13	T: 58.97 C-R: 50
T: 14,250,000 C-R: 46	T: 5,150,000 C-R: 7	T: 36.14 C-R: 84.78
T: 14,325,000 C-R: 64	T: 5,500,000 C-R: 5	T: 38.39 C-R: 92.18
T: 14,725,000 C-R: 39	T: 7,650,000 C-R: 12	T: 52.12 C-R: 69.23
T: 17,850,000 C-R: 70	T: 8,764,000 C-R: 10	T: 49.09 C-R: 85.71
T: 10,950,000 C-R: 45	T: 5,100,000 C-R: 7	T: 46.57 C-R: 84.44
T: 19,375,000 C-R: 37	T: 8,690,000 C-R: 6	T: 44.85 C-R: 83.78

**RENDIMIENTO DE LA PURIFICACION DE  
T. gondii CON EL METODO DE  
CENTRIFUGACION**



 % DE TAQUIZOITOS RECUP.  % DE CEL. DE RATON ELIMIN.

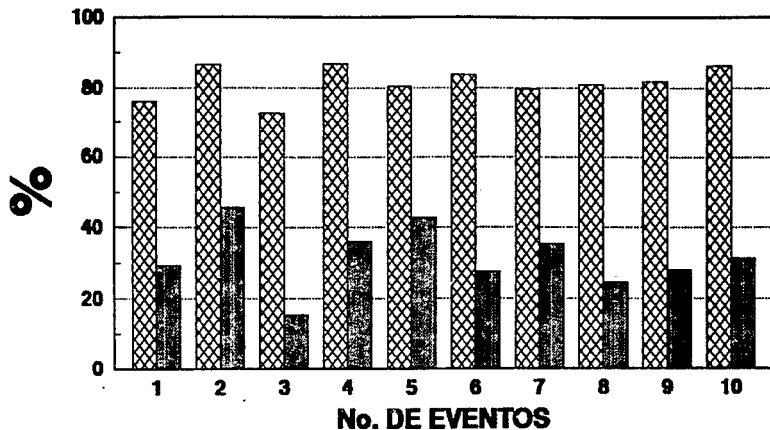
**CUADRO No. 3: Rendimiento de la Purificación de Toxoplasma gondii con el Método de Filtración con Membrana de  $3.0 \mu\text{m}$  de Porosidad.**

T = Taquizoitos

C-R = Celulas de Raton

No. de Celulas Paritónicas Exudado Peritoneal	No. de Celulas Respuestas de la Purificación	% De Taquizoitos Recuperados % De Celulas de Raton Eliminadas
T: 11,500,000 C-R: 85	T: 8,750,000 C-R: 60	T: 76 C-R: 29.4
T: 3,700,000 C-R: 72	T: 3,200,000 C-R: 39	T: 86.48 C-R: 45.83
T: 10,050,000 C-R: 52	T: 7,300,000 C-R: 44	T: 72.63 C-R: 15.38
T: 17,900,000 C-R: 86	T: 15,500,000 C-R: 55	T: 86.59 C-R: 36
T: 14,050,000 C-R: 50	T: 11,300,000 C-R: 21	T: 80.42 C-R: 42.78
T: 13,450,000 C-R: 80	T: 11,243,000 C-R: 58	T: 83.59 C-R: 27.3
T: 15,650,000 C-R: 65	T: 12,465,000 C-R: 42	T: 79.65 C-R: 35.38
T: 9,800,000 C-R: 45	T: 7,934,000 C-R: 34	T: 80.95 C-R: 24.44
T: 12,555,000 C-R: 82	T: 10,275,000 C-R: 59	T: 81.83 C-R: 28.84
T: 10,275,000 C-R: 51	T: 15,750,000 C-R: 35	T: 86.19 C-R: 31.37

**RENDIMIENTO DE LA PURIFICACION DE  
T. gondii CON EL METODO DE  
FILTRACION CON MEMBRANA**



 % DE TAQUIZOITOS RECUP.  % DE CEL. DE RATON ELIMIN.

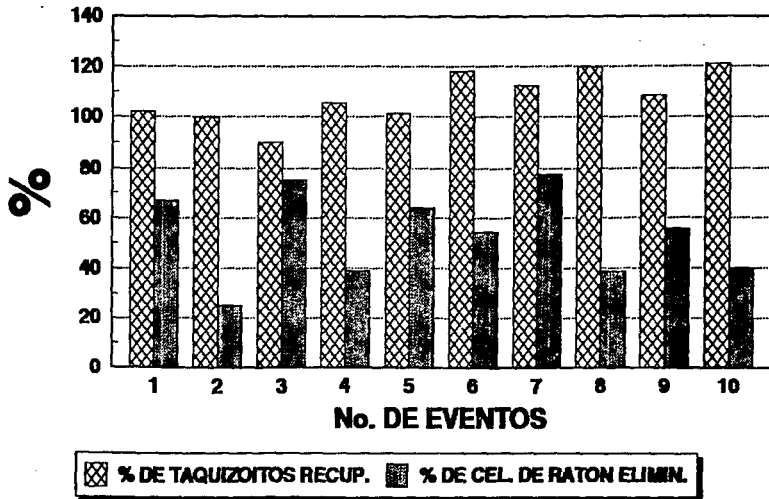
**CUADRO No. 6: Rendimiento de la Purificación de Toxoplasma gondii con el Metodo de Filtración con Aguja de Insulina.**

T = Taquizoitos

C-R = Celulas de Raton

No. de Celulas en Exudado Peritoneal	No. de Celulas despues de la Purificación	% De Taquizoitos Recuperados % De Celulas de Raton Eliminadas
T: 18,400,000 C-R: 12	T: 18,750,000 C-R: 4	T: 101.90 C-R: 66.66
T: 17,350,000 C-R: 16	T: 17,300,000 C-R: 12	T: 99.70 C-R: 25.00
T: 15,250,000 C-R: 16	T: 13,700,000 C-R: 4	T: 89.83 C-R: 75.00
T: 15,350,000 C-R: 34	T: 16,200,000 C-R: 33	T: 105.53 C-R: 38.88
T: 10,600,000 C-R: 33	T: 10,750,000 C-R: 12	T: 101.41 C-R: 63.63
T: 10,800,000 C-R: 22	T: 12,750,000 C-R: 1058	T: 118.05 C-R: 54.54
T: 2,750,000 C-R: 9	T: 3,100,000 C-R: 2	T: 112.72 C-R: 77.77
T: 9,850,000 C-R: 13	T: 9,650,000 C-R: 8	T: 119.87 C-R: 38.46
T: 14,850,000 C-R: 27	T: 16,150,000 C-R: 12	T: 108.75 C-R: 55.55
T: 5,700,000 C-R: 40	T: 6,900,000 C-R: 24	T: 121.05 C-R: 40.00

**RENDIMIENTO DE LA PURIFICACION DE  
T. gondii CON EL METODO DE  
FILTRACION CON AGUJAS**



En el cuadro y gráfica 7 se tienen los promedios del número de Taquizoitos y células del ratón antes y después de cada método de Aislamiento empleado y el promedio de porcentajes de recuperación y eliminación celular alcanzado

Con respecto a los ratones inmunizados con toxoplasmas fijados. Se puede observar en los cuadros del 8 al 13 los primeros 6 lotes y la cantidad de Suero Anti-toxoplasma obtenida de cada uno de ellos así como el número de taquizoitos inóculados en el reto, y las gráficas del 8 al 13 describen la sobrevivencia/día en cada experimento.

En el cuadro 14 tenemos representados 5 lotes de 10 ratones cada uno, con 3 inmunizaciones / ratón con toxoplasmas fijados, el 5to. lote representa los ratones testigos. El reto se llevó a cabo con 2,485,000 toxoplasmas / ratón. La gráfica No. 14 nos muestra la sobrevivencia de ratones / día .

En el cuadro 15, representa 3 lotes de ratones inocularados con Toxoplasmas concentrados y fijados. Cada lote y sus respectivos testigos fueron retados con 1,490 taquizoitos vivos y la gráfica 15 muestra la sobrevivencia de ratones / día.

## 15.0.- D I S C U S I O N

Como se observa en los cuadros 1, 2 y 3 y las gráficas 1 y 2, el rendimiento del cultivo de Toxoplasma gondii en ratón, es casi 3 veces mayor que el obtenido en el cultivo de tejido. En ratón se alcanzó una media de cultivo de 12,596,660 taquizoitos / ml., lo



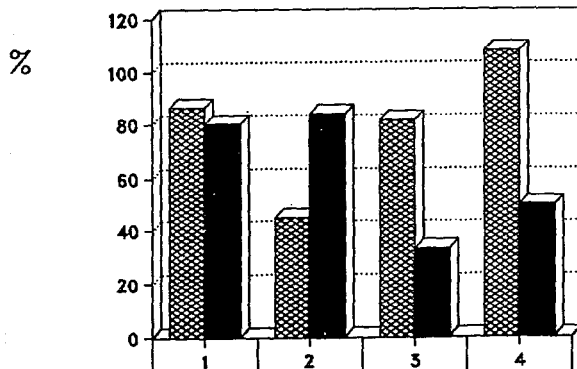
**CUADRO No. 7: Promedio del Rendimiento de los Diferentes Metodos de Purificacion Parcial de Toxoplasma gondii**



T = Taquizoitos

C-R = Celulas de Raton

Metodo de Purificacion	Promedio del No. de Celulas en Exudado Peritoneal	Promedio del No. de Celulas despues de la Purificacion	Promedio del * De Taquizoitos Recuperados * De Celulas de Raton Eliminadas
INCUBACION ADHESIVA	T: 12,596,000 C-R: 40	T: 10,846,000 C-R: 8	T: 86.65 C-R: 80.15
CONTAMINACION	T: 14,960,000 C-R: 50	T: 6,720,400 C-R: 8	T: 44.92 C-R: 84.03
FILTRACION MIXTA CON CEN	T: 12,693,000 C-R: 66	T: 10,372,000 C-R: 44	T: 81.71 C-R: 33.03
FILTRACION SUJA CON CEN	T: 11,910,000 C-R: 24	T: 12,525,000 C-R: 12	T: 107.88 C-R: 50.00

## PROMEDIO DEL RENDIMIENTO DE LOS DIFERENTES METODOS DE PURIFICACION DE T. gondii



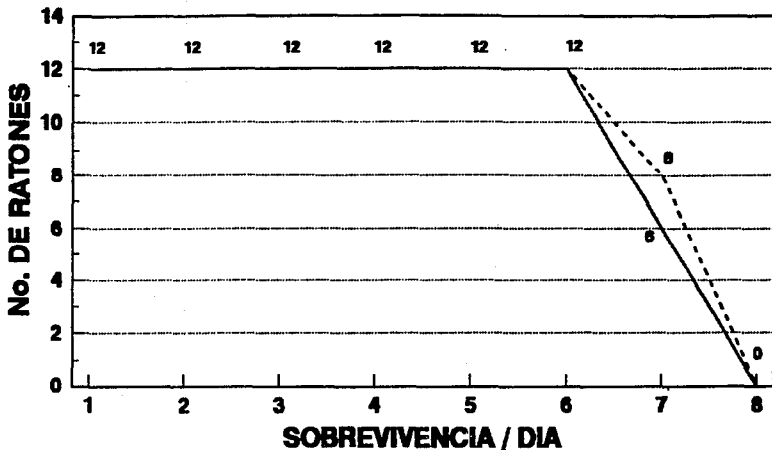
% TAQUIZOITOS RECUP		86.65	44.92	81.71	107.88
% CEL. RATON ELIMIN		80.15	84.03	33.03	50
		INCUBACION ADHERENCIA	CENTRIF. DIFEREN.	FILTRA. MEMBRANA	FILTRA. AGUJA

**GRAFICA No. 7**

**CUADRO No. 8 : Resultados del Reto con Toxoplasma gondii Neutralizados con Suero Anti-Toxoplasma de Raton.**

CANTIDAD DE SUERO (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA	
				7mo.	8vo.
0.6	0.3	12	14,950	6	6
CANTIDAD DE Na CL (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA	
				7mo.	8vo.
0.6	0.3	12	14,950	4	8

**RETO CON T. gondii NEUTRALIZADOS  
CON SUECO ANTI - TOXOPLASMA**

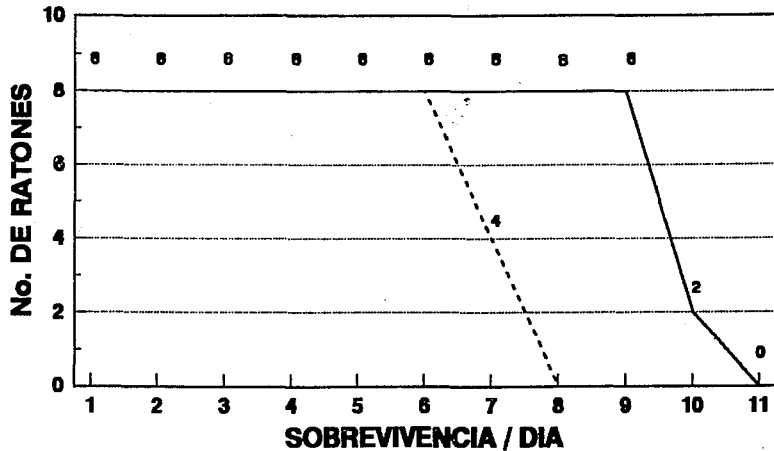


**RATONES RETADOS**    **RATONES TESTIGOS**

**CUADRO No. 9 : Resultados del Reto con Toxoplasma gondii Neutralizados con Suero Anti-Toxoplasma de Raton.**

CANTIDAD DE SUERO (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA		
				7mo.	10mo.	11vo.
0.4	0.2	8	1,300	--	6	2
CANTIDAD DE Na CL (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA		
				7mo.	10mo.	11vo.
0.4	0.4	8	1,300	4	4	

**RETO CON T. gondii NEUTRALIZADOS  
CON SUEO ANTI - TOXOPLASMA**



**RATONES RETADOS    RATONES TESTIGOS**

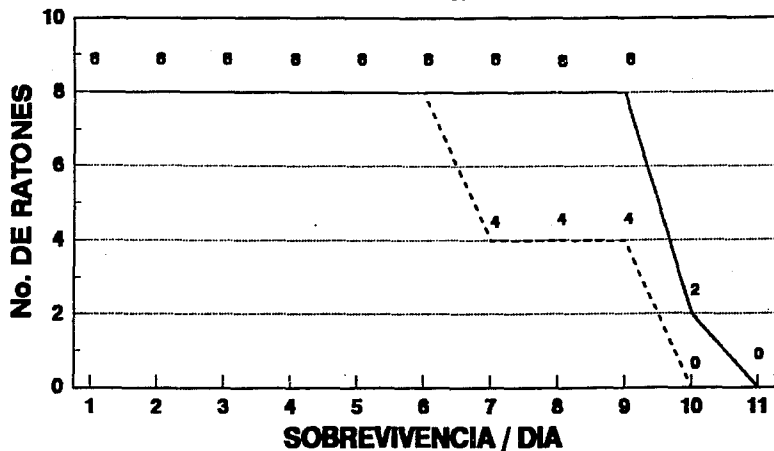
**CUADRO No. 18: Resultados del Reto con Toxoplasma gondii Neutralizados con Suero Anti-Toxoplasma de Raton.**

CANTIDAD DE SUERO (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA		
				7mo.	10mo.	11vo.
0.3	0.15	8	1,450	--	6	2

CANTIDAD DE Na CL (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA		
				7mo.	10mo.	11vo.
0.3	0.15	8	1,450	4	4	

**RETO CON *T. gondii* NEUTRALIZADOS  
CON SUEO ANTI - TOXOPLASMA**



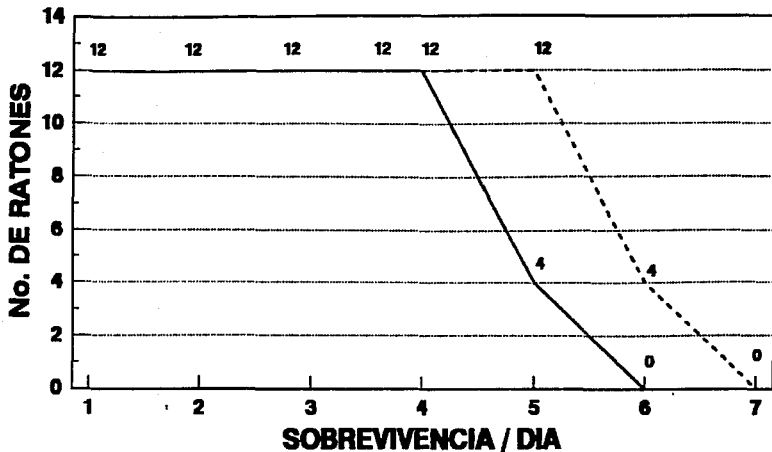
**RATONES RETADOS    RATONES TESTIGOS**



**CUADRO No. 11 : Resultados del Reto con Toxoplasma gondii Neutralizados con Suero Anti-Toxoplasma de Raton.**

CANTIDAD DE SUERO (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA		
				5to.	6to.	
1.0	0.5	12	1,608	8	4	
CANTIDAD DE Na CL (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA		
				5to.	6to.	7to.
1.0	0.5	12	1,608	--	8	4

**RETO CON T. gondii NEUTRALIZADOS  
CON SUEO ANTI - TOXOPLASMA**

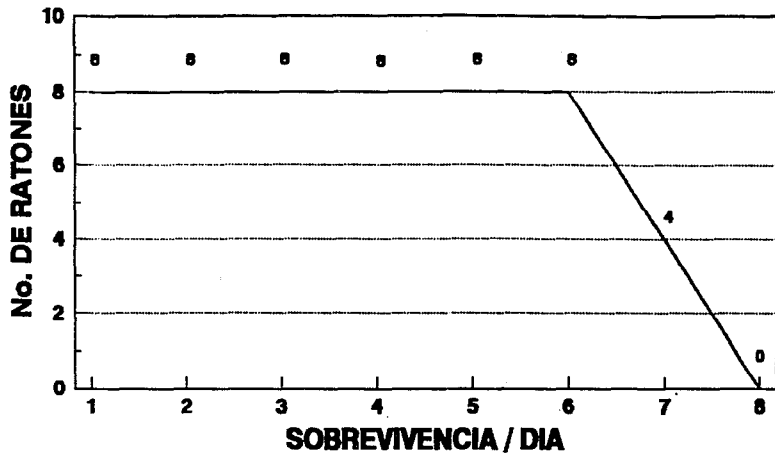


**RATONES RETADOS**    **RATONES TESTIGOS**

**Cuadro No. 12 : Resultados del Reto con Toxoplasma gondii Neutralizados con Suero Anti-Toxoplasma de Raton.**

CANTIDAD DE SUERO (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA	
				7mo.	8vo.
0.3	0.15	8	1,661	4	4
CANTIDAD DE Na CL (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA	
				7mo.	8vo.
0.3	0.15	8	1,661	4	4

**RETO CON *T. gondii* NEUTRALIZADOS  
CON SUEO ANTI - TOXOPLASMA**

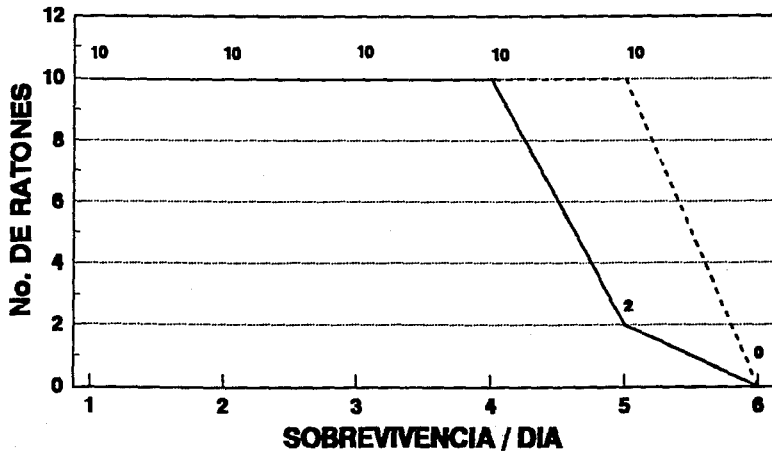


**RATONES RETADOS    RATONES TESTIGOS**

**CUADRO No. 13 : Resultados del Reto con Toxoplasma gondii Neutralizados con Suero Anti-Toxoplasma de Raton.**

CANTIDAD DE SUERO (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA	
				5to.	6to.
1.0	0.5	10	1,544	8	2
CANTIDAD DE NaCl (ml.)	CANTIDAD DE EXUDADO PERITONEAL (ml.)	No. DE RATONES TESTIGOS RETADOS	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS / RATON.	MORTALIDAD POR DIA	
				5to.	6to.
1.0	0.5	10	1,544	--	10

**RETO CON T. gondii NEUTRALIZADOS  
CON SUEO ANTI - TOXOPLASMA**

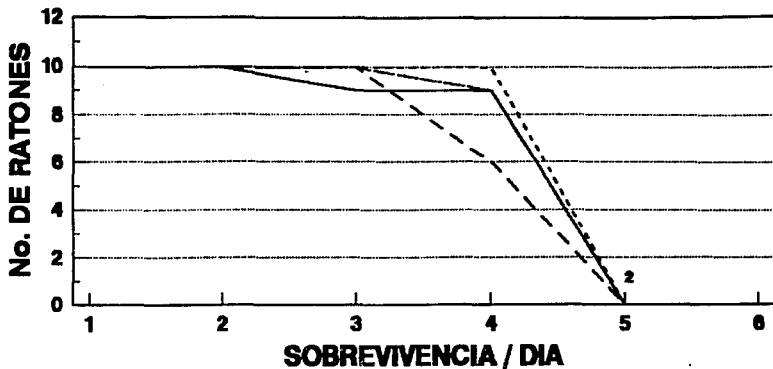


**RATONES RETADOS    RATONES TESTIGOS**

CUADRO No. 14 : Resultado del Reto a Ratones Inmunizados con un No. específico de T. gondii Fijados.

No. DE RATONES / LOTE	No. DE RATONES RETADOS	X DE TAQUIZOITOS FIJADOS E INOCULADOS / RATON	No. DE TAQUIZOITOS VIVOS INOCULADOS / RATON	MORTALIDAD POR DIA		
				3ro.	4to.	5to
12	10	585,833	2,485,000	1	--	9
12	10	1,524,00	2,485,000	--	--	10
12	10	2,695,000	2,485,000	--	1	9
12	10	4,974,000	2,485,000	--	4	6
TESTIGO	10	0.1 ml. de Na Cl al 0.85 %	2,485,000	--	1	9

**RETO A RATONES INMUNIZADOS  
CON No. ESPECIFICO DE  
TOXOPLASMAS**



**RATONES C/585833**    **RATONES C/1524000**    **RATONES C/2695000**

**RATONES C/4974000**    **RATONES TESTIGOS**

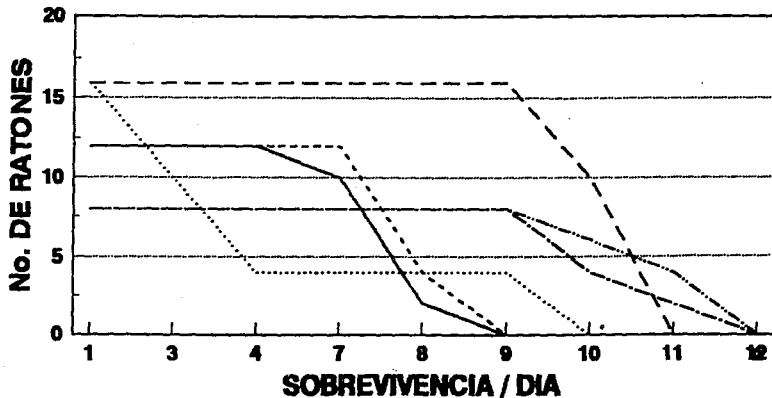
**GRAFICA No. 14**



**CUADRO No. 15 : Resultado del Reto a Ratones  
Inmunizados con T. gondii  
Concentrado y Fijados.**

No. DE RATONES / LOTE	No. DE RATONES RETADOS	No. DE TAQUIZOITOS VIVOS INOCULADOS/ RATON	MORTALIDAD POR DIA								
			3ro	4to	7mo	8vo	9no	10 mo	11 ro	12 do	
12	12	1,498	--	--	2	8	2				
TESTIGO	12	1,498	--	--	--	8	4				
16	16	1,498	6	6	--	--	--	4			
TESTIGO	16	1,498	--	--	--	--	--	6	18		
8	8	1,498	--	--	--	--	--	2	2	4	
TESTIGO	8	1,498	--	--	--	--	--	4	2	2	

**RETO CON T. gondii NEUTRALIZADOS  
CON SUEO ANTI - TOXOPLASMA**



**1. RATONES RETADOS**    **1. RATONES TESTIGOS**    **2. RATONES RETADOS**  
 \_\_\_\_\_                      - - - - -                      . . . . .  
**2. RATONES TESTIGOS**    **3. RATONES RETADOS**    **3. RATONES TESTIGOS**  
 - . - . -                      - - - - -                      - - - - -

GRAFICA No. 15

que representa 1,378 % de ganancia. Y en el cultivo de tejidos el promedio de cultivo fué de 5,040,000 de taquizoitos / ml., lo que representa un porcentaje de ganancia de 498.52 %.

Estos resultados hacen pensar que la mejor opción es continuar con el cultivo del parásito en ratón, pero hay que considerar los siguientes factores antes de concluir esto :

Primero: la cantidad de ml. de exudado peritoneal cosechado de 10 ratones es de 35 ml. y de medio 199 cosechado de 10 botellas de cultivo es de 70 ml., por lo que se tiene a los parásitos más concentrados en el exudado peritoneal. Esto representa una de las razones de que el cultivo en ratón se obtenga una mayor biomasa

Segundo: Lo más importante es tener un método fácil y práctico para el cultivo del microorganismo y esto se logra con las células "Vero", ya que presenta una serie de ventajas sobre el cultivo en ratón como son :

- a). Las cajas de cultivo no requieren de cuidados durante los días de cultivo, como en el caso de los ratones, ya que estos necesitan de comida, agua, jaulas, un lugar limpio, etc.
- b). Se evita la contaminación bacteriana que suele ocurrir al cosechar los toxoplasmas en ratón .
- c). El tiempo que se ocupa en la "cosecha" en células "Vero" es muy pequeño en comparación con el requerido en el ratón, si consideramos que se necesita de una buena cantidad de microorganismos para llegar a obtener suficiente antígeno que nos permita realizar diversas pruebas de laboratorio, es importante que la cosecha se realice en el menor tiempo posible y con cada

ratón se tarda en promedio de 5 a 10 min. por cosecha y si pensamos en un trabajo con 100 ratones se tendrá un tiempo empleado de 500 min. ( 8.3 hrs. ) ó 1,000 min. ( 16.6 hrs ). Pero el tiempo de la cosecha de toxoplasmas en cultivo de tejido es en promedio de 2.0 min / botella y en 100 botellas se empleará un tiempo de 3.0 hrs. considerando que esto se realiza en áreas estériles con mecheros y empleando equipo de seguridad como guantes, cubre-bocas overoles, botas, etc., es conveniente emplear el menor tiempo posible en el "pase" y la "cosecha", lográndose la reducción con el cultivo de tejidos.

- d). Es más práctico trabajar el "pase" y la "cosecha" en botellas de cultivo que en ratón ya que con ellos hay problemas inherentes a su manipulación como es, la probabilidad de una mordida, la ruptura del peritoneo que ocasiona eliminar el ratón sin haberle extraído los toxoplasmas y todo lo descrito en los puntos anteriores .

Pero la gran desventaja de este método de cultivo es :  
Cómo eliminar los restos de las células "Vero" lisadas , ya que las presenta en gran cantidad .

Con respecto a los métodos de eliminación de células de ratón, como se mencionó es importante quitar estas células de la "cosecha", ya que así se evitan reacciones cruzadas o inespecíficas, que dan resultados falsos o difíciles de interpretar.

Con el método de Adherencia-Incubación, representado en el cuadro 1 y gráfica 3 hay tres datos de taquizoitos recuperados que están arriba del 100 % ( 108, 159 y 125 % ), esto se puede

explicar, porque Toxoplasma gondii es un parásito intracelular y en el exudado, las células de ratón que se encontraban parasitadas durante el tiempo de incubación sufren lisis, liberando sus parásitos e incrementando el número inicial que de ellos se tenía.

En el cuadro y gráfica 4 se aprecian los resultados de la purificación con el método de centrifugación donde el porcentaje de recuperación de taquizoitos solo fué del 36 a 49 % , salvo el cuarto y séptimo evento que son de 58.97 y 52.12 % respectivamente , y el porcentaje de eliminación de células de ratón esta arriba del 50 % en todos los eventos.

En el cuadro y gráfica 5 se encuentran los resultados del método de filtración con membrana , en el que se consiguió un porcentaje aceptable de recuperación, pero su eliminación celular fué menor del 50 % e incluso en el tercer evento solo es del 15.38 % , además en muchas ocasiones se llegó a saturar la membrana lo que no permitio terminar el método, lo que indica que se requiere de un previo proceso de clarificación.

En el método de filtración con aguja que se presenta en el cuadro y gráfica 6, sobresale el hecho que solo dos eventos estan cerca del 100 % de recuperación, ya que los demás estan por arriba del 100 % , esto se debe a que, este método rompe las células de ratón liberando los taquizoitos, lo que incrementa su número inicial y con respecto a la eliminación celular esta es muy fructuante, y aqui se presentan algunos problemas como son el que se llegan a obstruir las agujas, por lo que, hay que contar con varias para concluir el método, el embolo de la jeringa suele llegar a tener mucha fricción con la jeringa dificultando la filtración, lo que

hacer al método ser poco práctico.

En el cuadro y gráfica 7 se tienen los promedios del número de taquizoitos y células del ratón antes y después de cada método de purificación empleado, y el promedio de porcentajes de recuperación y eliminación celular alcanzados, así tenemos que al hacer un análisis de los resultados, se tiene para el método de Incubación-adherencia un porcentaje de taquizoitos recuperados muy similar a la eliminación de las células de ratón siendo del 86.65 y 80.15 % respectivamente. Con la centrifugación su recuperación fue del 44.92 % y una eliminación del 84.03. % .Para la filtración con membrana se logró una recuperación del 81.71 % pero una eliminación del 33.03 % . Finalmente los porcentajes con el método de filtración con agujas de insulina, en su recuperación fue muy buena ya que supero el 100 % , alcanzando 107.88 % pero su eliminación solo alcanzo un 50 % .

Lo esperado en la purificación parcial eran porcentajes de recuperación de taquizoitos y eliminación de células de ratón muy similares y además muy cercanos o incluso del 100 % , si algún método presentara estos resultados, se marcaría como el mejor, con los resultados alcanzados se observa que donde se registran los mejores promedios fue con el método de Incubación-Adherencia .

En los cuadros y graficas 8 a 13, observamos los resultados de la inmunización y reto a 6 lotes de ratones trabajados para detectar la respuesta inmune. y se representa la sobrevivencia / día para cada lote respectivo. Se observa que la diferencia de resultados entre los ratones experimentales y los testigos fue mínima

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

y por lo tanto no significativa.

Los 5 lotes indicados en el cuadro y gráfica 14 tuvieron inicialmente 12 ratones, pero a la semana de la primera inmunización se sacrificaron 2 ratones de cada lote para revisar presencia de toxoplasmas en su exudado peritoneal. La observación al microscopio no detectó parásitos y sí una gran cantidad de Leucocitos principalmente Macrófagos, en todos los ratones sacrificados ( 10 en total ), lo que indica una respuesta inmune celular contra T. condi. En estos 5 lotes tampoco se presentó una diferencia significativa de los resultados lo que indica que no existió una respuesta inmune favorable.

Los 3 lotes presentados en el cuadro y gráfica 15 que fueron inmunizados con toxoplasmas concentrados y fijados tampoco existió una diferencia marcada en los resultados, indicando con ello que tampoco existió una respuesta inmune favorable.

Con los resultados poco favorables del primer lote tratado en el reto (cuadro 8), se decidió retar los sucesivos lotes solo con un 10 % de taquizoitos que inicialmente se ocupó. Los lotes representados en el cuadro 14 se trabajaron con números específicos de toxoplasmas, pero tampoco se observó diferencia alguna con respecto a todos los demás lotes.

## 16.0.- CONCLUSION

### 16.1.- C U L T I V O

En los resultados alcanzados con las dos formas de cultivo se concluye :

- 1). Para obtener una biomasa elevada de Toxoplasma gondii se deberá efectuar el cultivo en ratón.
- 2). El cultivo de Toxoplasma gondii en células " Vero " es el método más práctico, pero se debe complementar con un método eficaz de purificación .

### 16.2.- P U R I F I C A C I O N

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo concluyen que el método de purificación parcial más eficiente es el de Incubación - Adherencia, pero que se podrá mejorar si se combina con el de Filtración con Agujas de Insulina. Si primero se realiza este último para liberar los taquizoitos de los leucocitos y después llevar a cabo la Incubación - Adherencia .

### 16.3.- I N M U N I Z A C I O N

De Los resultados del reto se concluye que no existe una respuesta inmune contra Toxoplasma gondii , pero esto es presuntivo, ya que se requiere probar con otros esquemas de inmunización y tipos de Antígenos para tener datos más concluyentes, al respecto .



17.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1). Ambroise - Thomas, P. et al ( 1971 ). Toxoplasmosis. In: Didier Hentsch, M. D. (Ed.). Our experience of immunofluorescence in the serological diagnosis of toxoplasmosis comparative evaluation with Sabin-Feldman test in more than 7,500 human sera in toxoplasmosis. Suiza : 61-66.
- 2). Bamatter, F.( 1971 ).Toxoplasmosis. In: Didier Hentsch, M. D. (Ed.).The differential diagnosis of connatal toxoplasmosis. Suiza. : 97 - 109.
- 3). Biagi, F. ( 1951 ) Cutirreacciones con toxoplasmina en Tampico Rev. Med. Hosp. Inf. Mex. 14 : 191.
- 4). Biagi, F. ( 1976 ). Datos actuales sobre biología y epidemiología de la toxoplasmosis. Gac. Med. Mex. 3 : 2 .
- 5). Bonfante-Garrido, R., et al ( 1984 ) Toxoplasmosis en pacientes de unos estados de Venezuela . Biol. of Panam . 26 ( 6 ) : 501-509.
- 6). Calli, K. F., Falleiros, G. L. H. ( 1981 ) Toxoplasmosis. Infectologia . (2). : 119-133 .
- 7). Camargo, M. E. ( 1973 ). Introducao as tecnicas de inmunofluorescencia. Revi. Inst. Med. Trop. Sao Paulo
- 8). Carrada, B. T. ( 1983 ). La toxoplasmosis problema de salud publica, avances y perspectivas Biol. Med. Hosp. Mex. 40 (7).
- 9). Cheng, T. C. ( 1978 ) Parasitologia General. A.C. Madrid: 269.
- 10). Diaz, O. J. Vaca, M. M. ( 1985 ). Evolución y epidemiología de la toxoplasmosis. Infectologia. ( 6 ). :146 - 152 .
- 11). García, R. J. Alvarez, Ch. R. ( 1983 ). Diagnóstico de la

- toxoplasmosis por medio del laboratorio. Infectologia. ( 12 ) : 605 - 608 .
- 12). Grimwood, G. B. ( 1971 ). Viral contamination of a subline of Toxoplasma gondii R. H. Infect. Immun 50 (3) : 917 - 918.
  - 13). Jones, C. T. ( 1985 ). H-2 Complex-Linked resistance in murine toxoplasmosis. J. of Infect. Diseases. 151 (4) : 739 - 740 .
  - 14). Kumate, J. ( 1989 ). Manual de Infectologia : Toxoplasmosis, Francisco Mendez Cervantes (Editor M. C.) México. : 417 - 428.
  - 15). Levine, N. D., et. al. ( 1980 ). A newly revised clasification of the Protozoa . J. Protozool 27 (1) : 37-58 .
  - 16). Lycke, E., K. Carlberg R. ( 1975 ). Interaction between Toxoplasma gondii and its host cell : Funtion of the Penetration Enhancing Factor of toxoplasma . Infect. Immun. 11 (4) : 853 .
  - 17). Lycke E., E. Lund. ( 1964 ). A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of Toxoplasma gondii. Act. Path. Microbial. Scand. 60 : 209-233
  - 18). LLOYD, H. K., Kathleen, M. C., MARK, S. B. ( 1985 ). An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen ( P - 30 ) of Toxoplasma gondii. The J. Immun. 134 ( 5 ) . 23-34
  - 19). Meylan, J. ( 1971 ). Toxoplasmosis. In: Didier Hentsch , M. D. (Ed.). Toxoplasmosis as a cause of repeated abortion. Suiza. 151 - 157 .
  - 20). Michel, R., K. Schupp., et. al. ( 1980 ). Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by Toxoplasma gondii. " in vitro ". Inter. J. for Parasit. (10) : 309 - 313.

- 21). O'Brien, W. A. ( 1988 ). Un enfoque del SIDA en el servicio de urgencias. Infectologia Practica 1 (2). : 13 - 16 .
- 22). Palomino, D. F. et al ( 1950 ). Un caso de toxoplasmosis. Biol. Med. Hosp. Inf. Mex 7 (1). : 24 - 39 .
- 23). Piekarski, G. ( 1971 ). Toxoplasmosis. In: Didier Hentsch , M. D. (Ed.).Epidemiological and biological characteristics of the causative agent of toxoplasmosis. Suiza. : 11 - 20 .
- 24). Remington, J. S., Desmonts, G. ( 1976 ) Infectious disease of the fetus and newborn infant. Philadelphia W. B. Saunders : 200, 225, 275 - 300 .
- 25). Ricci, A., houbert, P. J. ( 1971 ). Toxoplasmosis. In: Didier Hentsch M. D. (Ed.). Congenital ocular toxoplasmosis. Suiza. : 111 - 117.
- 26). Roch, E. ( 1971 ). Compendio de Toxoplasmosis . Edit. Patria México. 282 pp .
- 27). Schmidt, D. G., Larry S. R. ( 1984 ) Fundamentos de Parasitología. G.E.G.S.A. México. : 143 - 151 .
- 28). Sheffield, H. G., Melton, M. L. ( 1970 ). Toxoplasma gondii : The oocyst, sporozoite and infection of culture cell, Science : 892 -893 .
- 29). Siqueira, M. et. al. ( 1985 ). Effect of genetic modification of antibody responsiveness on resistance to Toxoplasma gondii infection. Infection and Immunity 48 (2). : 298 - 302 .
- 30). Skromne, K. G., et. al. ( 1980 ). Diagnostico y tratamiento de la toxoplasmosis utilizando radionuclidos . Bol. Med. Hosp. Infant. (3) . : 409 - 412.

- 31). Sotiros, D. Ch. et. al. (Octubre 7 1965 ). A laboratory procedure for determining the potency of toxoplasmins for skin testing ( 30873 ) P. S. E. B. M. 121 : 734 - 739 .
- 32). Tay, Z. J., Lara, A. R. et. al. (1982 ). Parasitologia Medica Francisco Mendez Cervantes ( Edit M. G. ) : 167 - 190 .
- 33). Tolentino, P. ( 1971 ). Toxoplasmosis. In: Didier Hentsch M. D. (Ed.). Acquired toxoplasmosis of the nervous system. Suiza : 187 - 195 .
- 34). Varela G., Roch. E. Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en México resultados obtenidos en 29,883 reacciones de Sabin - Feldman efectuados de 1953 a 1966. Rev. Inst. Salud Publica. 26 (Enero - Marzo).
- 35). Varela, G., Roch. E., Zavala, J. ( 1961 ). Estudios sobre toxoplasmosis en México, 1961. Rev. Inst. Salud. y Enfer. Trop. 3 (3). 451-453.
- 36). Yehudith, N., Jack, S. R. ( 1980 ). An enzyme - linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii : Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis The Journal of Infectious Diseases . 142 (5) : 757 - 766 .