

108
201.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO SERO-EPIDEMIOLOGICO DE
TOXOPLASMOSIS EN UNA POBLACION VOLUNTARIA
DEL SEXO FEMENINO, A NIVEL UNIVERSITARIO, POR
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA Y DOT-ELISA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA DE LA PAZ LOPEZ CERON



MEXICO, D. F.,

1983

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

I.- INTRODUCCION	
A. Antecedentes	1
B. Planteamiento del Problema	5
C. Objetivos	6
D. Poblaciones de Estudio	7
E. Hipótesis de Trabajo	8
II.- Características del Agente	
A. Clasificación	9
B. Morfología	9
C. Ciclo Biológico Zoonótico	13
D. Ciclo Biológico Antropozoonótico	15
E. Mecanismos de Transmisión	17
III.- Formas clínicas de la Toxoplasmosis	
A. Toxoplasmosis Adquirida	20
B. Toxoplasmosis Congénita	21
C. Respuesta Inmune en la Toxoplasmosis	22
IV.- Métodos	
A. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta I.F.I. para la detección de Anticuerpos contra <u>Toxoplasma gondii</u> .	
1. Fundamento	27
2. Desarrollo de la Prueba	27
3. Interpretación de Resultados	30

V.- Material	
A. Material Biológico	31
B. Reactivos	31
C. Material	32
D. Equipo	32
E. Soluciones	33
VI.- Microtécnica de Inmunounión en Mancha (DOT-ELISA) para la Detección de Anticuerpos contr <u>Toxoplasma gondii</u>	
A. Fundamento	34
B. Desarrollo de la Prueba	34
C. Interpretación de Resultados	37
VII.- Material	
A. Material Biológico	38
B. Reactivos	38
C. Material	39
D. Equipo	40
E. Soluciones	40
VIII.- Resultados	41
XI.- Discusión	54
X.- Conclusiones	56
XI.- APENDICES	
A. Apendice N.1	
Preparación de reactivos	
1. Amortiguador de Fosfatos (PBS)	
1.1 Solución Madre	58

1.2 Amortiguador de Fosfatos Salino	
(PBS) pH 7.2	58
1.3 Diluyente del Conjugado	58
1.4 Solución de Evans 1:1000 (Colorante de Contraste)	59
1.5 Líquido de Montaje (pH 8.5)	59
Apendice N. 2	
A.1 Preparación de Laminillas de Antígeno	60
Apendice N. 3	
A.1 Preparación del Conjugado	61
A.2 Dilución Óptima del Conjugado	61
Apendice N. 4	
A.1 Preparación de Reactivos Para la Microtécnica	
(DOT-ELISA).	
1. Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS)	
pH 7.2 y pH 7.6	63
A.2 Solución de PBS-TWEEN 20 al 0.05 %	63
A.3 Leche Sveltes al 5 % y 3 %	63
A.4 Solución Stock	64
A.5 Solución de PBS-FORMOL al 2 %	64
APENDICE N. 5	
A.1 Preparación del Antígeno	65
A.2 Preparación del Conjugado	66
A.3 Dilución Óptima del Conjugado	66
APENDICE N. 6	
Análisis Estadístico	68
XI.- BIBLIOGRAFIA	75

I.- INTRODUCCION

A. ANTECEDENTES

La toxoplasmosis es una protozoosis causada por Toxoplasma gondii, parásito intracelular obligado, capaz de infectar a diversas especies animales, permaneciendo en ellos por largo tiempo, inclusive toda la vida; cuyo huésped definitivo es el gato casero y algunos animales de la familia Felidae, el hombre representa un accidente en la cadena de transmisión. (Frenkel, J. K.: Dubey, J.P. y Miller., 1970).

La infección humana es muy común, como lo indica la elevada prevalencia de anticuerpos específicos detectados en encuestas seroepidemiológicas en el mundo, pero sólo algunos individuos desarrollan enfermedad sintomática al infectarse con una cepa virulenta y/o con una dosis suficiente de parásitos, por lo que es raro encontrar la enfermedad.

La acción patógena del Toxoplasma gondii se debe a sus exigencias metabólicas y a la acción mecánica de distensión (Thalhammer, O., 1967), aunado a su pantropismo, este protozoario, puede localizarse después de haber alcanzado la circulación, en cualquier tejido del huésped, causando daños irreversibles, (Mohr W., 1962).

El principal problema médico de esta protozoosis, es el riesgo perinatal, se estima que existen de 20 a 40 % de posibilidades de transmisión al producto, ya que un 3 % de los embarazos pueden terminar en aborto, un 3.5 % en muerte neonatal, 15 % en toxoplasmosis grave, 20 % en toxoplasmosis discreta y el resto habitualmente evoluciona en forma asintomática

Desmonts y Couvreur, citados por Thalhammer estudiando la evolución ulterior de toxoplasmosis prenatales diagnosticadas en la lactancia y el embarazo comprobaron en 14 casos que focos coriorretinianos no existentes en el momento de la enfermedad aguda, aparecieron entre 19 y 24 años después del nacimiento. En 10 casos eran focos nuevos en ojos que ya tenían otros cicatrizales, en 4 casos no se había comprobado ninguna lesión previa.

Hogan (1959) citado por Francois, estudio 36 casos de toxoplasmosis prenatal. De ellos 8 tenían coriorretinitis congénita, en 9 aparecieron focos entre los 6 y 12 meses, y en 19 enfermos estos se evidenciaron en el segundo año de vida.

Tenemos actualmente numerosas pruebas de la patogenicidad de Toxoplasma gondii para el hombre, así como de su distribución universal.

La prevalencia de anticuerpos a esta parasitosis en adultos es aproximadamente de un 30 % (Feldman y Miler, 1956); las manifestaciones clínicas en el periodo latente están condicionadas por las lesiones que provoca T.gondii en los periodos agudo y subagudo, y por la reacción cicatrizal de los tejidos. Una vez alcanzado este periodo evolutivo de la enfermedad, poco se puede esperar de un tratamiento antitoxoplasmático específico, puesto que los toxoplasmas recluidos en los quistes, no son afectados por los anticuerpos ni por los medicamentos actualmente en uso. (Kaufman y cols., 1976).

El diagnóstico de toxoplasmosis es dificultado por lo polimorfo y poco característico de su cuadro clínico, por lo que se ha requerido la ayuda del laboratorio utilizando técnicas serológicas como la de Sabin-Feldman " Dye-Test " (Safin y Feldman, 1948); y la Hemaglutinación

Indirecta (IHA; Prueba de Jacobs y Lunde 1957). La Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta, propuesta inicialmente por Coons y Kaplan en 1950, fue probada para el diagnóstico de toxoplasmosis por Goldman en 1957; sin embargo este autor no estableció la sensibilidad y especificidad de la técnica, habrían de pasar 9 años para que en 1966 fuera instituida por Fletcher y Walton como una prueba óptima para el diagnóstico de esta enfermedad.

En la actualidad existen pruebas inmunoenzimáticas como tal es el caso del Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas, de la que en 1971 Perlman usó una combinación de antígenos o anticuerpos inmóviles sobre una fase sólida con un antígeno o anticuerpo conjugado a una enzima, obtuvo como resultado un análisis con alta sensibilidad y especificidad.

La prueba de ELISA se ha aplicado con éxito en el diagnóstico serológico de enfermedades parasitarias tales como equinocosis, leishmaniasis, fasciolosis, en enfermedad de Chagas, Toxoplasmosis, etc. Este procedimiento es simple en su realización, económico y fácilmente adaptable para uso rutinario.

En la mayoría de los estudios inmunoenzimáticos, se utilizan antígenos parasitarios crudos y solubles, adsorbidos en las paredes de las placas de microtitulación.

Cuya concentración verdadera de antígeno presente en cada pozo no se conoce y ciertos antígenos pueden unirse débilmente, o bien no unirse a la superficie del pozo; Hawkes y cols., (1982) describieron una modificación denominada inmunounión en mancha, en la cual pequeños anticuerpos monoclonales fueron aplicados directamente sobre

nitrocelulosa. Posteriormente la muestra ensayada (que presumiblemente contiene el antígeno) se incuba con la fase sólida, que luego se lava para añadir un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa que reacciona con un sitio antigénico diferente, (en esta etapa puede utilizar anticuerpo no marcado, seguido de un conjugado de globulina antiespecie marcada con enzima) y luego se lava. Se añade el sustrato enzimático. La degradación es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra analizada.

Este procedimiento posee ventajas sobre las pruebas como de ELISA estándar, debido a que es económica, utiliza cantidades reducidas de reactivos, no requiere de aparatos para su lectura, es directa, los antígenos permanecen estables durante largos periodos y por su facilidad de ejecución puede emplearse en encuestas serológicas . (Pappas, M.G., R. Hajkowski, 1988).

B.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La toxoplasmosis es quizá la antroponozoonosis, con mayor distribución mundial, y representa principalmente para los países en vías de desarrollo un problema importante en materia de salud.

En grupos jóvenes del sexo femenino donde la toxoplasmosis adquirida, suele ser en la mayoría de los casos una enfermedad asintomática o bien presentar una sintomatología inespecífica y por lo tanto confundirse con otras enfermedades infecciosas.

Y al no ser diagnosticada en la etapa aguda se hace inaparente tornándose a cronicidad; o quedando en forma latente durante años o por toda la vida manifestándose cuando existe inmunosupresión.

Además de lo anterior esta enfermedad es capaz de producir anomalías en el embarazo, como aborto y malformaciones congénitas.

Es por esto que se considero realizar un estudio presuncional sero-epidemiológico, a un grupo etario joven femenino, de tres instituciones universitarias, para evaluar la seroprevalencia a esta parasitosis.

Para esta evaluación se adicionó una técnica nueva denominada DOT-ELISA, como prueba alternativa de diagnóstico, para lo cual es necesario establecer un análisis de homogeneidad con una prueba de referencia, ya establecida como lo es la Inmunofluorescencia Indirecta.

C.- OBJETIVOS

1. Conocer la seroprevalencia de anticuerpos contra Toxoplasma gondii, de un grupo etario joven del sexo femenino, de areas urbanas y suburbanas.
2. Evaluar la técnica de DOT-ELISA, como una prueba alternativa, para el diagnóstico serológico de Toxoplasmosis, en base a un estudio comparativo con una técnica ya establecida, como es la de Inmunofluorescencia Indirecta.

D.- POBLACIONES DE ESTUDIO

Se considero realizar un estudio de seroprevalencia a la toxoplasmosis a tres poblaciones jóvenes, del sexo femenino, entre los 17 a los 31 años de edad, provenientes de centros universitarios oficiales situados en areas urbana y suburbana como: La Universidad Autónoma de México (Facultad de Química, La Escuela Nacional de Estudios Profesionales (Cuautitlan Izcalli), y la Universidad Autónoma de Chapingo.

E.- HIPOTESIS DE TRABAJO

La seroprevalencia de infección subclínica en grupo de jóvenes de edad reproductiva, presentarán un porcentaje de seropositividad menor, dado al paralelismo que existe entre edad y seroprevalencia.

Al utilizar técnicas inmunoenzimáticas como, prueba serodiagnóstica, para la toxoplasmosis, se pensará encontrar cierta correlación, dada a las características ecuanimes de la microtécnica DOT-ELISA, con la de referencia (I. F. I.) .

II.- CARACTERISTICAS DEL AGENTE

A. Clasificación

De acuerdo al Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos (1972), (121,143) Toxoplasma gondii pertenece a:

Phylum : Protozoa. Subphylum : Apicompleja. Clase : Sporozoa. —
Subclase : Coccidia. Orden : Eucoccidia. Suborden : Eimeriina. Genero:
Toxoplasma. Especie : Se reconoce una especie única, T. gondii y todas
las cepas estudiadas son antigénicamente similares.

B. MORFOLOGIA

Estudios realizados por Piekarski y Werner se definieron tres formas que son importantes desde el punto de vista patológico y epidemiológico : una forma trofozoítica o proliferativa, una quística o de resistencia y una forma oocística.

Cuando la forma trofozoítica, sale de la célula huésped, tiene forma curva o de media luna y mide entre 4 y 5 micras de longitud y se reproduce por una división binaria. En esta fase el parásito madre divide su núcleo en una primera etapa, después replica el conoide y las otras estructuras, y posteriormente por una especie de gemación interna, se individualizan los dos parásitos hijos. (endodiogonia). Cuando el parásito invade una célula toma la forma oval o redonda, que al microscopio óptico puede semejarse a los amastigotes de los tripanosomátidos, pero sin bieroplasto.

A la microscopía electrónica presenta una ultraestructura

compleja. La membrana envolvente del parásito se interrumpe por una abertura o micropilo. El polo anterior del citoplasma se observa un anillo polar y una formación cónica hueca, con la base dirigida hacia el interior del parásito llamado conoide, el cual parece continuarse por unas estructuras, cilíndricas alargadas llamadas roptrias que divergen en el centro del parásito. El conoide puede ser prominente y en este caso representar un organelo adecuado para perforar la membrana de la célula del hospedero. Además en el citoplasma se observan mitocondrias, Aparato de Golgi, Reticulo Endoplásmico, granulaciones osmófilas y fibras delgadas. Carece de organelos de locomoción y sus deslizamientos los realiza por flexión del cuerpo (73).

Cuando se tinte con el Método de Wright o de Giemsa, el citoplasma es azul y el núcleo es una estructura irregular de color rojo a púrpura, de ubicación central o paracentral cargado al polo más ancho. Los taquizoitos se presentan en grupos y se multiplican por endodíogenia en la fase aguda de la infección: formando pseudoquistes; que no tienen envoltura quística.

Los bradizoitos o quistes, característicos de la fase crónica de la toxoplasmosis, tiene forma oval, esférica o alargada, cuando se localizan en la fibra muscular. Miden de 10 a 60 micras de diámetro o más, dependiendo del número de parásitos que contenga. Están envueltos por una pared de doble membrana : una externa en contacto con el citoplasma de la célula hospedadora y la interna granulosa en contacto con los parásitos. Una vez formado el quiste los parásitos se reproducen lentamente. El número de parásitos dentro del quiste varia desde 50 a 3,000. (Work y Hutchinson, 1969).

Los coquistes aparecen en grandes cantidades en las heces fecales del hospedero definitivo, son de forma oval y miden 9 por 14 micras; cada coquiste cuando esporula presenta dos esporoquistes encerrados por una pared celular doble, cada uno de los cuales contiene cuatro esporozoitos. Los esporoquistes miden 6 por 8 micras. (Frenkel y cols., 1970).

Estas tres formas del parásito tienen capacidad infectante pero bajo condiciones diferentes. El quiste es a través de ingestión de carne cruda o mal cocida. El coquiste por la ingestión de cualquier alimento contaminado por la materia fecal del huésped definitivo. En cambio el trofozoito, debido a su labilidad a los cambios ambientales requiere condiciones especiales que faciliten su arribo a otro huésped. Actualmente se considera que la vía transplacentaria es la más frecuente para esta fase parasitaria, ampliamente demostrada en animales y aceptada en la infección intrauterina de la especie humana (39).

De acuerdo, a Werner y Janitschke se definen algunos estadios de reproducción asexual y sexual, característicos de T.gondii.

1) ESQUIZOGONIA

División repetida del núcleo que origina 4 o más núcleos dentro del organismo inicial antes de que se segmente el citoplasma; así al romperse, quedan cuatro o más organismos hijos.

2) GAMOGONIA

Denominada gametogonía por otros autores (73). El desarrollo sexuado

comienza con el crecimiento del macrogametocito, el cual evoluciona, inmediatamente después de redondearse, hacia la forma de macrogameto.

El microgametocito también aumenta de tamaño durante su redondeamiento y por división múltiple produce hasta 30 microgametos pequeñísimos de 3μ de largo, probablemente flagelados. De la fecundación del macrogameto por uno de estos microgametos se produce el cigoto.

3) ESPOROGENIA

Después de una división de reducción, el cigoto se rodea de una membrana y se transforma en ooquiste.

En el ooquiste, al comienzo no esporulado, se forman los esporoblastos que después de haberse completado la esporulación contiene cuatro esporozoitos cada uno.

CICLO BIOLOGICO

C.- CICLO BIOLOGICO ZOOTOTICO

El ciclo comienza, cuando el gato, se infecta en la naturaleza principalmente a través de la ingestión de las formas infectantes, en las que sólo aquellas que fueron resistentes a los jugos digestivos, evolucionan a través del epitelio intestinal del gato, distinguiéndose un ciclo de reproducción asexual o esquizogónica y otra de multiplicación sexual o gametogónica, y fuera del intestino del gato - en las heces fecales -, un ciclo esporogónico o antrozoootico (114, 135).

En la etapa enteropitelial los trofozoitos penetran en las vellosidades de la porción distal del intestino delgado del gato. Allí alcanzan la fase de esquizonte, el cual mediante esquizogonia da origen a los merozoitos. Es posible que esta fase esquizogónica sea precedida por otros mecanismos de reproducción asexual : endodogonia y poliendogonia.

Los merozoitos pueden penetrar a nuevas células o transformarse en gametocitos, que son los precursores de los gametos masculinos y femeninos, con los cuales se inicia la gametogonia.

El gameto masculino, exflagela dando origen de 12 a 32 microgametocitos y uno de estos, penetra al gameto femenino fundiendo su cromatina con la del macrogameto, fertilizándolo dando lugar al cigoto o huevo.

La fecundación ocurre dentro de la célula huésped y el cigoto resultante sale del intestino recubierto por una envoltura translúcida: el oocisto, que es expulsado al exterior con la materia fecal del gato

donde madura. Este ciclo tarda de una a dos semanas y de acuerdo al estadio infectante: 3 a 5 días después de haber ingerido quistes de T. gondii y de 2 a 3 semanas si la infección ocurrió mediante la ingestión de coquistes. El coquiste tiene una pared gruesa que lo protege, da origen al esporoblasto primario que se divide en dos esporoblastos, que luego se transforma en esporocistos los que al madurar en las materias fecales del gato, se dividen de nuevo para constituir 4 esporozoitos. Esta maduración ocurre en el suelo, dentro de las materias fecales excretadas por el gato.

D. CICLO BIOLÓGICO ANTROPOZOONÓTICO

Los quistes o pseudoquistes que se encuentran en la carne contaminada y los coquistes maduros que contaminan los alimentos, son las formas preinfectantes para el hombre (y otros hospederos intermediarios) que al ingerirlos inician el ciclo extraintestinal. (1.114)

Los taquizoitos liberados en el intestino, en la lámina propia, proliferan rápidamente atravesando la mucosa y se diseminan por linfa, sangre y cavidades, multiplicándose en cualquier célula del organismo, ya que debido a su pantropismo celular, T. gondii es capaz de parasitar y multiplicarse en todas las células del organismo excepto en el glóbulo rojo no nucleado. (1.73)

Los parásitos en el interior de las células se reproducen por endopoligenia. (73,143.)

En la endopoligenia se observa primeramente la formación de un material intensamente coloreado, cerca de las estructuras apicales del parásito, el núcleo se escota progresivamente dando lugar a la formación de varios núcleos hijos; el citoplasma se aglomera alrededor de los nuevos núcleos y comienza a rodearse de nuevas membranas celulares, no

relacionadas con las células madre. Estas últimas resultan destruidas por el progresivo crecimiento de las células hijas, las que al abandonarlas se cubren con la membrana limitante externa de las mismas; este tipo de multiplicación puede variar en lo que se refiere al tiempo y velocidad, de acuerdo con las modificaciones de la virulencia de una cepa determinada.

Al estallar la célula parasitada, los trofozoitos pueden infectar nuevas células, este periodo de proliferación rápida corresponde a la fase aguda de la toxoplasmosis lo que puede manifestarse clínicamente por una toxoplasmosis aguda generalizada. Esto se repite durante algún tiempo hasta que, con la aparición de las defensas del huésped, termina paulatinamente la fase de proliferación rápida. Los toxoplasmas libres a nivel de sangre y tejidos son destruidos al igual que gran parte de las formas proliferativas intracelulares; aquellas formas intracelulares que no son destruidas se transforman en formas quísticas. La fase proliferativa aguda se transforma en fase subaguda. (83)

Las formas quísticas se localizan de preferencia en cerebro, ojo, músculo cardíaco y esquelético, y con menor frecuencia en pulmón, hígado, bazo, útero y mucosa intestinal. El quiste es la forma de Toxoplasma gondii que caracteriza la fase crónica de la infección. Los quistes pueden permanecer en los tejidos en forma indefinida, como formas latentes, pero en ocasiones puede producirse la ruptura de estas formas quísticas (Fig 1) seguida de la liberación de parásitos capaces de invadir nuevas células y de reproducirse en la forma ya descrita. Este proceso se conoce como reactivación de una toxoplasmosis crónica y puede ser localizada, si el proceso se limita al tejido

circundante en que ocurre la ruptura del quiste; o generalizada si los toxoplasmas liberados de las formas quísticas pasan a la sangre o linfa y de allí al resto del organismo. (49,143)

E. MECANISMOS DE TRANSMISION

Al parecer son tres las principales fuentes de infección de *T. gondii* en la cadena de transmisión: gatos (y otros felinos), tierra y hospederos intermediarios. El hombre y otros carnívoros se encuentran como hospederos intermediarios biológicamente no funcionales debido a que son raramente comidos. Cada uno de los reservorios son influenciados por varias modificaciones. (48,50)

GATOS.

La densidad de población de gatos por casa y por Km determinan en general la concentración de sus heces fecales y la obtención potencial del agente infeccioso.

Después de la infección primaria los gatos son capaces de liberar millones de oocistos en sus heces fecales, depositadas comúnmente en la tierra suelta y cubierta ligeramente con ella. La edad de la población de gatos y sus características (gatos con o sin dueño) y el tipo de comida suministrada, son algunos de los factores que participan en determinar la proporción de eliminación de oocistos.

TIERRA.

La tierra preserva bien los oocistos si es húmeda y sombreada, mientras que el calor y la desecación disminuye la supervivencia de los oocistos. Con la falta de tierra los gatos defecan en superficies sólidas, como pisos de cocinas, debajo de muebles, etc. donde la humedad es alta y el lugar es sombrío. Esto permite a los especímenes fecales permanecer infecciosos por más tiempo.

Como la lombriz de tierra puede mezclar los ooquistes con la tierra suelta y las cucarachas y moscas también tienen acceso a las heces fecales de los gatos, bien sea que se encuentren en los pisos sólidos de las casas o en lugar con tierra, se ha pensado que pueden servir como transporte. (15.119)

HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS (15,50,69,137)

Los hospederos intermediarios (rata, ratón y aves), adquieren la infección por ingestión de ooquistes esporulados que se encuentran en la tierra. Una vez infectados permanecen así, con bradizoitos infecciosos en quistes que persisten hasta que el animal es comido por gatos u otros carnívoros.

Ovejas, cerdos, pollos, vacas, etc., están comunmente infectados y pueden servir de transmisores de Toxoplasma gondii a gatos cuando son alimentados con desechos de carne. (125)

Los humanos son hospederos intermediarios accidentales de la principal cadena de transmisión. Los niños se infectan cuando juegan con la tierra o arena. De acuerdo con estudios de Walton y Remington (50.110), se ha sugerido que los humanos se infectan principalmente por tierra contaminada con heces de gatos y en menor grado del contacto directo con la piel de dichos animales.

La toxoplasmosis congénica en el hombre (y probablemente en la mayoría de los animales) es biológicamente rara, pero médica y económicamente es un evento importante. (7,50,73)

La propagación de la toxoplasmosis en la naturaleza puede verificarse

de animal a animal: la más frecuente

de animal a hombre: frecuente

de hombre a hombre: la forma congénita frecuente

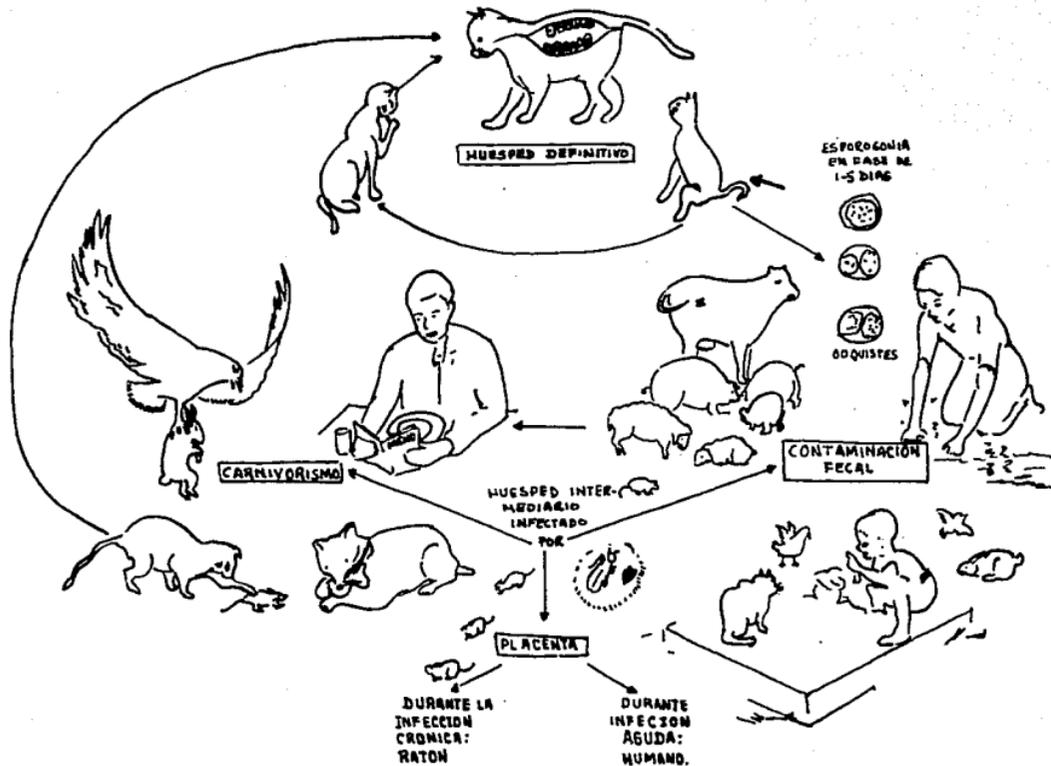


FIGURA N.º 2 "MECANISMOS DE TRANSMISION"

III.- FORMAS CLINICAS DE LA TOXOPLASMOSIS

La infección por lo general es subclínica; sin embargo la toxoplasmosis puede ser congénita o adquirida en el curso de la vida (postnatal). La infección intraúterina es la más grave; estudios realizados en mujeres y ensayos experimentales en conejos demuestran que una primoinfección de la madre, con anterioridad al embarazo por lo general no ocasiona fetopatías ni toxoplasmosis congénita (73,76).

A. TOXOPLASMOSIS ADQUIRIDA

Esta variedad de la enfermedad es en general grave, sus manifestaciones son múltiples variando con la virulencia de las cepas y la localización parasitaria. Presenta un período de incubación de 3 a 5 días aunque puede ser más prolongado, Theologides y Kennedy sugieren, que tomando como base las manifestaciones clínicas y los órganos comprometidos, sea clasificada en:

Toxoplasmosis ganglionar, Toxoplasmosis miliar, Toxoplasmosis localizada.

La manifestación más común de la toxoplasmosis ganglionar es la linfadenopatía asintomática : los ganglios linfáticos están aumentados de volumen, sin supuración ni dolor y de consistencia moderadamente dura, siendo principalmente afectados las cadenas cervicales (73,111).

Toxoplasmosis miliar : Caracterizada por diseminación generalizada del parásito, con manifestaciones clínicas de participación múltiple de órganos o sistemas y con evidencias patológicas de que la mayoría de las vísceras tienen células parasitadas (116).

Esta forma clínica ha sido descrita como forma tífica, forma

exantemática y forma de fiebre de las montañas rocosas.

Toxoplasmosis localizada : Son las formas clínicas que se manifiestan con síntomas de una viscera, y que en los casos que llegan a la autopsia, curiosamente se encuentra sólo ese órgano afectado. Existe la posibilidad de que un toxoplasma de baja virulencia tenga al mismo tiempo un tropismo visceral particular. Esta forma se clasifica de acuerdo al órgano que afecte, en : toxoplasmosis ocular, cerebral, pulmonar, miocárdica, pericárdica, hepática u otras menos comunes.

Piekarski (108), ha encontrado que aproximadamente el 15 % de las linfadenopatías que se presentan entre los 18 y 30 años de edad son atribuibles a la toxoplasmosis.

La toxoplasmosis es particularmente grave y mortífera en sujetos debilitados con inmunodeficiencia celular, esta se debe probablemente a una reactivación de la parasitosis latente, presentándose generalmente en niños leucémicos o adultos con linfomas, en pacientes con órganos transplantados bajo terapia inmunosupresora, o de enfermedades en la que el sistema inmune por alguna causa sea alterada su función de protección.

B.- TOXOPLASMOSIS CONGENITA

La toxoplasmosis congénita es el resultado de una infección aguda, adquirida por la madre durante la gestación por la vía placentaria, o por la reactivación de una forma latente pre-existente en la madre; aunque esta última posibilidad no es frecuente. Las formas quísticas localizadas en miometrio, endometrio o ambos prodrian liberar durante el embarazo las formas móviles de T.gondii e infectar al producto por invasión del trofozoito (116).

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, habiéndose observado que la frecuencia es de 10 % en el primer trimestre, 25 % en el segundo y 65 % en el tercer trimestre del embarazo (75,76), aunque la infección puede conducir al aborto espontáneo o prematuro; sin embargo la mayoría de los niños infectados nacen asintomáticos y pueden continuar así, o bien desarrollar coriorretinitis, estrabismo, ceguera, epilepsia, retraso psicomotor, trastornos conductuales y pulmonares, pudiéndose también presentar calcificaciones cerebrales.

Entre las alteraciones, es posible que el producto nazca con alteraciones como : a) variedad cerebro-óculo-médular, manifestada por hidrocefalia, macro o microcefalia, coriorretinitis, calcificaciones cerebrales, trastornos psicomotores, convulsiones, ataxia; b) variedad parasistémica : expresada por hepatitis (con o sin ictericia), neumonitis, esplenomegalia, cardiopatía, exantema maculo papular, poliadenitis y trastornos psíquicos.

El cuadro clínico de la toxoplasmosis congénita es grave pero las infecciones intrauterinas no son frecuentes y la mayoría transcurre en forma inaparente (59,76,92).

C. RESPUESTA INMUNE EN LA TOXOPLASMOSIS

Mucho se ha discutido acerca del papel que juegan los anticuerpos en los procesos infecciosos, pues aunque pueden alcanzar títulos muy altos, no logran del todo una protección completa para el huésped (97).

En base a estudios experimentales efectuados por Levaditi en

1928, se conoce la capacidad de Toxoplasma gondii, a desencadenar en el huésped una respuesta inmunitaria de tipo humoral; con la formación de anticuerpos, que permiten una disminución en la proliferación de las formas parasitarias libres, disminuyendo así el paso de los mismos de una célula a otra; pero es evidente que una vez sensibilizada la respuesta inmune, la sobrevivencia del parásito intracelular depende de la evasión de los mecanismos inmunes, adquiriendo otros estadios de proliferación lenta, y reproducirse dentro de él, con la formación de quistes, que es la manifestación crónica de la enfermedad, impidiendo así su digestión y muerte (76).

La fagocitosis y destrucción de los parásitos por macrófagos no activados son mecanismos eficaces pero inespecíficos, sin embargo la activación de linfocitos y sus linfocinas en respuesta a los antígenos de Toxoplasma gondii, en particular a las ribonucleoproteínas, confieren especificidad, particularmente el interferón gamma, ya que estimula a estas células produzcan iones superóxido y peróxidos que destruyen a los parásitos (40, 48).

Sin embargo, se debe recordar que Toxoplasma gondii invade relativamente pocos macrófagos, ya que prefiere fibroblastos, hepatocitos, neuronas, células intestinales, miocárdicas que probablemente sean incapaces de producir iones superóxido (142).

Los anticuerpos contra T. gondii actúan por mecanismo extracelular, y no intracelular.

La respuesta inmunitaria humoral se manifiesta primariamente en el huésped por producción de anticuerpos Ig M, y que generalmente no llegan a persistir seis meses, aunque algunos casos se los ha encontrado años después de la infección estimulante.

En forma lenta y paralela se origina otro tipo de anticuerpos de la clase Ig G (aparecen 2 a 4 semanas de iniciada la infección).

Su máxima intensidad se encuentra a los 12 meses, persistiendo elevada durante el primer año y bajando paulatinamente con niveles cada año, más bajos hasta estabilizarse más o menos a los 10 años con un título bajo.

De lo anterior se ha considerado que la determinación de Ig M en el Laboratorio debe constituir un procedimiento habitual para diagnóstico de toxoplasmosis aguda. Una determinación de Ig M superior a 20 mg %, es sugestiva de infección intrauterina por los agentes habituales del síndrome de TORCH.

Oxelius informó que hay incremento de Ig A, paralelo al de inmunoglobulinas monoclonales, en casos de toxoplasmosis transplacentaria, disminuyendo los niveles de Ig M en suero y líquido cefalorraquídeo con la instalación del tratamiento específico; la Ig A en cambio permanece elevada hasta los cuatro meses de edad.

En los estudios hechos para encontrar la relación del título de anticuerpos y las modificaciones que éstas puedan causar en la morfología de los toxoplasma Werner (140,141), encuentra que cuando los títulos de anticuerpos son bajos entre 1:4 y 1:128, el parásito puede aún reproducirse, pero cuando el título se eleva a 1:4 000 el número disminuye considerablemente y la división endodiogénica es incompleta, quedando los parásitos unidos sin poder separarse.

Cuando el título llega a 1:6 000 o más, se lisa la mayoría de los parásitos y sólo un pequeño grupo se mantiene en el interior de las células iniciándose la formación de pseudoquistes. Se ha estudiado la acción de anticuerpos sobre los parásitos en la reacción de Sabin-

Feldman y se ha observado que en una reacción positiva, el hecho de que no tifa el citoplasma con el azul de metileno ha generado varias hipótesis como : la que suponen Kularsé y DasGupta (73,114) señala que los anticuerpos penetran al parásito a través del conoide y las roptrias y en contacto con el citoplasma éste se hace homogéneo, produciendo cariólisis y más tarde lisis de todos los organelos.

En base a los estudios en microscopia electrónica, se ha observado que la actividad de los anticuerpos en presencia del complemento causan daño irreversible al parásito perdiendo estos su actividad, haciendose incapaces de infectar a los macrófagos.

Se ha demostrado que los macrófagos provenientes tanto de los animales como de humanos son incapaces por si sólos de inhibir o matar a *T. gondii* (73, 76,108) in vitro.

Jones y Hirsh, (75,84,94) explican lo que sucede al parásito dentro del macrófago, refiriendo una ausencia de fusión fagosome lisosoma, en las vacuolas fagociticas que contenian toxoplasmas vivos; en cambio aquellos que contenian parásitos muertos la fusión era notable. Así como también las vacuolas que contienen parásitos vivos están rodeados de numerosas mitocondrias y reticulo endoplásmico intimamente adosadas a la membrana vacuolar, en contraste con su ausencia en las vacuolas que contenian organismos degenerados.

Estos hechos hacen pensar que el toxoplasma posee la capacidad de inducir por algún mecanismo no conocido, la atracción de organelos que se disponen de tal manera que impidan la llegada de lisosomas de la célula huésped hacia la luz de la vacuola protegiendose de esta manera de la acción lítica de las hidrolasas y además por el tipo de elementos atraídos hacia la periferia de la misma le proporcionan al parásito un

microambiente favorable.

Por otra parte, se ha demostrado que macrófagos de origen humano o animal en cultivos a los que se ha agregado toxoplasmas con antisueros específicos, inhiben en gran medida la actividad de los parásitos (67.83.92.).

La importancia de la inmunidad celular ha sido demostrada en estudios de transformación blastoide, en cultivos de linfocitos de individuos con diagnóstico de toxoplasmosis. Los toxoplasmas fueron destruidos cuando se incubaron con macrófagos y linfocitos sensibilizados.

Sharma, Verhof y Remington han encontrado en estudios in vitro, un incremento importante en la actividad de células asesinas naturales (NK), en la incubación de linfocitos periféricos con precipitado por ultrasonido de T.gondii; estos datos coinciden con la producción de interferon gama.

Frenkel (48.49) demostró que la inmunidad a las infecciones causadas por parásitos intracelulares, como toxoplasmosis, es de tipo celular y puede ser transferida por linfocitos de donadores inmunizados, así como también esta inmunidad es específica y que son las células intactas las que ejercen la actividad inmunitaria pues los lisados de linfocitos o linfocitos irradiados no lo hacen.

Si bien podemos decir que la inmunidad humoral controla hasta cierto punto, el inicio de la infección aguda, es la respuesta celular la que desempeña un papel principal en las infecciones causadas por patógenos intracelulares como es T. gondii. (64)

IV.- METODOS

A. TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.) PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA Toxoplasma gondii

1. Fundamento

Esta reacción se basa en que las proteínas, incluyendo los anticuerpos del suero, pueden ser marcados con colorantes fluorescentes por combinación química, sin alteración o interferencia con sus propiedades biológicas o inmunológicas. Tales anticuerpos marcados reciben el nombre de conjugados, los cuales permiten demostrar una reacción antígeno-anticuerpo por la emisión de fluorescencia en el microscopio de luz ultravioleta y a este método se le llama reacción de inmunofluorescencia indirecta.

Podemos decir que la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta se basa en la identificación de anticuerpos por medio de un anti-anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína que se evidencia a través de un microscopio de luz ultravioleta.

2. Desarrollo de la Prueba

Descongelar las laminillas que contienen el antígeno *, y secar a temperatura ambiente.

Preparar las diluciones del suero control ** (positivo o negativo) así como los sueros problema de la siguiente manera: colocar la gradilla con tubos de ensayo 12 x 75 para cada suero *** de acuerdo al número de diluciones que se realizarán. Añadir a cada tubo la cantidad necesaria

para obtener una dilución de suero 1:2 en PBS (amortiguador de fosfatos salino pH 7.2 - 7.6). De esta dilución se partirá para realizar diluciones seriadas (al doble) en los tubos siguientes colocando un volumen de PBS con igual volumen de la dilucion anterior para obtener diluciones del suero 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 etc.

Con la microcopipeta tomar 10 μ l. de la dilución apropiada (iniciando con 1:2), del tubo de ensaye y colocarla en un circulo con antígeno contenido en la laminilla. Colocar la laminilla en la cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.

Lavar las laminillas con PBS pH 7.2 - 7.6 con una piseta y colocarlos en una caja de tinción con PBS pH 7.2 - 7.6 por cinco minutos. Secar a temperatura ambiente o con una corriente ligera de aire.

Cubrir los círculos de la placa con 10 microlitros de la dilución óptima del conjugado ****. Colocar la laminilla en cámara húmeda a 37°C por treinta minutos.

* ver apéndice 2

** con el suero control positivo se realizan diluciones seriadas hasta una dilución mayor a la ya conocida, colocando en la placa la dilución mayor, menor y la ya conocida. Con el suero control negativo se realizara únicamente la dilución 1:16, colocándola en la laminilla con antígeno.

Lavar las laminillas con PBS pH 7.2 - 7.6 con una pipeta y colorarlas en una caja de tinción que contenga PBS pH 7.2 - 7.6 durante cinco minutos, sacar las laminillas y dejar secar a temperatura ambiente.

Colocar a la laminilla una gota de glicerina tamponada y cubrir con un cubreobjetos.

Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente y observar al microscopio de fluorescencia con objetivo seco fuerte.

*** Inicialmente se realizan cuatro diluciones de cada suero (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128). Si el suero problema es positivo a la dilución 1:128, se deberá retitular con mayores diluciones, sin omitir los controles.

**** Ver apéndice 3.

3. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La reacción se considera NEGATIVA (-) cuando se observa los organismos fluorescentes de color rojo púrpura sin ninguna fluorescencia verde-amarillenta en la periferia; también se considera NEGATIVA cuando el polo anterior del organismo fluoresce verde-amarillento sin extenderse esta fluorescencia a la periferia y sin llegar al polo posterior (coloración polar), se presenta en las primeras diluciones y usualmente desaparece en las diluciones mayores a 1:64. (47, 127)

La reacción es POSITIVA cuando la fluorescencia verde-amarillenta se extiende por toda la periferia del organismo. Esta reacción puede ser muy intensa, aún a diluciones altas, en los sueros fuertemente positivos.

Cuando se hace la determinación del título de anticuerpos contra Toxoplasma gondii, se debe encontrar la máxima dilución del suero que presenta aún fluorescencia definida en al menos el 50 % de los parásitos observados. La intensidad de la fluorescencia está en relación directa con la concentración de anticuerpos.

V.- M A T E R I A L

A. MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Antígeno preparado a partir de exudado peritoneal de ratones infectados con Toxoplasma gondii
- b) Suero humano problema (289 muestras).
- c) Suero humano control positivo (título 1:64 y 1:512).
- d) Suero humano control negativo (-).
- e) Globulina antihumana marcada con isotiocianato de fluoresceína.

B R E A C T I V O S

- | | | |
|---|--------------------------|-------------|
| a) Na_2HPO_4 | Mca. Productos Monterrey | Lote 5154 |
| b) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | Mca. Productos Monterrey | Lote 009212 |
| c) NaCl | Mca. Baker Analysed | Lote 36509 |
| d) Azul de Evans | | |

C. MATERIAL

- a) Agujas para jeringas.
- b) Camara húmeda.
- c) Caja de tinción.
- e) Jeringas desechables de 10 ml.
- f) Jeringas de Insulina.
- g) Matraz Aforado de 1000 ml.
- h) Matraz Erlenmeyer de 500 y 2 000 ml.
- i) Micropipetas de 10-50 μ l, 50-250 μ l, 150-1000 μ l.
- j) Papel Filtro.
- k) Pipetas Pasteur.
- l) Pipeta Hamilton.
- m) Portabjetos de 2.5 x 7.5 cm co 12 campos.

D. EQUIPO

- a) Centrifuga Clínica.
- b) Incubadora ajustable a 35°C - 37°C.
- c) Microscopio de epifluorescencia (Karl Zeiss con lámpara OSRAM HBO 200 W 41).

E. SOLUCIONES

- a) Amortiguador de fosfatos salino pH 7.2
- b) Amortiguador de fosfatos salino pH 8.5
- c) Gliceriana Tamponada.
- d) Formaldehido al 10 %.
- e) Fenol al 5 %.

* Ver apendice N.3

VI.- MICRO-TECNICA DE INMUNOUNION EN MANCHA " DOT-ELISA "
PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA Toxoplasma gondii

A. FUNDAMENTO

El principio básico de esta prueba se basa en una reacción inmunológica en la que el anticuerpo presente en el suero reacciona con el antígeno de Toxoplasma gondii que ha sido adsorbido previamente a un soporte sólido de nitrocelulosa, poniéndose esta de manifiesto con la adición de un conjugado enzima-anticuerpo y el sustrato específico para la enzima. La hidrólisis de este sustrato dará una coloración en el fondo blanco del soporte sólido de nitrocelulosa.

B.- DESARROLLO DE LA PRUEBA

El soporte utilizado en el ensayo de DOI-ELISA como inmunoadsorbente es un filtro de nitrocelulosa, (Millipore 0.22 μ m): que son cortados en discos de 5 mm de diametro, marcados débilmente con un lapicero en la superficie opaca de la membrana, para aplicación de trofozoitos de T. gondii al disco, (a una concentración de 2.5×10^4 parásitos, -(1.44 μ g de proteína)- en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5, a temperatura de 4 °C ó 37 °C y tiempo variable de 1 a 24 horas).

Comúnmente las condiciones óptimas como pH, tiempo y temperatura se determinan por el ensayo y error, y la concentración del antígeno haciendo titulaciones en forma de tablero de ajedrez contra un suero negativo y uno positivo.

El antígeno se adsorbe sobre los microdiscos, secando a 37°C. por 30 minutos, en placas de microtitulación de 96 pozos (estos microdiscos ya sensibilizados pueden ser almacenados a -20 °C. antes de ser usados).

Antes de realizar la prueba es necesario que los discos sensibilizados deban estar a temperatura ambiente en las placas de microtitulación.

Debido a la alta sensibilidad de la técnica, uno de los problemas más frecuentes en su empleo es la adsorción inespecífica a la fase sólida de algunos o varios componentes del sistema, en los espacios que no fueron ocupados por el antígeno, para evitar esto las placas se recubren con una sustancia bloqueadora, de Leche Sveltes al 5 % , en PBS pH 7.5 a razón de 75 µl, para cada pozo de la placa, con una incubación de 30 minutos a 37 °C, agitando suavemente las microplacas, para homogeneizar el sistema. Se aspira la solución bloqueadora, y se elimina el excedente, realizando tres lavados con solución de PBS-TWEEN 20 al 0.05 % a pH 7.5, con un minuto de agitación, en los dos primeros y en el tercer lavado deberá incubarse a temperatura ambiente, con agitación por un minuto y nueve minutos en reposo.

Se aspira la solución bloqueadora de los pozos con discos de antígeno y se adiciona a cada pozo, 50 µl de suero a diluciones seriadas, en Leche Sveltes - PBS al 1 % pH 7.5, realizando agitación manual durante un minuto e incubar durante 15 minutos a 37 °C.

Realizar el correspondiente lavado como se mencionó arriba, posteriormente se aspira la solución lavatoria de PBS-TWEEN 20 al 0.05% pH 7.5, adicionar 50 µl de conjugado anti-inmunoglobulina-peroxidasa a

una dilución de 1:100 en PBS-TWEEN al 1 % a pH 7.4, para acelerar la reacción Ag-Ac-anti-gamaglobulina-peroxidasa se procede a incubar la(s) microplaca(s), a 37°C por un lapso de 30 minutos.

Terminando el proceso de incubación, se aspira el conjugado, y se elimina el excedente, adicionando la solución lavatoria de PBS-TWEEN 20 al 0.05 % pH 7.5, realizando tres lavados como se menciona al inicio del proceso.

Posteriormente se prepara la solución STOCK, en un frasco ambar que será preparada durante el desarrollo de la prueba, esta solución contiene el cromógeno 4-Cloro-1-Naftol, que se disuelve en metanol anhidro (3mg/ml), al que se adiciona 5,000 μ l de PBS pH 7.5 y 2 μ l de peróxido de hidrogeno. Esta solución es guardada en la oscuridad.

Una vez preparada la solución reveladora, se adicionan 75 μ l, a cada pozo de la(s) placa(s) con agitación suave por un minuto, y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos en la oscuridad.

C. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La reacción se considera NEGATIVA, cuando en las primeras diluciones, durante el proceso de revelado, el fondo blanco del soporte de nitrocelulosa, no se observe una reacción de color azul como indicativo de la oxidación del colorante 4-Cloro-1-Naftol a su forma cromogénica, por la acción de la enzima peroxidasa acoplada a una anti-gamaglobulina.

La reacción es positiva cuando las diluciones del suero causen manchitas de color azul. Esta reacción puede ser muy intensa, aún a diluciones altas, en los sueros fuertemente positivos.

Por lo que se debe determinar la máxima dilución del suero que presente en el fondo blanco del soporte una mancha de color azul.

La intensidad del color azul en el soporte de nitrocelulosa, esta en relación directa con la concentración de anticuerpos presentes en cada suero.

VII.- M A T E R I A L

A. MATERIAL BIOLÓGICO

- A) Antígeno preparado a partir de exudado peritoneal de ratones infectados con Toxoplasma gondii
- B) Suero humano problema (289 muestras)
- C) Suero humano control positivo (título 1:2 y 1:512).
- D) Suero humano control negativo (-)
- E) Conjugado de Peroxidasa de Rabano-anti Ig G de humano obtenido de cabra.

B. REACTIVOS

- | | | | |
|----|--|--------------------------|-------------|
| A) | Na_2HPO_4 | Mca. Productos Monterrey | lote 5154 |
| B) | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | Mca. Productos Monterrey | lote 009212 |
| C) | Na Cl | Mca. Baker Analysed | lote 36509 |
| D) | TWEEN 20 | | |
| E) | Leche Sveltes | | |
| F) | Peroxido de hidrógeno q.c.p. | | |

C. MATERIAL

- A) Portaobjetos de 2.5 X 7.5 cm
- B) Cubreobjetos de 22 X 22 mm
- C) Pipeta Hamilton de 25 μ l
- D) Pipetas Pasteur
- E) Pipetas serológicas de 10-25 μ l, 50-100 μ l, 100-1000 μ l.
- F) Pinzas
- G) Discos de nitrocelulosa de 5 mm de diámetro (tamaño del poro : 0.22 μ m)
- H) Microplacas marca Nunclón de Fondo Plano
- I) Matraz aforado de 1000 ml
- J) Jeringas desechables de 5 - 10 ml
- K) Jeringas de Insulina
- L) Puntillas desechables
- M) Matraz de Kitazato de 1000 ml
- N) Tubos de 13 X 100 mm
- N) Gradillas
- O) Tubos de centrifuga, de 15 ml

D. E Q U I P O

- A) Incubadora a 37 °C.
- B) Microscopio óptico marca Zeiss
- D) Centrifuga clinica

E. SOLUCIONES

- A) Amortiguador de fosfatos de salino pH 7.5
- B) Agua Bidestilada
- C) PBS-TWEEN 20 al 0.05 %
- D) Leche Sveltes al 1 % y 5 %
- E) Solución de Stock
- G) PBS-FORMOL al 2 %

* Ver apéndice N. 4

VIII. R E S U L T A D O S

De un estudio comparativo de dos técnicas inmunológicas para la determinación de anticuerpos contra *T. gondii*, en 283 sueros provenientes, de universitarias jóvenes, del sexo femenino, se obtuvieron los siguientes datos:

Con la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, se determino un porcentaje de seropositividad del 10.29 %, en un total de 68 muestras de la Facultad de Química, mientras que en la Universidad Autónoma de Chapingo, se encontro un 11.88 % de seropositividad de un total de 101 muestras, y un 19.29 % de seropositividad en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales de Cuautitlán Izcalli de un total de 114 muestras. Encontrandose de esta manera un 14.49 % de seropositividad global para esta técnica.

En relación a la microtécnica Inmunounión en mancha (DOT-ELISA), se obtuvo un 11.76 % de seropositividad en la Facultad de Química, un 14.85 % en la Universidad Autónoma de Chapingo, y un 21.92 % en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales de Cuautitlán Izcalli, aduciendo una seropositividad, del 16.96 % , para esta técnica.

Se obtuvo un 83.39 % de seronegatividad con la microtécnica inmunounión en mancha DOT-ELISA, y un 85.51 % de seronegatividad con la técnica de referencia (I.F.I.), lo que indica una diferencia de seronegatividad entre ambas técnicas del 2.12 %.

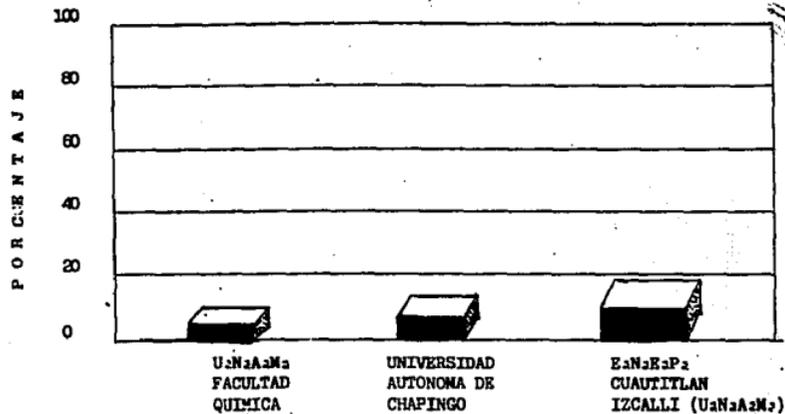
Por lo que de las 242 muestras confirmadas como negativas por medio de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, 235 resultaron

negativas con la microtecnica DOT-ELISA. De las 41 muestras seropositivas con IFI, 48 resultaron positivas con DOT-ELISA. Por lo tanto se determino que la especificidad de la prueba DOT-ELISA es 97 % ; la sensibilidad del 117 % .

**SEROPREVALENCIA OBTENIDA SEGUN PROCEDENCIA, UTILIZANDO
LA TECNICA DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA**

PROCEDENCIA	NUMERO DE NEGATIVOS	NUMERO DE POSITIVOS	TOTAL DE MUESTRAS	PORCENTAJE DE PREVALENCIA
U. N. A. M. FACULTAD QUIMICA	61	7	68	10.29 %
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHAPINGO	89	12	101	11.88 %
E. N. E. P. CUAUTITLAN IZCALLI	92	22	114	19.29 %
T O T A L E S :	242	41	283	
PORCENTAJE PROMEDIO	85.51 %	14.4876 %		

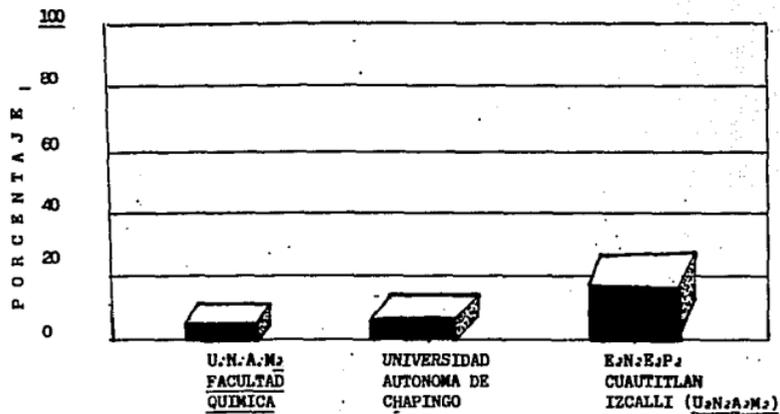
PORCENTAJE DE SEROPREVALENCIA OBTENIDA SEGUN PROCEDENCIA
CON LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA



**SEROPREVALENCIA OBTENIDA SEGUN PROCEDENCIA, UTILIZANDO
LA MICROTECNICA INMUNOUNION EN MANCHA (DOT-ELISA)**

PROCEDENCIA	NUMERO DE NEGATIVOS	NUMERO DE POSITIVOS	TOTAL DE MUESTRAS	PORCENTAJE DE PREVALENCIA
U. N. A. M. FACULTAD QUIMICA	60	8	68	11.76 %
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHAPINGO	86	15	101	14.85 %
E. N. E. P. CUAUTITLAN IZCALLI	89	25	114	21.92 %
T O T A L E S	235	48	283	
PORCENTAJE PROMEDIO	83.39 %	16.9611 %		

PORCENTAJE DE SENSIBILIDAD OBTENIDA SEGUN PROCEDENCIA
CON LA MICROTECTINA INMUNO-UNION EN MANCHA (DOT-ELISA)



FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON ANTICUERPOS CONTRA *Toxoplasma gondii*
SEGUN EDAD, EN UNA POBLACION APARENTEMENTE SANA

EDAD	SEROPOSITIVOS	SERONEGATIVOS	TOTAL	PORCENTAJE DE SEROPOSITIVIDAD
17 - 21	14	109	123	11.38 %
22 - 26	18	97	115	15.65 %
27 - 31	9	36	45	20.00 %

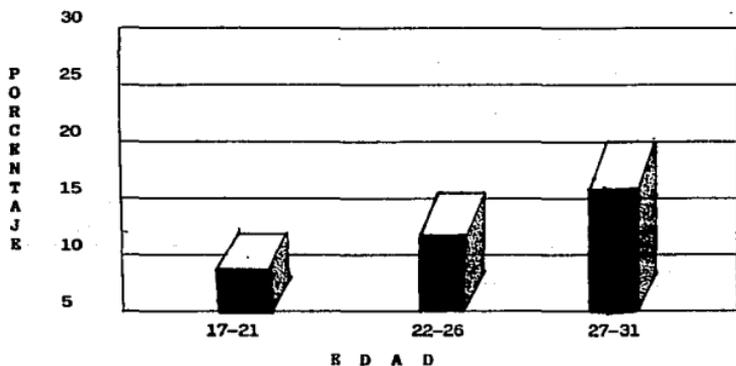
* TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON ANTICUERPOS CONTRA *Toxoplasma gondii*
SEGUN EDAD, EN UNA POBLACION SANA.

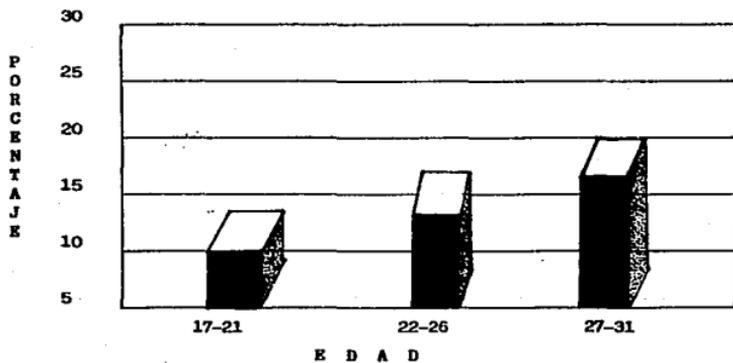
EDAD	SEROPOSITIVOS	SERONEGATIVOS	TOTAL	PORCENTAJE DE SEROPOSITIVIDAD
17 - 21	18	105	123	14.63 %
22 - 26	20	95	115	17.39 %
27 - 31	9	36	45	20.00 %

** TECNICA INMUNOUNION EN MANCHA (DOT-ELISA)

PORCENTAJE DE SEROPOSITIVIDAD SEGUN EDAD, EN UNA POBLACION APARENTEMENTE SANA CON LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA — INDIRECTA:



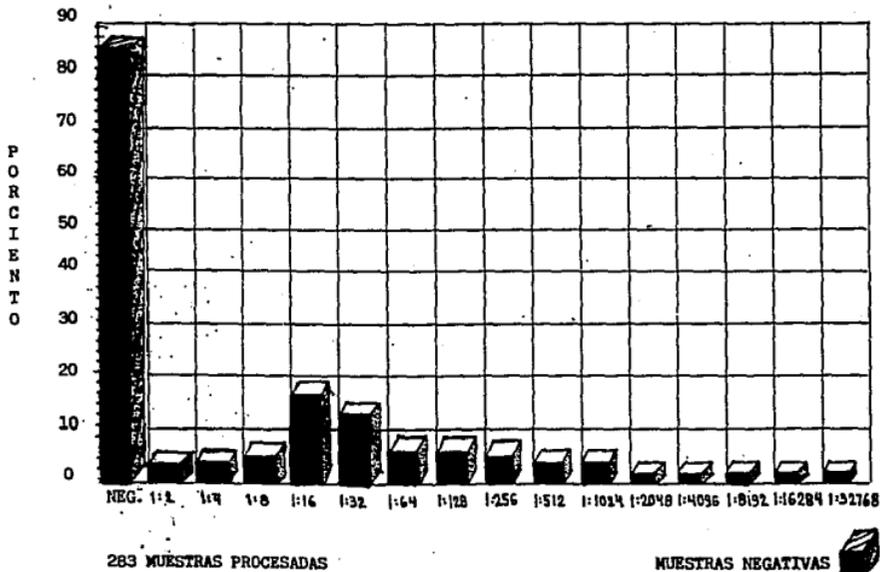
PORCENTAJE DE SEROPOSITIVIDAD, SEGUN EDAD, EN UNA POBLACION APARENTEMENTE SANA CON LA MICROTECNICA DOT-ELISA :



POBLACION APARENTEMENTE SANA
 DETECCION DE ANTICUERPOS CLASE Ig G
 PARA *Toxoplasma gondii* CON (I.F.I)

RECIPROCO DEL T I T U L O CODIFICADO	NUMERO DE POSITIVOS Ig G/TOTAL	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
1:2	2/41	4.87 %
1:4	2/41	4.87 %
1:8	3/41	7.32 %
1:16	8/41	19.41 %
1:32	6/41	14.63 %
1:64	4/41	9.76 %
1:128	4/41	9.76 %
1:256	3/41	7.31 %
1:512	2/41	4.87 %
1:1024	2/41	4.87 %
1:2048	1/41	2.44 %
1:4096	1/41	2.44 %
1:8192	1/41	2.44 %
1:16284	1/41	2.44 %
1:32768	1/41	2.44 %

PORCIENTO DE SEROPOSITIVIDAD CONTRA Toxoplasma gondii MEDIANTE LA TECNICA DE
 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

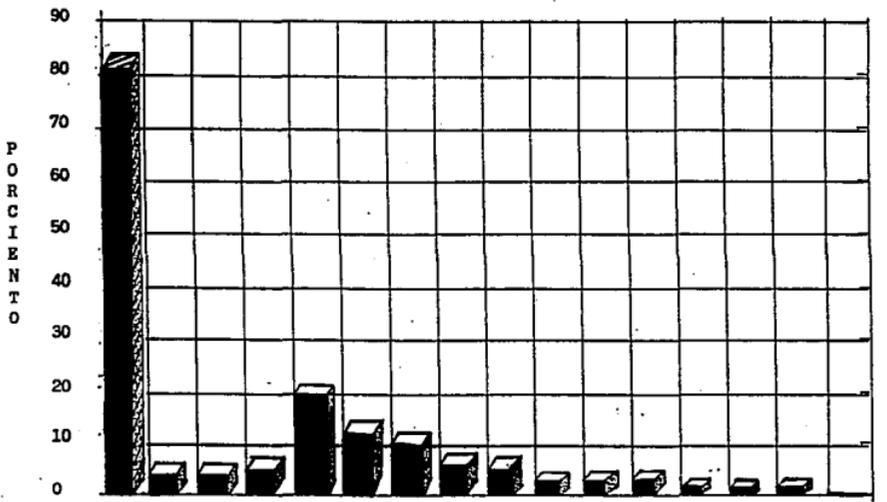


POBLACION APARENTEMENTE SANA
 DETECCION DE ANTICUERPOS CLASE Ig G
 PARA Toxoplasma gondii CON (DOT-ELISA)

RECIPROCO DEL TITULO CODIFICADO	NUMERO DE POSITIVOS Ig G/TOTAL	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
1:2	3/48	6.25 %
1:4	3/48	6.25 %
1:8	4/48	8.33 %
1:16	10/48	20.83 %
1:32	6/48	12/50 %
1:64	5/48	10.42 %
1:128	4/48	8.33 %
1:256	3/48	6.25 %
1:512	2/48	4.17 %
1:1024	2/48	4.17 %
1:2048	2/48	4.17 %
1:4096	1/48	2.08 %
1:8192	1/48	2.08 %
1:16284	1/48	2.08 %
1:32768	0/48	0.00 %

PORCIENTO DE SEROPOSITIVIDAD CONTRA Toxoplasma gondii MEDIANTE LA MICROTECNICA

INMUNOUNION EN MANCHA (DOT-ELISA)



283 MUESTRAS PROCESADAS

MUESTRAS NEGATIVAS



53

IX.- D I S C U S I O N

De las investigaciones de seroprevalencia, realizadas por Velasco y cols., en 1989 - 1990, en la Encuesta Nacional Seroepidemiológica, se destacó una variación en cada una de las Entidades Federativas, observándose una mayor prevalencia en las regiones costeras de los litorales al Sur del Trópico de Cancer.

La prevalencia encontrada por los autores en el Distrito Federal fué del 31.0 % de 2664 sueros, y en el Estado de México fué del 32.1 % de 264 sueros, utilizando la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.

Comparando nuestros resultados con el estudio mencionado, se encontró una prevalencia promedio del 15.72 %; para ambas técnicas; (IFI Y DOT - ELISA), observándose una variación casi del 50 %, con relación al trabajo anterior. Es posible que esta diferencia observada en nuestro porcentaje de seroprevalencias, se deba a que nuestras muestras provenían de individuos universitarios jóvenes, ya que la incidencia de esta parasitosis, tiende a aumentar con la edad, como lo han demostrado diversos autores, (8,40,71,77), adjudicando además el hecho de que el número de muestras procesadas, en este trabajo fué muy reducida.

Sin embargo, este hecho; no descarta la existencia real de esta infección, dada la característica cosmopolita de dicha parasitosis, lo cual hace necesario realizar un estudio de continuidad, e introducir técnicas o variantes a estas, que determinen infecciones en forma precoz.

En cuanto a la distribución del número de personas positivas por grupo de edad, se observa una prevalencia mayor entre los 27 - 31 años

de edad, en ambas técnicas, y los títulos que se detectaron con mayor frecuencia fueron de 1:16 y 1:128, para ambas técnicas.

En nuestro estudio consideramos importante trabajar con títulos de corte de 1 : 2, dado a que en muchas infecciones toxoplasmosicas dan títulos sumamente bajos y no son detectados, cuando se trabaja con títulos de corte de 1:16. Se pensaría que al trabajar con títulos de corte de 1:2 , traería como consecuencia resultados falsos positivos, por fenómeno de cruce inmunológico; pero estudios de Frenkel, afirman que solamente Toxoplasma gondii, puede cruzar con Hammondia hammondi parásitos de felinos y roedores; que no infecta al hombre.

Se hace notar que existe una discrepancia cualitativa, por mayor sensibilidad entre la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta y la Microtécnica DOT-ELISA, a favor de esta última, como se muestra en los sueros con títulos bajos (1:2 y 1:16), en ambas reacciones.

Al realizar un análisis estadístico, en relación a los porcentajes, de seropositividad dados por las dos técnicas, se observa que no hay diferencia significativa, a un intervalo de confianza del 95 %, por lo que, en relación a los títulos observados en ambas técnicas se determino un coeficiente de correlación de $r = 0.8694$, $F = 1.5775$.

Lo que de acuerdo a lo reportado por Michael Pappas, hace referencia, de un coeficiente de correlación de 0.895 ; entre la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (referencia) con la microtécnica DOT-ELISA, aduciendo que existe equivalencia en sensibilidad y especificidad entre estas dos técnicas, por lo que corresponde a nuestra técnica realizada, podemos decir que se aproxima, a los resultados ya establecidos por Pappas y cols.; (1988).

CONCLUSIONES

Habiéndonos percatado que la prevalencia de Anticuerpos contra Toxoplasma gondii es considerable en nuestra población y que además un porcentaje importante de nuestra población juvenil, en edad económicamente activa, se encuentra infectada, resulta necesario tomar medidas de control sanitario que nos puedan llevar, ha conocer mejor el desarrollo natural de este padecimiento. Ya que cuando esta parasitosis se presenta con formas sintomáticas resulta compleja y difícilmente llega a diagnosticarse oportunamente, produciendo posiblemente en este porcentaje de afectados, secuelas graves. Para lograr esto los estudiosos en la materia, deberán enfocarse a diversos aspectos involucrados en esta enfermedad, desde el ámbito sociocultural, biología del parásito, estudio de reservorios así como el aspecto clínico como otros; de esta manera podemos prevenir y tratar oportunamente esta parasitosis.

En nuestro campo, clínico-médico; se hace suponer que la existencia de nuevas técnicas, cuyas características ofrezcan ventajas, que suplanten o sean equivalentes a las ya establecidas, ayuden a realizar una mejor vigilancia epidemiológica de esta parasitosis, y ser una herramienta más en el serodiagnóstico precoz, particularmente en las regiones rurales y poblaciones pequeñas, donde el equipo sea el mínimo, para ser transportado.

En esta ocasión se ha demostrado que la Técnica DOT-ELISA, mostró gran sensibilidad y especificidad, además de ser una prueba sencilla, que no requiere de material o equipo complejo, para su realización;

cualidades que la hacen superior a la prueba de referencia -
Inmunofluorescencia Indirecta; (prueba utilizada en este estudio) -
por lo que la Técnica DOT-ELISA, puede utilizarse como prueba
alternativa en el diagnóstico de la Toxoplasmosis.

XI.- A P E N D I C E S

A. APENDICE No. 1

PREPARACION DE REACTIVOS

1. Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS)

1.1 Solucion Madre

a) Fosfato Disódico Monohidrogenado (Na_2HPO_4) 0.1 M.

Na_2HPO_4 14.196 g

Agua Destiladac.b.p. 1 000 ml

b) Fosfato de Sodio Dihidrogenado (NaH_2PO_4) 0.1 M.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 13.799 g

Agua Destiladac.b.p. 1 000 ml

c) Solución de Cloruro de Sodio (NaCl al 0.15 M)

Cloruro de Sodio 8.766 g

Agua Destiladac.b.p. 1 000 ml

1.2 Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS) pH 7.2

Na_2HPO_4 (Solución Madre "a") .. 71.5 ml

NaH_2PO_4 (Solución Madre "b")... 28.5 ml

NaCl 900.0 ml

Mezclar completamente y ajustar a pH 7.2 - 7.6 con NaOH
0.1 M o HCl 0.1 M si es necesario.

1.3 Diluyente del Conjugado

A 19 ml de Solución Amortiguadora de Fosfatos, pH 7.2
agregar 1 ml de TWEEN 80.

1.4 Solución de Evans 1: 1000 (Colorante de Contraste)

Solución de Evans al 0.5 % en PBS, pH 7.2 200.00 ml
Agua Destilada c.b.p. 1000.00 ml

1.5 Líquido de Montaje pH 8.5 (glicerina amortiguada).

a) Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS) pH 8.5

Na_2HPO_4 (Solución Madre a) 94.5 ml
 NaH_2PO_4 (Solución Madre b) 5.5 ml
NaCl 0.85 % 900.00 ml

Mezclar completamente y ajustar a pH 8.5 con NaOH 0.1 N ó
HCl 0.1 M si es necesario.

b) Glicerina Tamponada

Amortiguador de Fosfatos pH 8.5 1.0 volumen
Glicerina 9.0 volúmenes

A.1 PREPARACION DE LAMINILLAS DE ANTIGENO

PREPARACION DEL ANTIGENO

Se utilizó una cepa RH de Toxoplasma gondii donada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, S.S.A. que mantiene su viabilidad por pase intraperitoneal en ratones NIH.

Obteniendo el exudado peritoneal de los ratones infectados con 72 horas de anticipación. Al exudado peritoneal (0.5 - 1.0 ml) se le añaden 10.0 ml de solución salina formilada-PBS pH 7.2 al 2 %, mezclar perfectamente y mantener en reposo por 45 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar el sobrenadante a 2 000 r.p.m. con el objeto de sedimentar los toxoplasmas obtenidos del exudado.

Desechar el sobrenadante, resuspender los organismos en PBS pH 7.2 y sedimentar nuevamente; repetir el lavado tres veces, resuspender el sedimento de organismos en suficiente PBS pH 7.2 para ajustar a 300 - 400 organismos por campo con objetivo seco fuerte colocados en la placa.

Utilizando una micropipeta de 9 µl, se resuspende esta dosificación de antígeno en los doce campos del portaobjetos 2.5 x 7.5 cm, y secar completamente a temperatura ambiente. Almacenar en caja para portaobjetos a - 20°C hasta su uso.

APENDICE No. 3

A.1 PREPARACION DEL CONJUGADO

El conjugado se obtuvo de una fuente comercial, utilizandose de acuerdo a las indicaciones del proveedor, este se debe preparar en el momento de usar a la dilución óptima de trabajo con Azul de Evans pH 7.2.

A.2 Dilución Óptima del Conjugado

Titulación del Conjugado

El conjugado de Ig G marcado con Isotiocianato de Fluoresceína se deberá titular cada que se cambie la lámpara del microscopio de epifluorescencia o cuando se emplee un nuevo vial de conjugado para conocer la dilución óptima de trabajo.

Realizar diluciones seriadas al doble, de los sueros control positivo (+) hasta dos diluciones por arriba de la de referencia.

Preferentemente se emplea un suero positivo con título alto, dilución 1:512 y un suero positivo con título bajo 1:64.

Del suero control negativo (-) se realiza una única dilución 1:16.

Se sigue el mismo procedimiento que ya se ha mencionado (pag. 27), colocando las diluciones de los sueros control como se esquematiza a continuación.

El conjugado Ig G-Isotiocianato de Fluoresceina es preparado con PBS pH 7.2 y Azul de Evans (como colorante de contraste) a diferentes diluciones (1:10, 1:100, 1:500, 1:2000, etc.).

Se emplea una laminilla por cada dilución del conjugado que se va a ensayar.

La dilución óptima será aquella en la que se observe una reacción positiva exactamente en el título conocido de los sueros control negativo (pag.30).

	128	256	512	1024	2048	PBS
↑	○	○	●	○	○	○
↓	○	○	●	○	○	○
	16	32	64	128	256	C ⁻

↑ Control positivo a título alto

↓ Control positivo a título bajo

C (-) Control negativo

APENDICE N.- 4

A.1 PREPARACION DE REACTIVOS PARA LA MICROTECNICA (DOT-ELISA)

1. Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS).

Prepararse en la forma indicada, en el APENDICE I, sólo se deberá ajustar la(s) solución(es), a pH de 7.2 y 7.6, con NaOH 0.1 N ó HCl 0.1 N si es necesario.

A.2 Solución de PBS-TWEEN 20 al 0.05 %

Solucion de PBS-20 50 ul
Solución amortiguadora de Fosfatos (pH 7.6). 100 ml
(Realizar un aforo con un matraz de 100 ml, para obtener una solución de PBS-TWEEN 20 al 0.05 %)

A.3 Leche Sveltes al 5 % y 3 % .

Leche Sveltes al 5 % 5 gr
Agua Bidestilada 100 ml
(Realizar un aforo con un matraz de 100 ml para obtener una suspensión bloqueadora de Leche Sveltes al 5 %).

Leche Sveltes al 1 % -Solución Diluyente de (los) suero(s)-
De la suspensión anterior, se toman 20 ml y se afora a 100, con PBS pH 7.6 .

A.4 SOLUCION DE STOCK

4-Cloro-1-Naftol	3 mg
Metanol	1 ml
Solución de PBS pH 7.6	5 000 ul
Peróxido de Hidrogenoq.c.p.	2 ul

A.5 Solución de PBS-FORMOL al 2 % .

Formol comercial	2 ml
Solucio de PBS pH 7.2	98 ml

A P E N D I C E N. - 5

A.1 PREPARACION DEL ANTIGENO.

Para la obtención de una buena cantidad de antígeno de Toxoplasma gondii, es necesario infectar a un lote de 26 ratones NIH, con un peso aproximado de 25 a 30 gramos, los cuales serán sacrificados en un periodo de tres días.

El exudado peritoneal obtenido de dichos ratones, se vierte en un tubo de vidrio esterilizado y de peso conocido, al que se le añade 10.0 ml de solución salina formulada al 2 % pH 7.2. para fijar al antígeno de T. gondii; dicha suspensión se homogeniza, y se mantiene en reposo por 60 minutos a temperatura ambiente. Con el objeto de tener un sobrenadante rico en toxoplasmas, se resuspende la suspensión, utilizando jeringas del Num. 22 y del Num. 27, tres veces con la misma solución formulada de fosfatos, y se deja reposar durante 24 horas, para lisar las células contenedoras de Toxoplasma gondii, se toma con mucho cuidado el sobrenadante y se coloca en un tubo estéril, para centrifugarlo a 2,000 r.p.m.: durante media hora, con el objeto de sedimentar los toxoplasmas obtenidos del exudado.

Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento es diluido 1 :10, con una solución Buffer de Fosfatos (PBS pH 7.2), para resuspender, el sedimento obtenido. Dicha operación deberá realizarse tres veces consecutivas, con el objeto de eliminar los leucocitos y las células endoteliales propias del ratón.

En cuanto a la concentración, óptima del antígeno: para sensibilizar microdiscos de nitrocelulosa, deberá contener una cantidad de 2.5×10^4 parásitos (1.44 ug de proteína).

Para realizar un conteo optimo de células viables, se adiciona una gota de azul de metileno, a la suspensión celular, al momento de realizar el conteo de células en la cámara de Neubauer, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{DILUCION} = \frac{\text{No. de células}}{\text{No. de Cuadran-tes}} \times \frac{\text{Factor de dilución (10)}}{\text{Factor de conversión de la cámara (10,000)}} = \text{No. de células deseadas por ml}$$

Una vez ajustada la concentración del antígeno se sensibilizan los microdiscos, con la ayuda de una pipeta Hamilton, adicionando 1 ul. de la concentración optima del antígeno, en cada microdisco, que deberán secarse en la estufa a 56 C. y posteriormente guardarse a 4 C. para uso posterior, conservando las propiedades antigenicas de Toxoplasma gondii.

A.2 PREPARACION DEL CONJUGADO.

El conjugado se obtuvo del Centro Nacional de Parasitología Animal, utilizando la Solución Buffer de Fosfatos (PBS) pH 7.6, como diluyente, y las indicaciones del proveedor, se prepara el conjugado.

A.3 DILUCION OPTIMA DEL CONJUGADO

El conjugado con peroxidasa se debera titular, cada que se emplee un nuevo vial, para conocer la dilución optima del conjugado se realizan diluciones seriadas al doble, de los sueros control positivo (+) hasta dos diluciones arriba de la de referencia.

Preferentemente se emplea un suero positivo con titulo alto, dilución 1:512 y un suero positivo bajo 1:64.

Del suero control negativo (-) se realiza una única dilución 1:16. Se sigue el mismo procedimiento ya mencionado en la microtécnica de DOT-ELISA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

HIPOTESIS

H^0 : IFI = DOT-ELISA (El porcentaje de seropositividad entre las dos técnicas son iguales)

H_A : IFI = DOT-ELISA (El porcentaje de seropositividad entre las dos técnicas son diferentes)

DATOS

$$P_{IFI} = 41/283 = 0.1449$$

$$P_{DOT-ELISA} = 47/283 = 0.1661$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

$$Z = \frac{(P_{DOT-ELISA} - P_{IFI})}{\sqrt{p \cdot q \cdot (1/n_1 + 1/n_2)}} - \Delta_0$$

$$Z = \frac{(0.1660 - 0.1448) - 0}{(0.1569)(0.8438)(1/41 + 1/47)} = 0.2726491$$

$$Z_{cal.} = 0.2726491$$

$$Z = 1.96$$

SE ACEPTA H^0

NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN EL PORCENTAJE DE

SEROPOSITIVIDAD, EN CUANTO A LAS DOS TÉCNICAS A

UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95 %

DETECCION DE ANTICUERPOS Ig G CONTRA Toxoplasma gondii POR LA
TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN UNA POBLACION

S A N A

RECIPROCO DEL TITULO CODIFICADO	LOGARITMO DEL TITULO CODIFICADO	FRECUENCIA MUESTRAL DE POSITIVIDAD	XI	XI - X	(XI - X) ²
1: 2	0.3010	2	0.6020	- 1.2775	1.6320
1: 4	0.6021	2	1.2042	- 0.6753	0.4560
1: 8	0.9031	3	2.7093	0.8296	0.6886
1: 16	1.2041	8	9.6328	7.7533	60.1137
1: 32	1.5051	6	9.0306	7.1511	51.1362
1: 64	1.8062	4	7.2248	5.3453	28.5722
1: 128	2.1072	4	8.4286	6.5493	42.8933
1: 256	2.4082	3	7.2246	5.3451	28.5701
1: 512	2.7093	2	5.4186	3.5391	12.5252
1: 1024	3.0103	2	6.0206	4.1411	17.1407
1: 2048	3.3113	1	3.3116	1.4316	2.0501
1: 4096	3.6124	1	3.6124	1.7329	3.0029
1: 8192	3.9134	1	3.9134	2.0339	4.1367
1: 16284	4.2118	1	4.2110	2.3329	5.4396
1: 32768	4.5154	1	4.5154	2.6359	6.9480
TOTAL: 41			77.0606		265.3153

MEDIAS DE TENDENCIA CENTRAL

$$\text{Media: } \bar{X} = \frac{\sum Xi}{n} = \frac{770.06}{41} = 1.8795$$

$$\text{VARIANCIA: } S^2 = \frac{\sum (Xi - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{265.3153}{40} = 6.6329$$

$$\text{DESVIACION ESTANDAR: } S = \sqrt{\frac{\sum (Xi - \bar{X})^2}{n-1}} = 2.5754$$

$$\text{Titulación antilog (1.8795)(0.3010) =}$$

$$\text{Media = antilog (0.5651) = 3.6790}$$

GEOMETRICA

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DETECCION DE ANTICUERPOS Ig G CONTRA *Toxoplasma gondii* POR LA

MICROTECNICA INMUNODIFUSION EN MANCHA (DOT - ELLISA) EN UNA

POBLACION SANA.

RECÍPROCO DEL TÍTULO CODIFICADO	LOGARITMO DEL TÍTULO CODIFICADO	FRECUENCIA NUESTRAL DE POSITIVIDAD	X _i	X _i - \bar{X}	(X _i - \bar{X}) ²
1: 2	0,3010	3	0,6030	- 0,8321	0,7041
1: 4	0,6021	3	1,8063	0,0642	0,0041
1: 8	0,9031	4	3,6124	1,8703	3,4980
1: 16	1,2041	10	12,0410	10,2987	106,0632
1: 32	1,5051	6	9,0306	7,2886	53,1222
1: 64	1,8062	5	9,0310	7,2989	53,1281
1: 128	2,1072	4	8,4288	6,6867	44,7120
1: 256	2,4082	3	7,2246	5,4825	30,0578
1: 512	2,7093	2	5,4186	3,6765	13,5167
1: 1024	3,0103	2	6,0206	4,2785	18,3096
1: 2048	3,3113	2	6,6226	4,8805	23,8193
1: 4096	3,6124	1	3,6124	1,8703	3,4980
1: 8192	3,9134	1	3,9134	2,1713	4,7145
1: 16384	4,2118	1	4,2118	2,4697	6,0984
1: 32768	4,5154	0	0,0000	- 1,7421	3,0349

TOTAL: 47 81,8771 364,2779

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL

$$\text{Media} : \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} = \frac{81,8771}{47} = 1,7421$$

$$\text{VARIANZA} : S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{364,2779}{46} = 7,9191$$

$$\text{DESVIACION ESTANDAR} : S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 2,8141$$

Titulación antilog(1,7421) (0,3010) =
 Media : = antilog (0,3249) = 3,3480
 GEOMETRICA

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA RAZON DE LAS VARIANCIAS DE DOS
POBLACIONES CON DISTRIBUCION NORMAL;

Información :

TECNICA DE IFI TECNICA DOT-ELISA

$n_1 = 41$ $n_2 = 47$

$S_1^2 = 6,463$ $S_2^2 = 7,19$

Grados de Libertad del numerador = 40

Grados de Libertad del denominador = 46

Intervalo de confianza $\alpha = 0,05$, para la razon de las varian-
cias de las dos poblaciones con distribución normal;

$F_{0,025} = 46/40 = 0,5319$

$F_{0,975} = 40/46 = 1,88$

$$\frac{S_1^2 / S_2^2}{F_{0,975}} = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} = \frac{S_1^2 / S_2^2}{F_{0,025}}$$

$$\frac{0,8392}{1,88} = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} = \frac{0,8392}{0,5319}$$

$$0,4464 = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} = 1,5777$$

A este intervalo se le dan las interpretaciones probabilísticas
y prácticas apropiadas;

Tabla J (Continuación).

Grados de libertad del nominador	Grados de libertad del numerador									
	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	968.6	976.7	984.9	993.1	997.2	1001	1006	1010	1014	1018
2	39.40	39.41	39.43	39.45	39.46	39.47	39.48	39.49	39.49	39.50
3	14.42	14.34	14.25	14.17	14.12	14.08	14.04	13.99	13.95	13.90
4	8.84	8.75	8.66	8.56	8.51	8.46	8.41	8.36	8.31	8.26
5	6.62	6.52	6.43	6.33	6.28	6.23	6.18	6.12	6.07	6.02
6	5.46	5.37	5.27	5.17	5.12	5.07	5.01	4.96	4.90	4.85
7	4.76	4.67	4.57	4.47	4.42	4.36	4.31	4.25	4.20	4.14
8	4.30	4.20	4.10	4.00	3.95	3.89	3.84	3.78	3.73	3.67
9	3.96	3.87	3.77	3.67	3.61	3.56	3.51	3.45	3.39	3.33
10	3.72	3.62	3.52	3.42	3.37	3.31	3.26	3.20	3.14	3.08
11	3.53	3.43	3.33	3.23	3.17	3.12	3.06	3.00	2.94	2.88
12	3.37	3.28	3.18	3.07	3.02	2.96	2.91	2.85	2.79	2.72
13	3.25	3.15	3.05	2.95	2.89	2.84	2.78	2.72	2.66	2.60
14	3.15	3.05	2.95	2.84	2.79	2.73	2.67	2.61	2.55	2.49
15	3.06	2.96	2.86	2.76	2.70	2.64	2.59	2.52	2.46	2.40
16	2.99	2.89	2.79	2.68	2.63	2.57	2.51	2.45	2.38	2.32
17	2.92	2.82	2.72	2.62	2.56	2.50	2.44	2.38	2.32	2.25
18	2.87	2.77	2.67	2.56	2.50	2.44	2.38	2.32	2.26	2.19
19	2.82	2.72	2.62	2.51	2.45	2.39	2.33	2.27	2.20	2.13
20	2.77	2.68	2.57	2.46	2.41	2.35	2.29	2.22	2.16	2.09
21	2.73	2.64	2.53	2.42	2.37	2.31	2.25	2.18	2.11	2.04
22	2.70	2.60	2.50	2.39	2.33	2.27	2.21	2.14	2.08	2.00
23	2.67	2.57	2.47	2.36	2.30	2.24	2.18	2.11	2.04	1.97
24	2.64	2.54	2.44	2.33	2.27	2.21	2.15	2.08	2.01	1.94
25	2.61	2.51	2.41	2.30	2.24	2.18	2.12	2.05	1.98	1.91
26	2.59	2.49	2.39	2.28	2.22	2.16	2.09	2.03	1.95	1.88
27	2.57	2.47	2.36	2.25	2.19	2.13	2.07	2.00	1.93	1.85
28	2.55	2.45	2.34	2.23	2.17	2.11	2.05	1.98	1.91	1.83
29	2.53	2.43	2.32	2.21	2.15	2.09	2.03	1.96	1.89	1.81
30	2.51	2.41	2.31	2.20	2.14	2.07	2.01	1.94	1.87	1.79
40	2.39	2.29	2.18	2.07	2.01	1.94	1.88	1.80	1.72	1.64
60	2.27	2.17	2.06	1.94	1.88	1.82	1.74	1.67	1.58	1.48
120	2.16	2.05	1.94	1.82	1.76	1.69	1.61	1.53	1.43	1.31
∞	2.05	1.94	1.83	1.71	1.64	1.57	1.48	1.39	1.27	1.00

Tabla J (Continuación).

Grados de libertad del denominador	Grados de libertad del numerador								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.21	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	2.91	2.85	2.80
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.58	2.47	2.39	2.32	2.27
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.45	2.35	2.28	2.22
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88

RAZON DE LAS VARIANCIAS DE DOS POBLACIONES:

1.- Datos :

Variancias muestrales fueron : $S_1^2 = 6463$; $S_2^2 = 749$

2.- Suposición :

Si de dos métodos de diagnóstico a la Toxoplasmosis, pueden dar los mismos resultados en promedio, es posible que los resultados obtenidos por medio de uno de los métodos sean más variables que los resultados del otro:

3.- Hipótesis :

$$H_0 : \sigma_1^2 \leq \sigma_2^2$$

$$H_A : \sigma_1^2 > \sigma_2^2$$

4.- Estadística de Prueba :

$$R_1 V_1 = S_1^2 / S_2^2$$

5.- Distribución de la Estadística de Prueba:

Cuando la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba — esta distribuida como F con n-1 y n-2 grados de libertad :

6.- Regla de Decisión :

Sea $\alpha = 0.05$. El valor crítico de F, encontrado es de 2.39 (ver tabla J Percentiles de la distribución F)

7.- Estadística de Prueba Calculada :

$$R_1 V_1 = 6463 / 749 = 0.8392$$

8.- Decisión Estadística: No puede rechazarse H_0 , ya que $0.8392 \leq 2.21$, es decir, la razón calculada, cae en la región de aceptación

9.- Conclusión

No puede concluirse que las dos variancias no sean iguales; Dado que, $R_1 V_1$ Calculada es de 0.8392, es menor que 1.96, el valor p, para esta prueba es mayor que 0.10.

METODO I X	METODO II Y	X^2	Y^2	XY
0.6020	0.9030	0.3624	0.8154	0.5436
1.2042	1.8063	1.4501	3.2627	2.1751
2.7093	3.6124	7.3403	13.0494	9.7871
9.6328	12.0410	92.7908	144.9857	115.9885
9.0306	9.0306	81.5517	81.5517	81.5517
7.2248	9.0310	52.1977	81.5590	65.2472
8.4288	8.4288	71.0447	71.0447	71.0447
7.2246	7.2246	52.1948	52.1948	52.1948
5.4186	5.4186	29.3612	29.3612	29.3612
6.0206	6.0206	36.2476	36.2476	36.2476
3.3116	6.6226	10.9667	43.8588	21.9314
3.6124	3.6124	13.0494	13.0494	13.0494
3.9134	3.9134	13.3147	13.3147	15.3147
4.2118	4.2118	17.7393	17.7393	17.7393
4.5154	0.0000	20.3888	0.0000	0.0000

T O T A L : 77.0606 81.8771 502.0002 602.0344 532.1764

$$r = \frac{N \sum XY_i - (\sum X_i)(\sum Y_i)}{\sqrt{N \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \sqrt{N \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2}}$$

$$r = \underline{\underline{0.8694}}$$

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acosta E., Finkelman J.; Algunos conocimientos recientes acerca de la toxoplasmosis; Sal. Publ. MEX., 1976; 18(2):403-7.
- 2.- Aluja A.S., Aguilar P.; Estudio sobre la frecuencia del coquito de Toxoplasma gondii en el gato doméstico del Distrito Federal; Gac. Med., 1977;113(10):455-66.
- 3.- Araujo G.F., Remington S.J.; Partially purified antigen preparation of Toxoplasma gondii protect against lethal infection in mice; Infect. Immun., 1984; 45(1):122-26.
- 4.- Ayala M. F. Henríquez G. A. Villanueva M. V. Estrada G.F. Prevalencia de infección por toxoplasma en escolares, 1979; Bol. Of. Sanit. Panam., 86(4):306-10.
- 5.- Balsari A., Poli G., Molina V., Davis M., Petruzzelli., Boniolo A., Roller E.; ELISA for toxoplasma antibody detection; A comparison with other serodiagnostic tests; J. Clin. Pathol., 1980;33:60-3.
- 6.- Baruzzi R. G.; Contribution to the study of toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the Indians of the Upper Xingu River, Central Brazil; Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1970;12 (2):93-104.
- 7.- Beach G.P.; Prevalence of antibodies to Toxoplasma gondii in pregnant women in Oregon; Infect. Dis., 1980; 140(5):780-3.
- 8.- Behbehani K., Al-Karzi T.; Epidemiology of toxoplasmosis in Kuwait I. Detection of antibodies to Toxoplasma gondii and percentage distribution among the inhabitants. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980;74(2):209-12.
- 9.- Biaggi F. F.; Citirreacciones con toxoplasmina en Tampico; Rev. Med. Hosp. Gral., 1951; 14(4):191-5.
- 10.- Biaggi F.F.; Prevención de la toxoplasmosis neonatal; Prensa Med. Hosp. Gral., 1971; 36:112-4.
- 11.- Biaggi F.F., Islas P.M., González C.; Frecuencia de la toxoplasmosis en relación al parto. Gac. Med. MEX., 1974; 108(2):127-30.
- 12.- Bonfante R., De Alvarez M. N., De Onzola H.N., De Crespo R.L. Cabarcas B.R., De Peñalzo C.S.; Toxoplasmosis en pacientes de 14 estados de Venezuela; Bol. Of. Sanit. Panam., 1984; 96(6):502-10.

- 13.- Boetros M. BA., Jamison W.P.; A *Toxoplasma* Indirect Fluorescent Antibody (IFA) an Indirect Hemagglutination (IHA) serological survey among Hospital patients in tanta. U.A.R.: Trans. R. Soc. Med. Hyg., 1969;72(2):62-63.
- 14.- Brown W. H.; Parasitología Clínica; 4a. Edición; Ed. Interamericana, 1984; 63-6.
- 15.- Caceres A., Ponce L.A., Fletes C.L., Ortiz S.; Coriorretinitis Tocoplasmica. Algunos datos para su estudio; Rev. Lat-Amér. Microb. 1979;21(4):219-24.
- 16.- Calderón J. E.; Respuesta Inmune a la Toxoplasmosis; Bol. Med. Hoep. Infant. Méx., 1986; 43(10):656-61.
- 17.- Calderón J.E., León D.G.; Interpretación de las pruebas inmunoserológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis; Infectología, 1985; 5(10):258-64.
- 18.- Cantella R., Colichon A., López L., Wu C., Golfradb A., Cuadra E., La Torre C., Kanashiro R., DELgado M., Piscoya A.; Toxoplasmosis in Perú. Geographic prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in Perú studied by Indirect Fluorescent Antibody Technique; Trop. Geogr. Med., 1974; 26:204-9.
- 19.- Carlier Y., Bout D., Dessaint P.J., Capron A., Van Knapen F., Ruttenberg I.E., Bergquist R., Hult G. Evaluation of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and other serological test for the diagnosis of toxoplasmosis; Bull. WHO. 1980; 58(1):99-105.
- 20.- Carrad B.T.; La Toxoplasmosis problema de Salud Pública, avances y Perspectivas; Bol. Med. Hoep. Infant. Méx., 1980 40(7):353-62.
- 21.- Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos (Traducción); Nueva Clasificación de los Protozoarios. U.N.A.M., Fac. de Ciencias, Lab. de Protozoología., 1982.
- 22.- Coons A.H., Kaplan M. H.; Localization of antigen in tissue Cells II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of Fluorescent Antibody; J. Exp. Med., 1950; 91:1-13.
- 23.- Coutinho S.G., Garcia A.P., Assum. R.M., Albano N. Detection of Newborn infants at rest for congenital toxoplasmosis in Rio de Janeiro. Rev. Inst. Med.Trop. Sao Paulo 1983; 5(1):25-30.
- 24.- Coutinho S.G., Morgado A., Wagner M., Lobo R., Suttmoller F.; Outbreak of human toxoplasmosis study' Mem. Inst. Eswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1982; 77(1):29-36

- 25.- Coutinho S.G., Souza W.J.S., Camillo- Coura L. ,. Marzochi M.C.A., Amendoera M.R.; Levantamiento de doe resultados das reacibes de Inmunofluorescencia Indirecta para toxoplasmae no Rio de Janeiro Realizadas durante os anos de 1971 a 1977; Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1981; 23(2):48-56.
- 26.- Chinchilla M., Guerrero O. M., Solano E.; Acción de los macrófagos de la rata blanca contra *Toxoplasma gondii* "in vitro"; Rev. Lat- Amer- Microbiol. 1981; 23(4):239-43.
- 27.- D'angelo J.L., Ishizuka M.M.; Toxoplasmosis Suina III. Avaluacao de prevalencia de infeccao toxoplasmica em rebanhos suinos pela prova de Inmunofluorescencia Indirecta e Hemaglutinacao; Bol. Of. Sanit. Panam. 1985; 100(6):634-45.
- 28.- Delgado G.G; Bibliografia Cubana sobre Toxoplasmosis I. (1913-1958); Rev. Cub. Med. Trop. 1982; 34(2):219-26.
- 29.- Delgado G.G.; Bibliografia Cubana sobre Toxoplasmosis II. (1959-1970); Rev. Cub. Med. Trop. 1982; 34(2):151-9.
- 30.- Delgado G.G. Reactividad a la Prueba Intradérmica con toxoplasmina en pacientes con Esquizofrénicos; Rev. Cub. Med. Trop. 1997; 31(3):225-31.
- 31.- Delgado G.G.; Reactividad a la prueba intradérmica con toxoplasmina con pacientes Neuróticos y Psicóticos Maniacos Depresivos; Rev. Cub. Med. Trop., 1980; 32(1):35-9.
- 32.- Delgado G.G.; Toxoplasmosis y enfermedades mentales; Rev. Cub. Med. Trop., 1979; 31(2):127-31.
- 33.- Desmopt G. Foredtier F., Thylliez O. H., Daffos F., Capella-Pavlovsky N., Chartier M.; Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Lancet, 1965; 1(8427):500-4.
- 34.- Diaz, O.J.L. y Vaca, M.M.A.; Evolucion y Epidemiologia de la Toxoplasmosis. Infectologia. 6:146-152, 1985.
- 35.- Dubey J. P., Sharma S. P., Juranik D., Szykzer A. J., Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from and outbreak of toxoplasmosis in Atlanta, Georgia; Am. J. Vet. Rev., 1981; 42(6):1007-10.
- 36.- Feldman, H. A.; Toxoplasmosis: an overview. Bull N. Y. Acad. Med. 50:110-127, 1974 (citado por Carrada, 1983).
- 37.- Feldman, H. A.; The relation ship of toxoplasma antibody activator to the serum-properdin system. Ann. N.Y. Acad. Sci. 66:263-267, 1956 (citado por Calderon y cols 1985).

- 38.- Frenkel, J. K.; Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* 98:1309-1319, 1967. (citado por Isita y cols 1984)
- 39.- Frenkel, J. K.; Dubey J. P. y Miller, N. I. Toxoplasma gondii fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 1970; 167:893
- 40.- Feldman H.A.; Epidemiology of toxoplasma infections; *Epidemiol Rev.* 1982;4:204-13.
- 41.- Fernandez T. M., Silbaja C. M. T., Granier M. A. R.; Encuesta Seroepidemiológica de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en 125 mujeres embarazadas al oriente del Estado de Tabasco; *Bol. Med. Hosp. Inf. Méx.*, 1986;43(5):274-8.
- 42.- Ferraroni J.J., Lacaz S. C.; Prevalencia de anticorpos contra os agentes causadores da Hepatitis, Malaria, Sífilis e Toxoplasmose em cinco populações humanas distintas da Amazonia Brasileira; *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1982; 24*3:(155-61.
- 43.- Ferraroni J.J., Marzochi A. N. C.; Prevalencia da infecção pelo Toxoplasma gondii em animais domésticos, silvestres e grupos humanos da Amazonia; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1980; 75(1-2):99-109.
- 44.- Fiuzyman M., Coutinho S.G.; Estudio da reproductibilidade da reação de Imunofluorescência Indirecta para a pesquisa de anticorpos séricos para Toxoplasma gondii, utilizando-se quatro cepas diferentes do parasito como antígeno; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1980; 75(1-20):89-97.
- 45.- Fleck D. G.; Toxoplasmosis; *Arch. of Dis. in Childhood*. 1981;-56:494-5.
- 46.- Fletcher S.; Indirect Fluorescent Antibody technique in the serology of T. gondii; *J. Clin. Path.*, 1965; 18:193-9.
- 47.- Franco L. F., Sulzer J. A., Higby W. R., Peraita M. J.; Immunoglobulin N. Polar staining of T. gondii in the Indirect Immunofluorescent test; *J. Clin. Microbiol.*, 1980; 12(6):780-4.
- 48.- Frenkel K. J.; La inmunidad en la Toxoplasmosis; *Bol. Of Sanit. Panam.*, 1986; 100(3):283-98.
- 49.- Frenkel K. J.; Ruiz A.; Toxoplasmosis en Hammond D. H., Long P.; The toxoplasma and related genera; 1a. Ed.; Baltimore, University Park Press, 1973; 284-300.
- 50.- Frenkel K. J., Ruiz A.; Endemicity of toxoplasmosis in Costa Rica; *Am. J. Epidemiol.* 1981; 113(3):259-69.
- 51.- Frenkel K. J., Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980; 29(6):1167-80.

- 52.- Fulton J.D., Voller A.; Evaluation of Immunofluorescent and Direct Agglutination methods for detection of Specific toxoplasma antibodies; Br. Med. J., 1964; 2:1173-5.
- 53.- Ganley J. P., Comstock G. W.; Association of cats and toxoplasmosis; Am. J. Epidemiol., 1980; 11(2):238-46
- 54.- Garcia R. J., Alvarez Ch. R.; Diagnóstico de toxoplasmosis por medio del laboratorio; Infectologia, 1983; 12:615-18
- 55.- Garcia Z., Ruppanner., Behymer D.; toxoplasma gondii antibodies in California swine; J. Am. Vet. Med. Assoc., 1977; 171(6):610-612.
- 56.- Ghorbani M., Eirissian Gh.H., Afshar A.; Serological survey of human toxoplasmosis in mountainous regions of the north west and south west parts of Iran (1976-1977); Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1981; 75(1):38-40.
- 57.- Gibson L. C.; Distribution of Toxoplasma antibodies in comparable urban and rural groups; Publ. Meth. Rpts., 1956; 71(11): 1119-23.
- 58.- Gibson L. C.; Colema N.; The prevalence of toxoplasma antibodies in Guatemala and Costa Rica; Am. J. Trop. Med., 1958; 7:334-8.
- 59.- Gibson L. C., Eyes D. E.; Toxoplasma infections in animals associated with a case of human congenital toxoplasmosis; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1957; 6:990-1000.
- 60.- Goldman M.; Staining T.gondii with Fluorescein-Labeled antibody I. The reaction in smears of peritoneal exudate; J. Exp. Med., 1957; 105:549-56.
- 61.- Goldman M.; Staining Toxoplasma gondii with Fluorescein-Labeled antibody II. A new serologic test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining; J. Exp. Med., 1957; 105:577-73.
- 62.- Golubjatnikov R., Filloy, Olmos P.; Encuesta serológica para determinar anticuerpos contra algunas infecciones por virus, Mycoplasma, Streptococcus Beta Hemolitico A, y T. gondii, realizada en niños de un municipio del Edo. de México; Bol. Med. Hosp. Infant. de México; Bol. Med. Hosp. Infan. Méx. 1977; 34(4):787-96.
- 63.- Gomes A. U., Tervel R.J., Ferrioli F.F., Nogueira L. J.; Estudio comparativo das frequencias de infeccao por Toxoplasma gondii nas zonas urbana e rural; Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1875; 17(6):355-60.
- 64.- Gonzalez O. E., Lopez A. C., Cordovi P. R., Aguilera E.A.E.; Toxoplasmosis: Consideraciones Diagnósticas, Resultados de algunos estudios; Rev. Cub. Med. Trop..., 1980; 32(2):157-64.

- 65.- Guhl F., Gonzalez A. C., Marinkelle C. J., Sánchez N.: Estudio comparativo entre las pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta y ELLISA (Enzime - Linked Immunosorbent Assay) para Toxoplasmosis en 877 sueros; Rev. Lat-Amer. Microbiol., 1981;23(4):235-8.
- 66.- Gutierrez B. E., Manzano J., Biagi F. F.: Encuesta sobre Toxoplasmosis en un grupo de débiles mentales; Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. (Méx.),1954; 14(4):197-200.
- 67.- Hall M. S.: The diagnosis of toxoplasmosis; Br. Med. J., 1984; 289(6445):570-1.
- 68.- Handman E., Goding J. W., Remington J. S.: Detection and characterization of membrana antigens of Toxoplasma gondii; J. Immunol., 1980; 124(6):2578-83.
- 69.- Hays van Druten; Frans van Knapen; and Albert Rentjes; Epidemiologic Implication of limited- Duration Seropositivity after Toxoplasma Infection. AM. Jur. of Epidem. 1990; 132(1):169-180.
- 70.- Hay J., Hutchison W.M., Jackson M. H., Siim Ch. J. Prevalence of Toxoplasma infection in a wild rodent population from Central Scotland; Ann. Trop. Med. Parasitol., 1983; 77(6):653-4.
- 71.- Henderson B. J., Beattie P. C., Hale G. E., Wright T.: The evaluation of new services possibilities form preventing congenital toxoplasmosis; Int. J. Epidem., 1984; 13(1):65-72.
- 72.- Hentsch D.: Toxoplasmosis; 1a. Ed.; Hans Huber Publisher Bern Stuttgart Vienna; Switzerland; 1971.
- 73.- Hirt Juan.: Toxoplasmosis; 2a. Ed.; Editorial Buenos Aires, Libreria el Ateneo 1976.
- 74.- Huffman E. M., Kirk J.H., Winward L., Gordham J. R.: Relationship of neonatal mortality in lambs to serologic status of the ewe for T. gondii; J. Am. Vet. Med. Assoc., 1981; 178(7):679-82.
- 75.- Informe Oficial del Simposium de 1967; Toxoplasmosis; Rev. Med. Méx., 1968; 48(1037):264-7.
- 76.- Isita S. L., Sosa M. R.; Respuesta Inmune en la Toxoplasmosis; Infectologia., 1984; 4(2):37-40.
- 77.- Jakob H.R.M., Dunsmore J. D.; Epidemiological aspects of toxoplasmosis in Sother Western Australia; Aust. Vet. J., 1983; 60(7):217-8.
- 78.- Jamba L.M.F., Guimarães E. C.; Converssao sorológica para toxoplasmoese em crianacas de um Centro de Saude de Sao Paulo; Rev. Inst. Med. Trop. Sai Paulo, 1981; 23(3):133-7.

- 79.- Jhonson A.M., McDonald P. J., Mech. S.H.; Molecular weight analysis of soluble antigens from Toxoplasma gondii; J. Parasitol., 1983;69(3):459-64.
- 80.- Jones E. F., Eyles D.E., Gibson L.C.; The prevalence of toxoplasmosis in the domestic cat; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1959; 6:620-6.
- 81.- Kelen E. A., Aylo-Leindl L., Labzoffsky A. N.; Indirect Fluorescent Antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis; Can. J. Microbiol., 1962; 8:545-54.
- 82.- Kirchner E., Cotrim J.; Immunological response to toxoplasmosis in population groups of the state of Sao Paulo, Brazil, As Evaluated by the distribution of serum titers in the Dye-Test; Rev. Med. Trop. Sao Paulo, 1972; 14(1):33-50.
- 83.- Khalid F. Tarbara; Toxoplasmosis, WHO Clinical Ophthalmology. Hospital de Nuestra Señora de la Luz, 1990; VI(46):1-23.
- 84.- Knaper F., Panggabean S. O.; Detection of circulating antigen during acute infections with Toxoplasma gondii by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; J. Clin. Microbiol., 1977; 6(6):545-547.
- 85.- Ko. R.C., Wong F.W., Todd D., Lam K. C.; Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in the Chinese population of Hong Kong; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980; 74(3):351-4.
- 86.- Lamb A. G., Feldman H.A.; A nation-wide serum survey of Brazilian military recruits, 1964 III. Toxoplasma Dye-Test Antibodies; Am.J. Epidemiol., 1968;87(2):323-8.
- 87.- Lanzarini I. E., Marioni F. H., Kawarabashi M., Guimaraes A.S., Hysakutake S.; Toxoplasmoze; Inquérito sorológico entre trabalhadores do municipio de Guarulhos Estado de Sao Paulo; Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1982; 24(1):56-9.
- 88.- Leser G. P., Camargo E.M., Baruzzi R.; Toxoplasmic test in Brazilian Indians (Krenakrore) of recent contact with civilized man; Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1977; 19(4):232-6.
- 89.- Levi C. G., Hyakutake S., Neto A.V., Correa M.O.A.; Presenca do Toxoplasma gondii na saliva de pacientes com toxoplasmoze. Eventual importancia dessa verificacao quanto a transmissao da doenca; Rev. Med. Trop. Sao Paulo, 1968; 10(1):54-8.
- 90.- Leyva C.A.; Toxoplasmosis; Resumen histórico, revisión bibliográfica; Rev. Cub. Med. Trop., 1979; 31(2):141-58.
- 91.- Lovelance J.K., Morales M.A.P., Hagerby E.; Toxoplasmosis among the Ticuta indians in the State of Amazonas, Brazil; Trop. Geogr. Med., 1977; 30:295-300.

- 92.- Machado J.O.L., Machado M.E.L., Pinho A.L., Silva S. Gomes R.; Estudo sobre a viabilidade da transmissao da toxoplasmose por via vaginal; Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1968; 10(6):371-375.
- 93.- Markell E.K., Voge M.; Parasitologia Medica; 3a. Ed.; Interamericana; México, 1973;113-16.
- 94.- Martinez B.M.; Manual de Parasitologia Médica; 2a. Ed. La Prensa Médica Mexicana; México, 1953;165-71.
- 95.- Montoya M.F., Ramirez E.L. Loeza H.A., Henao C.J. Murillo G.G.; Prevalencia de anticuerpos para Toxoplasma gondii en bovinos y porcinos; Bol. Of. Sanit. Panam., 1981; 91(3):219-27.
- 96.- Morales C.M.E., Cedillo R.R.; Dificultades en el Diagnostico y tratamiento de la toxoplasmosis; Bol. Med. Hosp. Infant. Méx., 1982; 39(5):361-6.
- 97.- Naot Y., Guptill R.D., Mullenax J., Remington J.S.; Characterization of Toxoplasma gondii antigens that react with human Immunoglobulin M and Immunoglobulin G antibodies; Infect. Immun., 1983; 41(1):331-8.
- 98.- Naot Y., Guptill R.D., Remington J.S.; Duration of Ig M antibodies to Toxoplasma gondii after acute acquired toxoplasmosis; J. Infect. Dis.. 1982; 145(5):770.
- 99.- Nasrallah R.E.; Toxoplasmosis como riesgo perinatal; Bol. Med. Hosp. Infant. Méx., 1986; 43(10):662-4.
- 100.- Neto A.V., Levi G.C. Ocorrencia simultanea de casos de toxoplasmose doenca entre moradores de um nucleo habitacional restrito da cidade de Sao Paulo; Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1970; 12(1):41-5.
- 101.- Okolo M.I.O.; Toxoplasmosis in animals and the public health aspects; Int. J. Zoon., 1985; 12:247-56.
- 102.- Palomino D.F., Soto, R., Villegas L.L.; Un caso de toxoplasmosis; Bol. Med. Hosp. Infant. Méx., 1950; 7(1):24-39.
- 103.- Pappas G.M., Ballou R.W., Gray R.M., Takafujite, Miller N.R., Hockmeyer T. W.; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1985; 34(2):346-54.
- 104.- Pappas G.M., Hajkowski R., Cannon T.L. Hockmeyer T.W.; Vet. parasitol., 1984; Dot-Enzyme-Linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) comparason with standar ELISA and complement fixation oassay s for diagnosis of human visceral leishmaniasis Vet. Parasitol 14:239-49.
- 105.- Pappas G. M., Hajkowski R., Hockmeyer T. W.; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1984; 33(6):1105-11.

- 106.- Pappas G.M., Hajowski R., Hockmeyer. 1983 DOT-Enzyme linked immunosorbent assay (DOT-ELISA): a microtechnique for the rapid diagnosis of Visceral Leishmaniasis J. Immun. Meth. 64:205-214.
- 107.- Peterson R.D., Coney K.N., Beasley P.R.; Prevalence of antibody to toxoplasma among Alaskan natives: relation to exposure to the Felidae; J. INFECT. DIS., 1974;130(6):557-63.
- 108.- Piekarski G.; Tratado de Parasitología; Ed. Aguilar; España, 1959;116-23.
- 109.- Price J. H.; Toxoplasma infection in an urban community; Br. J.1969; 4:141-3.
- 110.- Quintal A.R., Navarrete E.R.; Encuesta Serológica en una población del agro henequenero yucateco; Salud. Publ. Méx., 1975;17(3):365-9.
- 111.- Ramirez M.A.; Toxoplasmosis en Obstetricia (tesis); U.N.A.M. Fac. de Medicina., División de Estudios Superiores; México; 1978.
- 112.- Remington J.S., Efron B., Cavanaugh E., Simon H.J., Trejo A.; Studies on toxoplasmosis in el Salvador. prevalence and incidence of toxoplasmosis as measured by the Sabin-Feldman Dye-Test; Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1970; 64(2):252-67.
- 113.- Resano P. F., Pasco I.d., Zufiga T.V.; Encuesta Seroepidemiológica de anticuerpos anti-toxoplasma en la República Mexicana; Rev. Méx. Patol. Clin., 1985 32:8-20.
- 114.- Roch U. E.; Compendio de toxoplasmosis; 1a. Ed. Editorial Patria; Méx., 1971.
- 115.- Roch U. E.; Diagnóstico de la Toxoplasmosis; Gac. Med. Méx., 1963; 93(5):427-34.
- 116.- Roch U. E.; Toxoplasmosis congénita; Estudios realizados en México; Salud Púb. Méx. 1965; 7(4):509-12.
- 117.- Roever B. H., Lelyveld J., Marinkelle C.J.; Toxoplasmosis in Latin-American Countries; Trop. Geogr. Med., 1969; 21:451-5.
- 118.- Rohatgi N., Mithal S., Balaya S., Verma I.C.; A preliminary study on congenital toxoplasmosis in India; Indian J. Med. Rev., 1982; 76:174-8.
- 119.- Ruiz A., Frenkel J. K.; Intermediate and transport hosts of Toxoplasma gondii in Costa Rica; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980; 29(6):1161-6.

- 120.- Ruiz A., Frenkel J.K. Toxoplasma gondii in Costa Rica Cats; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980;29(6):1150-55.
- 121.- Saleha A.A.; Observations on some epidemiological aspects of toxoplasmosis in Malaysia; Int. J. Zoonosis, 1984; 11(1):75-83.
- 122.- Sanchez N. Marinkelle J.C., Guhl F.; El uso del antígeno mixto en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas y Toxoplasmosis con la Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta; Rev. Lat-Amér. Microbiol., 1983; 25:163-5.
- 123.- Schenone H., Schenone H. (hijo), Peña A.; Contreras M.C., Sandoval L., Saavedra T., Villarroel F., Rojas A., López M.I.; Prevalencia de la infección toxoplásmica en funcionarios de un matadero de Ciudad de Santiago, Chile; Bol. Chile. Parasitol., 1984; 39(1-2):33-4.
- 124.- Sekla L., Stackiw W., Rodgers S.; A serosurvey of toxoplasmosis in Manitoba.; Can. J. Publ. Hith., 1981; 72:111-17.
- 125.- Sikes R. K.; Toxoplasmosis; J. Am. Vet. Med. Assoc., 1982; 180(8):857-59.
- 126.- Silverman B., Varela G.; Toxoplasmosis, mental disease and LSD-25; Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop. (Méx.), 1958; 18(3-4):191-4.
- 127.- Sulzer J.A., Wilson M.; Toxoplasma gondii; Polar staining in Fluorescent Antibody test; Exp. Parasitol., 1971; 29:197-200.
- 128.- Van der Venn J., Polak M.F.; Prevalence of toxoplasma antibodies according to age with comments on the risk of prenatal infection; J. Hyg. (Lon.), 1980; 85(2):165-74.
- 129.- Varela G., Martínez R.A.E., Treviño A.; Toxoplasmosis en la República Mexicana; Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. (Méx.), 1963;13(3):218-24.
- 130.- Varela G., Roch E., Zavala J.; Estudios sobre Toxoplasmosis en México; Salud Publ. Méx., 1961;3(3):451-4.
- 131.- Velasco R., Varela G.; Toxotoxina (Toxina del Toxoplasma gondii); Rev. Salud Publ. Méx., 1965; 7(4):513-7.
- 132.- Vijayamma T., Sinniah B., Yap P.L.; Prevalence of antibodies including Ig M to Toxoplasma gondii in Malaysians; Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Hith., 1980; 11(1):119-25.
- 133.- Villegas G.J., Portilla A.J., Fastag S.A.; Aspectos anatómicos de la toxoplasmosis: A propósito de 52 casos; Gac. Med. Méx., 1977; 113(10):461-6.

- 134.- Violand S.A., Mitchell T.G., Kleeman K.T.; Comparison of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Quantitative Indirect Fluorescent Antibody Test with the conventional Indirect Fluorescent Antibody Test for detecting antibodies to Toxoplasma gondii; J. Clin. Microbiol., 1982; 16(2):341-4.
- 135.- Wallace D.G.; Serologic and Epidemiologic observations on toxoplasmosis on three pacific Atolls; Am. J. Epidemiol., 1969;90(2):111-113.
- 136.- Wallace D.G.; The prevalence of toxoplasmosis on pacific islands, and the influence of ethnic group; Am. J. Trop. Med. Hyg. , 1976; 25(1):49-53.
- 137.- Walls W.K., Bullock L.S., English K.D.; Use of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis; J. Clin. Microbiol., 1977; 5(3):273-7.
- 138.- Walton B.C. Benchoff B.M., Brooks W.H.; Comparison of the Indirect Fluorescent Antibody test and Methylene Blue Dye-Test for detection of antibodies to Toxoplasma gondii; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966;15(2):149-200.
- 139.- Walton B.C., De arjona I., Benchoff B.M.; Relationship of toxoplasma antibodies to altitude; Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966;15(4):492-5.
- 140.- Werner A.P.T.; Toxoplasmosis I. Generalidades; Rev. Med. Chile., 1975;103:557-62.
- 141.- Werner H., Janitschke K.; Fases evolutivas, ciclo evolutivo y posición sistemática de Toxoplasma gondii; Bol Chil. Parasitol., 1970;25:57-64.
- 142.- Wilson B.C., Haas E.J.; Cellular defenses against Toxoplasma gondii in Newborns; J. Clin. Invest., 1984; 73(6):1606-16.
- 143.- Wilson B.C., Remington S.J.; Activity of Human blood leukocytes against Toxoplasma gondii; J. Infect. Dis., 1979; 140(6):890-5.
- 144.- Zardi O. Adorasio E., Horare O., Nuti M.; Serological survey of toxoplasmosis in Somalia; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980;74(5):577-81.