

37  
2ej.



**Universidad Nacional Autónoma de México**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

CORRELACION SEROLOGICA ENTRE EL METODO  
DE FIJACION DE COMPLEMENTO  
E INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA EN  
EL DIAGNOSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
JAVIER RAMIREZ VILLANUEVA



MEXICO. D. F.

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

CORRELACION SEROLOGICA ENTRE EL METODO DE FIJACION DE COMPLEMENTO  
E INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA EN EL DIAGNOSTICO DE LA  
TOXOPLASMOSIS.

# INDICE

## CAPITULO I : INTRODUCCION

a) Antecedentes historicos de la toxoplasmosis.....	1
b) Distribución.....	2
c) Características morfológicas.....	3
d) Ciclo reproductivo.....	4
e) Características clínicas.....	6
f) Toxoplasmosis y otras patologías.....	7
g) Epidemiología.....	12
h) Tratamiento.....	14

## CAPITULO II: ASPECTOS SEROLOGICOS.

a) Respuesta inmune a la toxoplasmosis.....	19
b) Tecnicas de diagnóstico para la toxoplasmosis.....	25
c) Planteamiento y fundamentación del problema.....	35
d) Objetivos e hipótesis.....	37

## CAPITULO III: MATERIAL Y METODOS.

a) Material.....	39
b) Manejo de la cepa de toxoplasma gondii.....	41
c) Métodos.....	43
d) Técnica de fijación del complemento.....	53
e) Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.....	56

## CAPITULO IV: RESULTADOS

a) Resultados por fijación de complemento e Inmunofluorescencia Indirecta.....	61
b) Tablas de resultados.....	66
c) Coeficiente de correlación de Pearson.....	70
d) Analisis de regresión.....	71

## CAPITULO V: ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

a) Analisis e interpretación de resultados.....	73
b) Conclusiones.....	79

APENDICE DE SOLUCIONES.

BIBLIOGRAFIA.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

### ANTECEDENTES HISTORICOS:

El género Toxoplasma fué establecido por Nicolle y Manceaux en 1909 (1,2,3) para un organismo que descubrieron en un pequeño roedor denominado Gondii (Ctenodactylus gundi); en el norte de Africa. Dieron al microorganismo encontrado el nombre de Toxoplasma gondii. En 1939, Cowen y Paige(4) demostraron que el Toxoplasma provocaba en el hombre neuroinfecciones, ya que el microorganismo fue aislado de lactantes con encefalomiелitis congénita; Sabin fue el primero en señalar que la Toxoplasmosis congénita se manifiesta a menudo por un síndrome consistente en coriorretinitis, calcificaciones cerebrales, retraso psicomotor, hidrocefalia o microcefalia y convulsiones (4).

El origen etimológico de Toxoplasma viene del griego toxon que significa arco. La clasificación moderna coloca al Toxoplasma en la familia Eimeridae y del orden Coccidia(2). Experimentos hechos por Frenkel y colaboradores en 1970 y por Hutchinson y colaboradores en el mismo año sugirieron que Toxoplasma pertenece a la subclase Coccidia muy relacionada con el género Isospora. Finalmente la clase Toxoplasma fué puesta en el subphylum Sporozoa por el comité de Taxonomía y problemas taxonomicos de la sociedad de Protozoólogos en 1964 (3).

La clasificación para Toxoplasma queda como sigue: Phylum: Sporozoa; Clase: Toxoplasmea; Orden: Coccidia; Familia: Eimeridae; Genero: Toxoplasma; Especie: Toxoplasma gondii. En general se han descrito muchas especies, pero la mayoría de los parásitólogos sólo aceptan a Toxoplasma gondii debido a que todas las "especies" son morfológicamente iguales y específicas en sus reacciones inmunológicas (4).

**DISTRIBUCION:** Se ha reconocido que el Toxoplasma tiene una distribución mundial, presentandose con mayor frecuencia en regiones conocidas como trópico húmedo, aunque también influyen factores como estilo de vida, especialmente los que mantienen animales caseros (1,5,6,7); nivel socioeconómico y cultural. En general se acepta que existen anticuerpos antitoxoplasma en 30 a 50% de la población mundial. Se ha calculado que anualmente de 0.3 a 1% de la población susceptible se infecta con Toxoplasma lo que implica la existencia de 200,000 a 700,000 casos nuevos por año en México (8); aunque la mayoría de los infectados tienen un curso clínico asintomático o no característico lo que impide el diagnóstico preciso.

La distribución de la toxoplasmosis como se dijo anteriormente depende del área geográfica, por ejemplo hay extremos como Austria y Finlandia con cifras no mayores del 8% o bien Francia y El Salvador cercanos al 90% en EUA en general se han reportado infecciones entre 20 a 70% dependiendo del área del país (1,6,8,9); En México los estudios indican cifras intermedias de 30 a 40% (ver cuadro 1).

CUADRO No. 1

FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA TOXOPLASMA GONDII  
EN NIÑOS Y ADULTOS.

ORIGEN	REFERENCIA	AÑO	6/12 a	30/40 a %
Paris	Couvrer	1962	33	87
Tahiti	Feldman	1956	45	77
Inglaterra	Fleck	1963	8	25
Finlandia	Harboe	1952	7	35
Austria	Thalhammer	1960	7	62
Nueva Orleans	Feldman	1956	21	42
CA. Sur (USA)	Kessel	1965	10	27
Pittsburg	Feldman	1956	8	45
El Salvador	Remington	1970	40	93
México	Roch	1966	15	26
México	Resano	1976	20	52
Población global				
Paris	Koskiniemi	1975	84	
Oslo	Koskiniemi	1980	12.5	
New York	Koskiniemi	1980	22-32	
Londres	Koskiniemi	1980	20-30	
Finlandia	Koskiniemi	1980	25	
Tabasco	Fernandez T.M.	1988	60	

- Referencias 7,9.

**CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS:** El parásito es intracelular obligado, es un organismo ovoideo, piriforme o semilunar y mide de cuatro a seis micras de longitud por tres micras de diametro (3) figura 1; cuando sale de la célula huésped tiene una forma arqueada, al microscopio óptico y con tinción de Giemsa o Wright se observa el citoplasma azul con una masa roja redondeada de cromatina, que es el núcleo, este se encuentra situado más cerca de uno de los extremos, y en el opuesto hay una masa pequeña teñida de rojo, que es el cuerpo paranuclear. Las preparaciones en húmedo y teñidas con hematoxilina se observa que el núcleo tiene una membrana y un cariosoma central. En las preparaciones en fresco aparece el Toxoplasma como un cuerpo hialino y se presenta aislado o en pares, por su morfología se asemeja algo a las Leishmanias. En los cultivos de tejidos de ríñon de mono, cada Toxoplasma que invade una célula adopta una fase de reposo, después de un periodo exponencial similar al de bacterias y virus.

Al Microscopio Electrónico se observan diversos organelos; las fotografías revelan una membrana y un conglomerado de material intensamente teñido, las inclusiones citoplasmáticas son interpretadas como sigue:

- a) Uno o varios bastoncitos curvos o mitocondrias.
- b) Gránulos yuxtannucleares que se encuentran junto al núcleo.
- c) El conoide que es una masa fusiforme en el extremo puntiagudo del citoplasma.
- d) Los Toxonemas haces de corpúsculos alargados, con el extremo libre y grueso que se adelgaza al aproximarse al conoide (ver

figura 1

Toxoplasma gondii

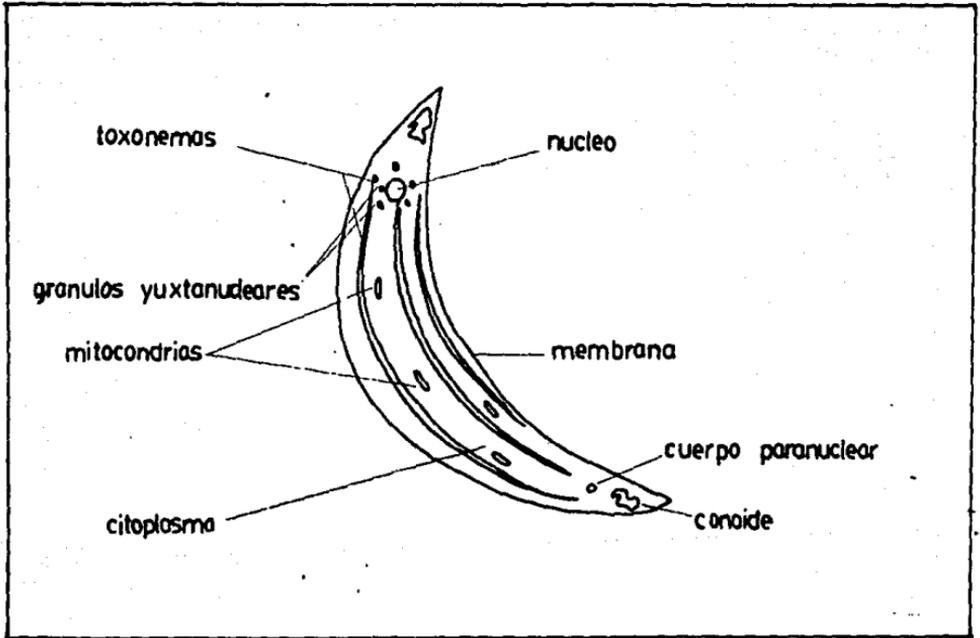


figura 1).

Este parásito se reproduce por fisión binaria longitudinal; primero se divide el núcleo y después lo hace el citoplasma. En ocasiones parece que hay esquizogonia pero lo que sucede es que se acumulan grandes masas de microorganismos producidos por la división binaria longitudinal.

En las infecciones humanas, los organismos se encuentran en los frotis de los exudados y en los tejidos granulomatosos, ya sea aislados, o intracelulares en masa parecidos a los quistes. Cuando se observan en células mononucleares o endoteliales, colonias de los microorganismos casi llenan el citoplasma de las células y se asemejan a vacuolas incluidas en el citoplasma (3).

**CICLO REPRODUCTIVO:** La reproducción del Toxoplasma tiene lugar en el epitelio intestinal de los gatos mediante esquizogonias, lo que conduce a la formación de gametogonias. Considerando al hospedador humano, el parásito tiene tres distintas fases en su ciclo de vida y son el taquizoito, quiste tisular y el ooquiste. Los ooquistes son producidos en el epitelio gastrointestinal a nivel del íleo de los gatos siguiendo un ciclo reproductivo sexual. Después los ooquistes son eliminados durante dos o tres semanas en cantidades enormes en las heces de los gatos; estos ooquistes miden 12 por 9 micras, son ovales y están rodeados por una pequeña pared, son resistentes a una amplia variedad de agentes físicos y bioquímicos, no esporulan por debajo de 4

grados centígrados o arriba de 37 grados centígrados. El tiempo que llevan para esporular los ooquistes es de 1 a 5 días. Al madurar cada ooquiste contiene dos esporoquistes con cuatro esporozoitos en cada uno de ellos; los esporozoitos formados son infectivos para humanos y a un inmenso orden de animales salvajes y domésticos, bajo condiciones favorables estos pueden quedar infectivos por un año (9).

La infección por Toxoplasma gondii se inicia después que un huésped susceptible, ingiere ooquistes o quistes tisulares, entonces hay penetración de la mucosa gastrointestinal por esporozoitos y circulación de taquizoitos, los cuales pueden multiplicarse asexualmente en distintas células humanas, formando el parasitóforo de 16 a 32 organismos, lo que conduce a la muerte celular con diseminación sanguínea y linfática en otros órganos y tejidos. Coincidentemente con el desarrollo de inmunidad humoral y celular, se observa disminución en la proliferación de parásitos organizándose a bradizoito, el quiste tisular contendrá arriba de 3000 bradizoitos (9); la formación del quiste se da por acumulación de un polisacárido semejante al glucógeno dando origen a que el parasitóforo se altere a pseudoquiste o finalmente a quiste tisular. Los taquizoitos pueden quedar viables por horas en secreciones extracelulares tales como lágrimas, leche, saliva y fluido peritoneal. Estos son incapaces de sobrevivir a la desecación y descongelación o a jugos digestivos.

CUADRO 2

VIAS DE INFECCION DE LA TOXOPLASMOSIS

- NASAL
- ORAL
- MUCOSAS O SOLUCIONES DE CONTINUIDAD

Las formas reproductivas del Toxoplasma a lo largo del ciclo son: los taquizoitos, que se desarrollan rápidamente y son característicos de la infección aguda, desarrollándose en los pseudoquistes; las formas de lenta reproducción, características de las infecciones crónicas son los denominados bradizoitos, aparecen durante la fase intestinal o tisular del ciclo al igual que los taquizoitos, pero los bradizoitos se desarrollan dentro del quiste. la fase tisular es la única conocida en el humano. Las tres fases restantes que sólo se observan en el gato, son los merozoitos los cuales surgen de la esquizogonia, los gametos de la gametogonia, y los oocistos que maduran fuera del organismo por esporogonia.

El gato como los humanos y otros animales, también pueden tener formas extraintestinales o proliferativas (taquizoitos o bradizoitos) en sus tejidos. Los oocistos inmaduros desalojados por los gatos no son infectivos, la esporulación a temperatura ambiente (20 a 22 grados centígrados) tarda 1 a 4 días en completarse (1), y por lo menos puede permanecer en el suelo un año.

**CARACTERISTICAS CLINICAS:** Hay dos maneras de adquirir la infección que son de fuentes externas y por medio congénito; la infección diseminada puede ocurrir cuando un individuo, quien a adquirido previamente la infección en alguna época de la vida, muestra por diversas causas inmunosupresión fundamentalmente de la respuesta inmune celular, lo cual impide el control de la infección latente, siendo una oportunidad para la diseminación y

CUADRO 3

CARACTERISTICAS CLINICAS MAS FRECUENTES EN 32 NINOS CON TOXOPLASMOSIS CONGENITA.		
SIGNOS Y SINTOMAS	No.	%
- Sintomas neurológicos	25	78
- Coriorretinitis	18	56
- Hidrocefalia	9	28
- Hepatoesplenomegalia	6	19
- Triada Clasica	1	3
Hidrocefalia-Hepatoesplenomegalia-Calcificaciones		

AJDC- 143:724-1989.

progresión de la enfermedad. La Toxoplasmosis congénita puede presentarse cuando una mujer embarazada tiene infección activa. La infección por *Toxoplasma* es asintomática en adultos en 80 % a 90% de los casos (10); la mayoría de los casos se resuelven favorablemente, sin embargo la toxoplasmosis es una seria enfermedad en pacientes inmunocomprometidos y en pacientes con infección congénita; es así como la infección toxoplasmosa puede dejar secuelas graves como ceguera o retraso mental en niños.

En el caso de infección asintomática, los taquizoitos ocasionalmente invaden los pulmones, el hígado, el corazón, el cerebro y los ojos, en caso de diseminación causa serias lesiones en los órganos afectados; la sintomatología refiere comúnmente linfadenopatía y linfocitosis atípica, puede estar acompañada con fiebre, mialgias, diaforesis nocturna, faringitis, exantema maculopapular, hepatoesplenomegalia, ganglios linfáticos cervicales y retroauriculares inflamados. La enfermedad puede ser indistinguible de la mononucleosis infecciosa. la linfadenopatía puede persistir por meses mientras la linfocitosis atípica y la enfermedad febril son pasajeras (5).

**TOXOPLASMOSIS Y SIDA:** El problema de la Toxoplasmosis cobra mucha importancia, más aun con el ya creciente problema del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida; esta infección trae como consecuencia el aumento potencial de un número mayor de personas contaminadas con *Toxoplasma gondii*. En el pasado la encefalitis toxoplasmosa era una rara enfermedad aun en adultos inmunocomprometidos, actualmente se reconoce como la causa más

comun de infección encefalica en pacientes con S.I.D.A. (9).

Los pacientes inmunodeficientes representan un alto riesgo de reactivación de una infección latente como es la toxoplasmosis, es bien reconocida la elevada frecuencia y los efectos desastrosos de encefalitis toxoplasmosa en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida; aproximadamente del 30 al 40% de pacientes con este síndrome tienen anticuerpos positivos a Toxoplasma gondii (6,9), y la encefalitis por Toxoplasma es desarrollada por reactivación de la infección latente. Se ha reportado que cerca del 25 % de pacientes con SIDA en Berlín y París contraen encefalitis toxoplasmosa mientras que E.U. sólo del 5 a 10 % la contraen.

Son muchos los reportes que hablan de la relación de SIDA con la encefalitis toxoplasmosica, Margaret A. Fischl estudio el caso de un paciente con SIDA el cual tenía un absceso cerebral tuberculoso y además existía encefalitis toxoplasmósica, aunque reportó la posibilidad de otras infecciones secundarias en el sistema nervioso central como las debidas a Criptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, Cytomegalovirus y un papovavirus (11).

En un estudio reportado recientemente por Yasuiro Susuki, se observo diferencias en virulencia y desarrollo de encefalitis toxoplasmosica durante la infección cronica; se llevo a cabo el estudio utilizando dos diferentes cepas de Toxoplasma gondii que fueron la ME49 y la DAG, se observó que después de 30 semanas de haberse inoculado 10 quistes a cada raton con la cepa ME49 habian muerto el 64% de estos ratones, mientras que los inoculados con

la cepa DAG no murieron; el reporte final indicó que la patogenia de la encefalitis depende de la cepa del parásito y también contribuye al estado inmuológico del paciente, para el desarrollo de la crucial enfermedad (12).

**TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA:** La Toxoplasmosis congénita ocurre cuando el microorganismo infecta a mujeres embarazadas que pueden tener infección crónica o latente. El parásito atraviesa la barrera placentaria y después de un periodo lento el producto se infecta. El riesgo y la severidad de la infección en el producto depende de la época gestacional en la que se halla adquirido la infección, se ha observado que la incidencia es más alta cuando la infección se adquiere durante el primer trimestre de gestación (6).

**Morbimortalidad de la infección de toxoplasmosis congénita:** Desmonts reportó que la mortalidad que produce este parásito puede ser entre el 1 a 6%, mientras que los signos de prematuridad al nacimiento pueden ser de hasta un 32%, los cuales tienden a desarrollar la enfermedad de: 12% presentan severas alteraciones encefálicas y/o oculares, mientras que el 84% de los vivos e infectados padecen enfermedad subclínica, lo cual se llega a manifestar en las primeras doce semanas de vida (13).

Se ha reportado que en algunos casos de embarazos gemelares heterocigotos, primeramente la infección de Toxoplasma gondii es sobre una placenta; para posteriormente originar la infección en ese producto, si la infección de ese primer producto se demora de

4 a 6 semanas el otro producto puede escapar a la infección toxoplasmosa. Esto es debido a que se protege con el paso de anticuerpos de la madre y no se observan daños o son menos severos. Son muchos los casos reportados en los que se ha observado, que al nacimiento, existe daño severo en uno de los neonatos, mientras que en el otro no se observan malformaciones o son muy ligeras, pudiendo existir una infección subclínica (14).

Entre los datos clínicos más frecuentemente reportados se encuentran los siguientes: Primeramente en la madre se manifiesta más comúnmente linfadenopatía con nódulos cervicales de aproximadamente 3 a 10 semanas de duración, que puede estar acompañado con fiebre; mientras que en el neonato se puede incluir vasculitis periacuedectal y periventricular, necrosis, fiebre, erupción maculopapulosa, hepatoesplenomegalia, ictericia, microcefalia, microftalmia y convulsiones que se pueden presentar principalmente después de algunos meses hasta años de vida (ver cuadro 3); las manifestaciones mencionadas pueden venir juntas o presentarse solas (9,13,14 y 15). Los infantes sobrevivientes sufren de retardo mental u otros defectos neurológicos. La triada hidrocefalia, coriorretinitis y calcificaciones cerebrales son los signos más frecuentes de Toxoplasmosis congénita (ver cuadro 4), (9).

**TOXOPLASMOSIS OCULAR:** Un cuadro clínico también conocido y debido a Toxoplasma gondii es la Toxoplasmosis ocular. Este daño viene como resultado de la colonización del órgano de la visión, siendo consecutiva a una diseminación del parásito por mucosa

CUADRO 4

MANIFESTACIONES CLINICAS DE INFECCION CONGENITA
--

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Coriorretinitis</li><li>- Hidrocefalia</li><li>- Microcefalia</li><li>- Trastornos Psicomotores</li><li>- Calcificaciones cerebrales.</li></ul> |
|---|

faringea, intestinal, conjuntival o a través de heridas de piel. El parásito puede afectar varios órganos, entre los más frecuentes se encuentra el globo ocular; al dividirse el parásito en forma activa, ocasiona focos de necrosis y reacción inflamatoria localizada, con infiltración linfocitaria alrededor de las células infectadas. Posteriormente pueden presentarse periodos de latencia, en los que el parásito se rodea de una pared quística como respuesta al huésped, en estas ocasiones el parásito deja cicatrices perenes, las que según la localización, producen un déficit funcional de grado variable (16).

En estudios realizados por Francois J. (16) el considera que las lesiones patognómicas de toxoplasmosis ocular son las que tienen forma de roseta, con una zona central blanco grisácea, anillo pigmentado y una corona de celdillas claras alrededor, la que a su vez está circundada por un rodete negro. En un estudio realizado, se encontró mayor frecuencia en niños de edades comprendidas entre cinco a nueve años y en menor proporción menores de un año y de 10 a 14 años; en cuanto al sexo la frecuencia es mayor en el masculino, con una frecuencia del 63% y en el femenino fue de 36% (16).

**TOXOPLASMOSIS Y POLIMIOSITIS/DERMATOMIOSITIS:** Se ha observado en muchos estudios una relación existente entre toxoplasmosis y la polimiositis o dermatomiositis. Se piensa que la alta frecuencia de la toxoplasmosis ligada a polimiositis-dermatomiositis, pudiera ser consecuente a una terapia inmunosupresora para trasplante renal o cardíaco (17).

En un estudio se observó que los pacientes con enfermedad muscular son susceptibles de toxoplasmosis. Demostrándose que el 50 % de los pacientes con polimiositis o dermatomiositis tienen anticuerpos positivos a Toxoplasma gondii por la reacción de Sabin-Feldman y sólo el 24% lo presentan por inmunofluorescencia; estos porcentajes son significativamente altos. Los anticuerpos IgM son indicativos de reciente infección por lo cual se piensa que la infección de toxoplasmosis se adquirió en cuanto se manifestó la enfermedad aguda muscular (17).

En el estudio se excluyeron los falsos positivos por anticuerpos antinucleares y factor reumatoide, en pacientes con distrofia muscular y Lupus eritematoso sistémico con o sin miositis no encontrándose incremento en la frecuencia de anticuerpos antitoxoplasma (17).

**EPIDEMIOLOGIA:** Se ha mencionado que hay dos maneras por las que el hombre puede adquirir la toxoplasmosis: de fuentes externas y congénitas; muchos de los casos de toxoplasmosis corresponden a recién nacidos. La forma de transmisión se realiza de diversas formas. Los huéspedes transportadores de oocistos, como las cucarachas, moscas y lombrices de tierra pueden diseminar los oocistos hacia varios ambientes. Las cajas de arena, macetas, suelo de jardines, campos abiertos y otros sitios en los que el gato deposita sus heces funcionan como almacenes de oocistos que pueden ser ingeridos por el hombre o los animales, puede ser también transmitida la infección mediante secreciones corporales, leche no pasteurizada, transfusiones sanguíneas y

trasplantes de órganos. Existe la transmisión por canibalismo o por hábitos carnívoros de algunos animales. Otro mecanismo muy interesante es la transmisión trasplacentaria, el parásito se disemina por la sangre y se puede alojar en todos los tejidos de la economía, así es que si la hembra embarazada sufre parasitemia, puede desarrollar nidos de parásitos y pasar al torrente sanguíneo.

En los Estados Unidos de Norteamérica se ha encontrado una relación de la ingestión de carne cruda o mal cocida con un alto índice de seropositividad, encontrándose de hasta 67% de la población de ese país (11).

La infección por Toxoplasma, se presenta en cualquier estación del año y en cualquier terreno, en el hombre o en cualquier animal vertebrado de sangre caliente sin variaciones constantes por factores de raza, sexo, ocupación y dieta, residencia urbano rural, sin evidencia clara de transmisión de la infección de persona a persona, o por artrópodos. Toxoplasma gondii ha sido aislado de la sangre, saliva, orina, materias fecales, exudados conjuntivales y leche materna. Se han incluido infecciones experimentales en animales por vía intracutánea, intracerebral, por inhalación, por ingestión y depósito de inóculo sobre la piel escarificada, conjuntiva, mucosa nasal y vaginal.

Recientemente se ha reportado una alta frecuencia en la reactivación de la infección por Toxoplasma gondii, ocurriendo más frecuentemente en pacientes enfermos con Citomegalovirus,

esto tal vez debido a una posible inmunosupresión, facilitando el ataque oportunista del Toxoplasma y manifestándose la infección con pneumonia. El mecanismo por el que el Citomegalovirus origina la reactivación del Toxoplasma latente no es conocido exactamente, sin embargo hay dos hipótesis que explican lo anterior: Una dice que el Citomegalovirus afecta directamente la replicación del parásito debido a las interacciones celulares entre los dos microorganismos, se sabe por ejemplo que en el caso de la infección de Citomegalovirus en fibroblastos diploides humanos, resulta en localización de rosetas alrededor de los cuerpos citoplasmáticos, debido presumiblemente al rearrreglo de los organelos celulares del hospedador durante la avanzada replicación del virus. La otra hipótesis dice que el Citomegalovirus induce inmunosupresión que permite la reactivación del parásito, la infección con Citomegalovirus daña el mecanismo de la fagocitosis por los macrófagos, por lo tanto el hospedero se hace más susceptible a la infección por el parásito (18).

**TERAPIA:** El tratamiento de la Toxoplasmosis es muy importante principalmente en el caso de mujeres embarazadas, ya que existe un alto riesgo de Toxoplasmosis congénita. Cuando la infección ocurre en el período periconcepcional o en el primer trimestre, ésta puede causar aborto o muerte del producto en útero como resultado de una severa lesión neurológica. La terapia prenatal hace disminuir los efectos de la infección y por lo tanto ofrece una alternativa a mujeres quienes desean continuar su embarazo o a quienes consideren imposible terminar su embarazo

por razones éticas o legales. Los adultos inmunocomprometidos con la linfadenopatía causada por la Toxoplasmosis generalmente no son tratados a menos que los síntomas sean severos y persistentes; mientras pacientes no inmunocomprometidos con la toxoplasmosis necesitan una puntual terapia (6,9,13,15).

Existen diferentes esquemas de tratamiento para la Toxoplasmosis: En adultos la dosis de pirimetamina es de 100mg/día dividido en dos dosis combinada con sulfadiazina (75mg/Kg por día ó 4g/día durante dos días) de ahí en adelante se administra 25 mg/día durante todo el día y la Sulfadiazina (100mg/Kg por día ó 8g/día dividido en dos dosis) es dada por dos a cuatro meses, y para inmunodeficientes por 6 meses más. El manteniendo de la dosis de pirimetamina puede subir a 50 mg/ por día (9). La pirimetamina y la sulfadiazina son antagonistas del ácido fólico y por lo tanto pueden causar depresiones medulares; la administración del ácido fólico puede disminuir estos efectos. La pirimetamina puede también causar síntomas intestinales, dolor de cabeza y mal sabor de boca (ver cuadro 5) (9,14).

La combinación de la terapia de trimetoprim y sulfametoaxole pueden producir pocos efectos colaterales (9). La Toxoplasmosis ocular puede ser tratada con clindamicina. La terapia de corticosteroides sistémicos es iniciada si las lesiones envuelven la mácula o el nervio óptico (9).

CUADRO No. 5

TRATAMIENTO PARA LA TOXOPLASMOSIS.

ADULTOS	INICIAL	PIRIMETAMINA	100 mg/día
		SULFADIAZINA	75 mg/Kg/día
	2 - 6 meses	PIRIMETAMINA	25 mg/día
		SULFADIAZINA	100 mg/Kg/día
		ACIDO FOLICO	5 mg/Kg/día
TOXOPLASMOSIS OCULAR		CLINDAMYCINA	
		CORTICOSTEROIDES	
INFECCION DURANTE EL EMBARAZO		SPIRAMICINA	3 g/día por 3 semanas
		SULFADOXINA	25 mg/Kg/Semana

La terapia de spiramicina (3g/día por tres semanas seguida por una interrupción de dos semanas) disminuye el riesgo de infección fetal en un 50% (6,9,15). Si el feto es infectado pirimetamina y sulfadoxina (25 mg y 500 mg respectivamente) son administrados por 10 días en adición a spiramicina diariamente (ver cuadro 6).

Con el creciente desarrollo de la encefalitis toxoplasmosa en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, ha sido necesario, una terapia alternativa a las ya conocidas; ya que un número alto de estos pacientes (60%) desarrollan reacciones alérgicas o serios efectos colaterales a la terapia de las sulfonamidas, trimetoprim o pirimetamina (19).

En un reciente estudio desarrollado, se observó que el trimetrexato, que es una quinazolona liposoluble, comunmente utilizada como agente anticancerígeno posee un potente efecto inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) aislada de Toxoplasma gondii; esta enzima se encarga de catalizar la reacción de Ácido paraaminobenzoico a 5 formiltetrahidrofolato, y así mantener el pool intracelular de folatos reducidos, durante la división del parásito y así continuando la infección en el hospedador (19,20). Se observó que la proliferación de Toxoplasma gondii en macrófagos de ratones es completamente inhibido por exposición de estas células a una concentración de 10 a la menos siete molar de trimetrexato por 18 horas; se observó que las diaminopiridinas, pirimetamina y trimetoprim tienen muy diferentes propiedades comparadas con metrotrexato y es que aquellos tienen intermediaria actividad inhibitoria

CUADRO No.6

TRATAMIENTO CONTRA TOXOPLASMA GONDII EN MUJERES GESTANTES			
DETECCION DE LA INFECCION	TRATAMIENTO		SIGNOS DE INFECCION AL NACIMIENTO.
DURANTE LA GESTACION (SEMANAS)	ANTIPARASITARIOS		
16	33	PIRIMETAMINA Y SULFADOXINA	MICROCALCIFICACIONES.
23	33	PIRIMETAMINA Y SULFADIAZINA	CALCIFICACION CEREBRAL.
17-20	29-30	PIRIMETAMINA SULFADOXINA SULFADIAZINA	NINGUNO.

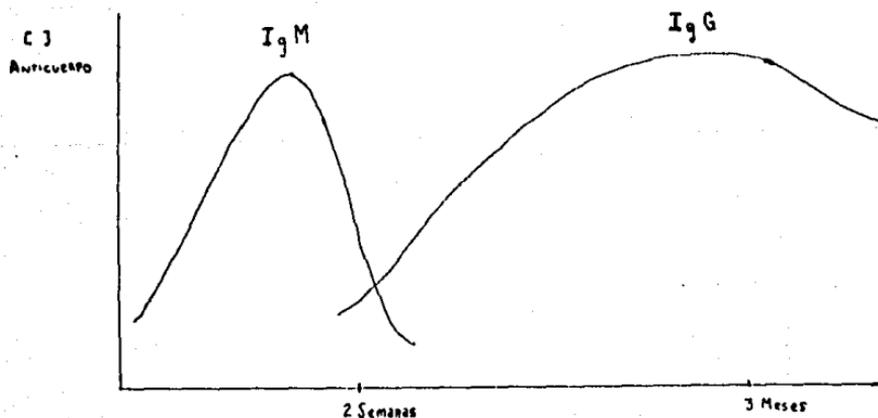
frente a la DHFR bacteriana, pero pueden pasar más rápidamente a las células bacterianas y de mamíferos; obteniéndose de esta manera un efecto mucho más rápido, pero bajo evaluación clínica el trimetrexato puede ser usado con leucovorin como un potente y selectiva droga antiprotozoaria sin aparente toxicidad en células mamíferas y aun en células infectadas (19).

CAPITULO II

ASPECTOS SEROLOGICOS.

## RESPUESTA INMUNE A LA TOXOPLASMOSIS

La Toxoplasmosis al igual que otras infecciones, manifiesta una respuesta inmunológica. De esta manera la respuesta inmune humoral a la Toxoplasmosis tiene el siguiente orden de aparición cronológico: A partir de la primera semana posterior a la infección se reconoce la presencia de anticuerpos IgM; la elevación tiene un componente inicial de anticuerpos inespecíficos con cruce antigénico, la variedad IgM específica en contra de alguno o algunos determinantes antigénicos del Toxoplasma gondii aparece más tardíamente y se prolonga por más semanas e incluso algunos meses (8,21). La variedad IgG aparece dos a cuatro semanas después de iniciada la infección; la elevación de los títulos es lenta durante dos a cuatro meses y alcanza su máximo en tres a seis meses; estos títulos pueden permanecer elevados (igual o mayor a 6000 U.I.) por meses o incluso años (8,21).



El desarrollo de la respuesta inmune le permite al humano, limitar la infección y mantener un sistema de vigilancia para evitar nuevas infecciones e incluso recurrencias con progresión generalizada, tal como sucede en el huésped con algún desbalance de la inmunidad celular y/o humoral (21,22). En el caso de que se encuentre un título alto de anticuerpos en una mujer embarazada, es recomendable realizar nuevamente la prueba contra Toxoplasma gondii, para establecer si se trata de una infección activa o sólo es respuesta de memoria inmunológica (23); este hecho es de importancia ya que se considera que del 30 a 50% de la población Mexicana presenta anticuerpos previos a Toxoplasma gondii (21,23).

Se sabe que muchas veces coincidente con el desarrollo de la inmunidad humoral y celular, se observa disminución en la proliferación del parásito, organización del bradizoito y evolución posterior a seudoquiste, finalmente quiste tisular y resolución de la infección. El tiempo transcurrido en este proceso puede ser de dos a tres semanas (23).

De acuerdo al tiempo de aparición de los diferentes isotipos de inmuoglobulinas durante la infección, es importante mencionar que al determinar IgG específica a Toxoplasma gondii, ello será indicativo de que la infección no es muy reciente; sobre este aspecto fue desarrollado recientemente un método serológico utilizando una variante del método de ELISA, con el fin de evaluar la avidéz de IgG específica por el antígeno de Toxoplasma; determinando de esta manera si la infección es

primaria o sólo se trata de una memoria inmunológica. Este trabajo resulta muy importante en el caso de mujeres embarazadas, tiene la ventaja de distinguir entre una infección reciente o reactivación, lo cual es muy importante en el caso de mujeres con riesgo de Toxoplasmosis congénita (10). En un reporte realizado por Alexander J. Sulzer mostró resultados diferentes a los ya conocidos, en relación al tiempo en que aparecen los anticuerpos IgM e IgG, después de la infección por Toxoplasmosis. Este trabajo se realizó en un grupo de soldados los cuales adquirieron la infección en la jungla al realizar entrenamientos; el grupo fue de 32 pacientes y fueron sangrados durante un año a partir de la infección, con el fin de evaluar los niveles de anticuerpos, observándose un rápido ascenso simultáneo de anticuerpos específicos IgM e IgG, después de las dos primeras semanas de infección, a diferencia del conocido ascenso primario de la IgM para después proseguir el ascenso de la IgG. Al mismo tiempo se observó que cuando los niveles de anticuerpos IgG son altos y no se observa reactividad de la IgM, se puede pensar que la reactividad de este anticuerpo, se ve inhibida por altos niveles de IgG que compiten por los determinantes antigénicos del microorganismo. En este trabajo se concluyó que los niveles de anticuerpos IgM no son indicativos de infección reciente por las razones mencionadas, aunque esta diferencia en el tiempo de aparición es debida a: la respuesta inmunológica particular del hospedador, variabilidad de la cepa o a diferencias en la ruta de infección sea por oocistas, taquizoitos o bradizoitos (24).

La alta prevalencia de anticuerpos antitoxoplasma en algunas poblaciones humanas, y el hecho de que los niveles pueden quedar elevados despues de la infecci3n aguda, han complicado la interpretaci3n de los resultados serol3gicos obtenidos en individuos con sospecha de tener Toxoplasmosis cong3nita. Con el fin de realizar mejores interpretaciones, se han realizado algunos trabajos fundamentados en la identificaci3n de los diferentes antígenos de Toxoplasma gondii tratados por diversos métodos, y que ser3n descritos a contiuiaci3n: En un estudio se utilizo el método de Inmunoblot que contribuye a facilitar el estudio de la estructura antigénica del parásito y de los anticuerpos formados por estos antígenos, se estudi3 la respuesta de anticuerpos a Toxoplasma gondii antes y despues de la infecci3n aguda; se realizo el estudio midiendo los niveles de anticuerpos por ELISA y Sabin-Feldman mientras que el antígeno se analizo por Inmunoblot, obteniendose dos franjas muy marcadas en sueros positivos a diferencia de los sueros negativos, se observo que estas franjas de antígeno tenian avidez por anticuerpos IgM e IgG, el antígeno con afinidad a IgM se encontro en la banda correspondiente a 4KDa mientras que el que mostro afinidad por la IgG se encontro en la banda correspondiente a 35KDa. Se observ3 que en sueros positivos aparecen estos determinantes antigénicos indicando por lo tanto la infecci3n y siendo capaces de causar la infecci3n en animales de laboratorio. La importancia en el desarrollo de esta tecnica es que al aparecer estos determinantes antigénicos tempranamente pueden por lo tanto servir para diagnosticar tempranamente la infecci3n aguda de Toxoplasmosis evitando errores en la interpretaci3n serol3gica (25).

Se han desarrollado estudios para definir los antígenos de Toxoplasma gondii, los cuales son detectados por anticuerpos IgG presentes sólo durante el estado de la infección aguda. La técnica que se utilizó consiste básicamente en utilizar un fijado de taquizoitos con acetona (Antígeno:AC), obteniéndose sólo resultados positivos durante la fase aguda de la infección, mientras que en el caso de que exista infección crónica o aguda, las muestras sericas fueron positivas en un fijado de taquizoitos con formalina (Antígeno:HS). En el desarrollo de este método se realizaron interesantes observaciones entre las cuales se cuentan las siguientes: al inmunizar ratones con el antígeno AC se reconocen predominantemente 10 antígenos de taquizoitos por análisis inmunoblot, de esta manera los sueros de pacientes con infección aguda reaccionan fuertemente con estos 10 antígenos, mientras que los sueros de ratones inmunizados con los antígenos HS reconocen más antígenos de Toxoplasma gondii que los reconocidos frente al antígeno AC. Esto sugirió que los antígenos AC son una selecta porción HS, se observó además que el antígeno AC estimula la producción de anticuerpos IgG (AC), que tienen afinidad por las membranas de los taquizoitos pero no así con la membrana de los bradizoitos, mientras que el anticuerpo IgG (HS) reacciona fácilmente con ambas membranas por fluorescencia indirecta. Estos resultados sugirieron que el suero obtenido durante las diferentes etapas de la infección contiene anticuerpos IgG, que reconocen diferentes antígenos de Toxoplasma gondii. La explicación a estas observaciones están basadas en reportes de la existencia de dos membranas en los taquizoitos, con peso molecular de 30,000 y 22,000 que están

ausentes en los bradizoitos, y por lo tanto de la diferencia de reactividad (26).

## TECNICAS DE DIAGNOSTICO PARA LA TOXOPLASMOSIS

Los primeros casos de Toxoplasmosis se descubrieron por examen microscópico de materiales teñidos que se obtuvieron por autopsia, hoy en día existe una gran variedad de técnicas algunas de las cuales varían en especificidad y sensibilidad, entre las más comunmente usadas se encuentran las siguientes: (ver cuadro 7).

a) Sabin-Feldman: Esta es una prueba de referencia, mide anticuerpos de la clase IgM e IgG, los cuales aparecen de 1 a 2 semanas después del inicio de los síntomas, incrementándose a las 6 a 8 semanas y persiste en declinación el título por años. Se considera reacción positiva a la dilución igual o mayor de 1:16. El título no correlaciona con la severidad de la enfermedad. La prueba consiste en mezclar cantidades constantes de parásitos vivos suspendidos en suero normal fresco, con similares cantidades de varias diluciones del suero inactivado, seguido de una incubación se añade en seguida azul de metileno alcalino recién preparado. Los parásitos no afectados son teñidos de azul, mientras que los expuestos a anticuerpos, no son teñidos. La técnica es sensitiva y específica, pero las propias dificultades de la técnica han hecho que se abandone ésta

(9,14,21).

b) Hemaglutinación: En esta técnica se mide IgG, sus anticuerpos tienen un sitio receptor diferente al receptor de Sabin-Felman, aparecen más tardíos, aunque es menos específica y sensible la hemaglutinación que la reacción de Fijación de Complemento, por lo tanto es una prueba con limitantes para el diagnóstico de infección adquirida y neonatal transplacentaria. En esta técnica se utilizan antígenos solubles que pueden adsorberse de manera pasiva o acoplarse químicamente a los eritrocitos, los antígenos de Toxoplasma se acoplan de manera espontánea a los eritrocitos formando reactivos estables para la identificación de anticuerpos (9,21,27).

CUADRO No. 7

METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS	
DIRECTOS:	<ul style="list-style-type: none"><li>- AISLAMIENTO</li><li>- INMUNOFLORESCENCIA AG.</li><li>- BIOPSIAS</li></ul>
INDIRECTOS:	<ul style="list-style-type: none"><li>- SABIN FELDMAN</li><li>- FIJACION DEL COMPLEMENTO</li><li>- HEMAGLUTINACION PASIVA</li><li>- INMUNOFLORESCENCIA I.</li><li>- ELISA</li><li>- FIJACION DE SUPERFICIE</li></ul>

c) **Modificación de la técnica de aglutinación en látex:**

La técnica normal de aglutinación por látex tiene el mismo fundamento que la hemaglutinación sólo que en este caso se utiliza latex, que es una partícula inerte. Esta técnica modificada de látex es un método rápido utilizado para la detección de anticuerpos antitoxoplasma. Este método tiene utilidad después de que se observó ocurrencia de Toxoplasmosis aguda en recipientes seronegativos cardíacos. En esta técnica se introduce una centrifugación, pudiéndose leer una hora después del comienzo de la centrifugación, permitiendo una rápida evaluación del estado de anticuerpos del donador (27, 28, 29).

d) **Fijación del Complemento:** La interpretación de la prueba de fijación de complemento se basa en la presencia o ausencia de hemólisis del indicador que son eritrocitos de carnero con hemolisina. Cuando hay anticuerpo en el suero problema, se combina con el antígeno, y el complemento se fija al sistema problema. No se produce lisis de los eritrocitos. Se habla entonces de una prueba de fijación de complemento positiva. Cuando el suero problema no contiene anticuerpo, el complemento queda libre y se puede fijar más tarde al sistema indicador. Se observa por lo tanto lisis de los eritrocitos de carnero. Se dice entonces que la prueba es negativa.

e) **Inmunofluorescencia Indirecta:** Existen colorantes para marcar anticuerpos que absorben la luz ultravioleta y azul corta y emiten luz visible. Los anticuerpos fluorescentes son

reactivos histoquímicos que reaccionan con antígenos específicos para identificarlos. El antígeno se fija sobre un portaobjetos ordinario. En la técnica directa, se cubre este con anticuerpo marcado y se espera a que reaccione con el antígeno. Un lavado suave elimina el anticuerpo no combinado; en donde se observa fluorescencia es seguro que hay antígeno, siempre y cuando se hallan estudiado controles adecuados. El método indirecto se basa en la técnica de antiglobulina. Se emplea usando el antígeno y un anticuerpo no marcado procedente de alguna especie conocida. Después la preparación se expone a un suero fluorescente antiglobulinico, de esta manera se observa fluorescencia del antígeno.

**Inmunoblot:** Esta técnica generalmente no es usada con fines diagnósticos pero tiene amplio uso en la investigación. Este método esta fundamentado en la migración electroforética de las proteínas en un campo eléctrico. El medio de sosten es un gel de poliacrilamida u hojas de celulosa, en las cuales no se estimula ni se impide el flujo de moléculas en el campo eléctrico.

g) **Demostración del antígeno:** Aunque muchas pruebas serológicas son disponibles para la determinación de anticuerpos a Toxoplasma gondii, en ocasiones la infección por toxoplasma no puede distinguirse entre infección activa e infección crónica ya que pueden persistir los anticuerpos por años después de la infección aguda; aunque pruebas para la detección de anticuerpos IgM permiten incrementar la detección de la reciente infección, tales pruebas pueden quedar sujetas a falsos positivos o negativos. Por lo anterior se utiliza como técnica de diagnóstico, la identificación, del parásito y asise puede definir mejor la infección aguda e indicar por lo tanto cuando la infección es activa. Las técnicas más comunes usadas para la identificación del parásito son la contrainmunolectroforesis, Inmunodifusión y la técnica de aislamiento del parásito que usualmente se realiza en ratones y cultivo de tejidos (9,30).

h) **Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzima (ELISA):** En la actualidad la prueba de ELISA es una de las más sensibles y específicas, tiene sensibilidad y reproducibilidad mayor a 90%. Se considera un título francamente positivo de 30 U.I. (aproximadamente 1:128) y se consideran títulos muy altos por arriba de 300 U.I. (mayor de uno a 1024). Los principios fundamentales de los procedimientos enzimáticos son muy similares a los de fluorescencia. El método indirecto básicamente consiste en:

- 1) Preparar una muestra de antígeno e incubar con

el anticuerpo específico.

- 2) Lavar la preparación con el fin de eliminar los restos de anticuerpo que no reaccionaron.
- 3) La preparación es incubada con anticuerpos antigamaglobulina conjugada a la enzima para posteriormente realizar el lavado correspondiente.
- 4) Finalmente el sistema se revela con el sustrato correspondiente y se lee al microscopio

En la actualidad existen muchas variantes del método de Elisa las cuales pueden medir IgM e IgG (21,31).

Las ventajas de seleccionar Elisa sobre la técnica de tinción fluorescente incluyen:

- a) La reacción enzima sustrato es detectada macroscópicamente, lo que evita problemas de campo oscuro en el ultravioleta.
- b) Muchos de los productos de la reacción de I-F. son electrodensos, haciéndose microscópicamente electrodensos.
- c) Muchas de las preparaciones histológicas por Elisa son permanentes permitiendo revisar y

repetir la observación de viejas preparaciones, mientras que éstas por fluorescencia rápida pierden su tinción.

- d) La actividad catalítica de la enzima y el número de moléculas de la enzima atacan al anticuerpo, actuando como un sistema amplificador, por prolongación de la incubación del sustrato y así la sensibilidad puede ser aumentada (32).
  
- e) Los reactivos de los conjugados son fácilmente estandarizados y más estables que los conjugados de fluoresceína (21,31,32).

## INMUNOFLORESCENCIA

La inmunofluorescencia fué introducida en 1941 por Coons, el cual empleó beta antraceno, que es un compuesto fluorescente de color azul, conjugado con antisuero antineumocócico para descubrir los antígenos bacterianos en los cortes de tejidos (14). La técnica de inmunofluorescencia es esencialmente una técnica histoquímica o citoquímica para la identificación y localización de los antígenos, es la emisión de una longitud de onda, mientras una sustancia es irradiada con luz de un color diferente. La longitud de onda emitida está necesariamente a un menor nivel de energía que la luz incidente o absorbida. El isotiocianato de fluoresceína es una forma de fluoresceína que con facilidad se fija a las proteínas mediante enlaces covalentes a un pH alcalino, primordialmente a través de residuos amínicos epsilon de lisina y grupos amínicos terminales. Su absorción máxima es a 490-495 nm y emite un color verde característico a 517 nm. El isotiocianato de tetrametilrodamina emite luz roja y tiene una absorción máxima a 550 nm (27).

En la técnica el antisuero conjugado se añade a las células o a los tejidos y se fija a los antígenos formando por lo tanto, un complejo inmunitario estable. Las proteínas que no pertenecen al anticuerpo son eliminadas por lavado y la preparación resultante es observada en un microscopio de fluorescencia. Este microscopio contiene una fuente luminosa de alta intensidad, filtros de excitación para producir longitudes de onda capaces de producir fluorescencia por activación y filtros de barrera para

eliminar las ondas luminosas que interfieren. La intensidad real de la fluorescencia observada por el ojo humano depende de tres factores que son: la eficiencia con la cual el colorante convierte la luz incidente en luz fluorescente, la concentración del colorante en la muestra de tejido, y la intensidad de la radiación excitante. Las etapas involucradas en la inmunofluorescencia incluyen la preparación del antisuero inmunizante o gama globulina purificada, conjugación con el colorante fluorescente y el procedimiento de tinción. Básicamente existen dos técnicas de tinción que son la inmunofluorescencia indirecta e inmunofluorescencia directa (IFD), en el presente trabajo se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. La diferencia fundamental entre inmunofluorescencia directa e inmunofluorescencia indirecta; consiste en que en I.F.D. el antisuero conjugado es añadido directamente al corte de tejido o a la suspensión de células viables; mientras que en la técnica de inmunofluorescencia indirecta se elimina la necesidad de purificar y conjuguar de manera individual cada muestra de suero. El método es en esencia, la adaptación de la prueba de Coombs o técnica de doble anticuerpo (27).

La técnica de inmunofluorescencia es un poco delicada, y por ello se han realizado estudios con el fin de realizar una estandarización de esta técnica en el diagnóstico de enfermedades parasitarias; se ha observado que el colorante azul de Evans, que se utiliza como colorante de contraste es adecuado en concentraciones de 1:500 a 1:100 000 para demostrar anticuerpos,

con este colorante en muestras negativas se observan los taquizoitos teñidos de un tono rojizo, este color será más oscuro a medida que la dilución de azul de Evans sea más baja. Una de las observaciones de las más interesantes fué que las congelaciones y descongelaciones en sueros analizados, antisueros y otros productos biológicos disminuyen sus títulos, como ejemplo se tienen algunos sueros cuyos títulos originales eran 1:4096 y 1:32768 bajarón dos o tres títulos respectivamente mientras que títulos de 1:16 y 1:64 se vuelven negativos despues de 64 descongelaciones, mientras que los controles de tiempo mantienen sus títulos originales (33).

## PLANTEAMIENTO Y FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA

Las lesiones provocadas por Toxoplasmosis en el 12% de los niños infectados in utero no son lo suficientemente características como para permitir efectuar un diagnóstico específico, ya que existen otros agentes infecciosos principalmente virales que producen el mismo tipo de cuadro clínico que el de Toxoplasma gondii, estos agentes incluyen a los citomegalovirus, Herpes, rubeola y entre otros a Treponema pallidum, los pacientes que presentan el cuadro clínico se les incluye en el síndrome de TORCH; para identificar la etiología específica responsable de la infección se realizan estudios encaminados a identificar a cada uno de los virus, bacterias o protozoarios; en el caso de la Toxoplasmosis, se puede realizar la prueba de fijación del complemento (FC') e inmunofluorescencia indirecta como técnicas serológicas de diagnóstico, de ahí la importancia de efectuar un estudio de correlación de estas dos pruebas ya que los métodos de diagnóstico con que se cuenta actualmente como la ELISA, Hemaglutinación, FC' e Inmunofluorescencia indirecta no se relacionan con determinados isotipos de inmunoglobulinas, el cuadro clínico y la evolución del padecimiento; esto hace que con frecuencia se den falsos positivos o negativos en los pacientes remitidos a los laboratorios de diagnóstico ya que sus estándares se establecen con poblaciones estudiadas y no con casos comprobados.

En la actualidad muchos investigadores han reportado una alta frecuencia de infección por Toxoplasma gondii en pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo se conocen casos de encefalitis Toxoplasmosa en aproximadamente el 30% de pacientes con SIDA (6). Esto sugiere una reactivación de la infección latente por Toxoplasma gondii. El hecho de que se incremente la frecuencia de infección en este tipo de pacientes consecuentemente provoca un aumento de la frecuencia de la infección en la población, por ello actualmente con el incremento de casos con SIDA, paralelamente se observa aumento en el número de casos de infección por Toxoplasmosis, lo que le da aun más importancia a este estudio.

#### OBJETIVOS:

- 1.- Producción del antígeno particulado de Toxoplasma gondii en ratones.
- 2.- Extracción de un antígeno crudo.
- 3.- Estandarización del método de Fijación del Complemento e Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra Toxoplasma gondii.
- 4.- Establecer la correlación entre los dos métodos y el cuadro clínico.

HIPOTESIS: La Toxoplasmosis es una infección que deja secuelas severas en el paciente. La presencia de los isotipos Ig M e Ig G no siempre están relacionados con el cuadro clínico del paciente, por lo tanto habrá situaciones en las que exista alto título de anticuerpos Ig M e Ig G y no haya manifestación clínica alguna.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

## M A T E R I A L

### I.- MATERIAL DE LABORATORIO:

- Cristalería volumétrica.
- Portaobjetos.
- Jeringas (5 y 10 ml).
- Centrifuga (IEC Centra- 4R).
- Potenciómetro (Zeromatic II).
- Campana de flujo laminar.
- Congeladores (4,-30 y -80 grados centígrados).
- Placas de microtitulación con fondo en U de poliestireno.
- Placas de microtitulación con fondo plano de poliestireno.
- Micropipetas calibradas de 25 microlitros.
- Microdilutores calibrados de 25 microlitros.
- Microscopio de fluorescencia (marca ZEISS, de epifluorescencia).
- Sonicador (modelo Soniprep 150).
- Equipo de disección.

## II.- MATERIAL BIOLÓGICO Y SOLUCIONES:

- Sueros de pacientes con síndrome de TORCH.
- Ratones Balb/c de edad preferentemente mayor a ocho semanas.
- Hemolisina.
- Complemento de cobayo.
- Eritrocitos de carnero.
- Solución salina de fosfatos pH 7.2 (PBS).
- Solución salina 0.085%
- Solución amortiguadora de Gelatina-Veronal-Barbital (GVB).
- Solución anticoagulante de Alsever.
- Conjugado de isotiocianato de fluoresceína-anti Ig G humana.
- Glicerol pH 7.6
- Formaldehído al 1%

\* Nota ver apéndice de soluciones.

## MANEJO DE LA CEPA DE TOXOPLASMA GONDII

- 1.- La cepa de Toxoplasma gondii fué proporcionada por el laboratorio de parasitología del ISET y se mantiene en ratones adultos no importando sexo ni edad. La cepa también se puede mantener en Hamster únicamente que en estos animales puede durar el proceso infeccioso más días ya que son menos susceptibles que los ratones.
- 2.- El tiempo de infección es de 3 a 5 días aumentando la mortalidad en el quinto día.
- 3.- Se cosecha aproximadamente 0.5 ml de líquido peritoneal por ratón.
- 4.- Los parásitos se colectan con pipeta Pasteur.
- 5.- Se homogeniza 0.5 ml de exudado con 5 ml de solución salina estéril.
- 6.- Contar 50 parásitos por campo usando objetivo 40X, estos se encuentran en 0.1 ml de la suspensión.
- 7.- Se verifica la presencia de los parásitos, utilizando una pequeña gota del homogenizado y tñirlo por medio de la técnica de Giemsa o Wright.
- 8.- Se puede inactivar una porción del exudado peritoneal con formaldehído al 1% y otra parte puede ser reinoculada.
- 9.- El exudado inactivado puede ser utilizado en diversas técnicas serológicas.

## INACTIVACION DE LA CEPA

Preparar una solución de PBS pH 7.2 más formol al 1%, y se esteriliza con filtro milipore 0.22 micras y se hace una dilución del exudado peritoneal con el buffer a una relación de 1:10.

MEZCLA: 1.- Colocar en un tubo de 16 X 150 mm 2 ml de formol.

2.- Agregar 1 ml de trasudado peritoneal disgregar por cinco ocasiones hasta que se forme espuma y un líquido lechoso para romper los quistes.

3.- Al producto del macerado quístico se le agregan 7 ml de PBS (1:10) se guarda la relación y se resuspende bien, se dejan sedimentar por 24 horas a temperatura ambiente o en refrigeración.

4.- Transcurrido ese tiempo separar el sobrenadante con pipeta Pasteur y colocarlo en un tubo de 13 X 100 esteril se agita y se colocan 5 microlitros de ese caldo en la laminilla.

5.- Secar por calor húmedo por dos minutos a temperatura ambiente para contar la cantidad de parásitos, se tiñen con Wright o Giemsa por cinco minutos y se observan al microscopio, la cantidad adecuada por cada pozo será de 40-100 parásitos por campo de 40X.

6.- Si se desea preparar antígeno particulado (soluble) hay que romper los parásitos del paso 4 y tratarlos por 60 segundos con ultrasonido a intensidad de 120 micrones.

#### SUEROS DE PACIENTES:

Se trabajó con 100 sueros de pacientes, que por sus características clínicas requirieron un estudio específico en la determinación anticuerpos contra Toxoplasma gondii; los sueros se obtuvieron de pacientes asistentes en el Hospital Infantil de México (HIM) en los cuales se justificó clínicamente el estudio. En pacientes con otra 'patología se tomó estudio de control e incluyeron los sueros de individuos que por otras causas ingresaron al servicio de no contagiosos.

#### RATONES Balb/c:

Se trabajó con la cepa de ratones adultos (mayores a ocho semanas) Balb/C, no importando el sexo, estos se adquirieron en el bioterio del H.I.M. y se utilizaron con el fin de propagar el parásito intraperitonealmente, para que en los siguientes tres o cuatro días hayan sido sacrificados, obteniéndose el exudado peritoneal rico en parásitos.

#### HEMOLISINA:

La hemolisina fué preparada en el Laboratorio de Virología del H.I.M. con un título de 1:2000.

#### ERITROCITOS DE CARNERO:

Se utilizaron eritrocitos de carnero al 2%, los eritrocitos se obtuvieron por sañgrado yugular de borregos del bioterio del H.I.M. manteniendo estos a temperatura de 4 grados centígrados hasta el momento en que se utilizaron y bajo condiciones de esterilidad. La cantidad de anticoagulante Alsever es en proporción 1:1 V/V. La suspensión de eritrocitos de carnero

se prepara de la siguiente forma:

- a) Se toma una alícuota y se procede a lavar las células con GVB; enseguida centrifugar durante 5 minutos a 2000 r.p.m. repetir la operación tres ocasiones.
- b) Una vez lavados, se obtiene un paquete de eritrocitos con el cual se hace una suspensión al 2% en GVB.
- c) Se procede a estandarizar dicha solución colorimétricamente, de la siguiente manera: Se lisan 0.8 ml de la suspensión con 3.2 ml de agua destilada y se determina la densidad óptica de la solución resultante de hemoglobina, ajustando a cero con agua destilada; la densidad óptica debe ser de más-menos 0.47 a una longitud de onda de 540nm.
- d) Una vez estandarizada la suspensión de eritrocitos, se lleva al refrigerador (4 grados centígrados) hasta su uso.

#### COMPLEMENTO DE COBAYO:

La fuente de complemento (C<sup>3</sup>) usado fue obtenido de suero de cobayo, sangrados en el bioterio del H.I.M.

La preparación del complemento en el laboratorio es como sigue:

- a) Se procede a sangrar al cobayo por punción cardíaca, extrayéndole 15 ml de sangre total.
- b) La sangre total se deja 30 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos sobre hielo, para que se retraiga el coágulo.
- c) En seguida se procede a separar el suero por medio de una centrifuga refrigerada (no tiene que quedar en el suero ningún resto de eritrocitos).
- d) El suero ya libre de eritrocitos se distribuye en tubos ependorff, cada tubo con una alícuota de 200 a 300

microlitros de complemento.

- e) Se procede a congelar inmediatamente a una temperatura de  $-85$  grados centígrados con el objeto de evitar la pérdida de actividad, en estas condiciones el título (actividad) se mantiene estable hasta que el lote titulado se acabe, así de esta manera se asegura un título de  $1: 120$  unidades fijadoras de complemento.

#### SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS:

- a) Preparar una suspensión de eritrocitos al  $2\%$  con una densidad óptica de  $0.47$  a  $540$  nm.
- b) En un matraz que este depositado sobre hielo picado hacer la dilución de hemolisina (la cantidad es según se requiera para la prueba); en seguida agregar un volumen igual de eritrocitos y homogenizar la mezcla muy bien.
- c) Incubar durante  $30$  minutos a  $37$  grados centígrados con agitación cada  $10$  minutos.
- d) Estos eritrocitos sensibilizados se deben sacar del baño maría y colocar en hielo; además deben usarse en seguida ya que en un lapso de  $20$  a  $30$  minutos pierden su efectividad.

#### TITULACION DEL COMPLEMENTO:

- a) Es muy importante que la titulación del complemento se lleve a cabo en frío. El material que se requiere es una gradilla con tubos de  $12 \times 75$  mm.
- b) Efectuar diluciones seriadas (para efectuar las diluciones se tiene que tomar en cuenta la fuente de donde procede el complemento), en este caso la fuente de complemento procedió de suero de cobayo, por lo que se parte una dilución  $1:60$

CUADRO No. 8

TITULACION DEL COMPLEMENTO

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
GVB (AG-)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
COMPLEMENTO	0.12	0.11	0.10	0.09	0.080	0.07	0.06	0.05
GVB	0.08	0.09	0.010	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15
E.S.	0.2	0.2	0.2	0.20	0.2	0.2	0.2	0.2

E.S. : ERITROCITOS SENSIBILIZADOS.

Nota: volúmenes en mililitros.

considerando que el complemento de cobayo presenta un título elevado (ver cuadro 8).

- c) Agitar perfectamente los tubos y colocarlos en baño maría a 37 grados centígrados durante 30 minutos con agitación cada diez minutos.
- d) Centrifugar de dos a tres minutos a 2000 r.p.m. enseguida proceder a interpretar los resultados.
- e) Interpretación de los resultados: El título que contenga la menor cantidad de complemento y que muestre hemólisis total representa una unidad; para la prueba de fijación del complemento se requiere usar dos unidades (2U).

#### TITULACION DE LA HEMOLISINA:

- a) Prepara en primer lugar una solución stock de hemolisina 1:100 de la siguiente manera:

Diluyente GVB .....47 ml

Fenol al 5 % en GVB ..... 2 ml

Hemolisina al 5 % en glicerol.....1 ml

Una vez preparada la solución stock de hemolisina colocar sobre el hielo picado.

- b) En un recipiente que contenga hielo picado colocar una gradilla con tubos de 16 X 150 en los cuales se realizan las siguientes diluciones: (ver cuadro 9).
- c) Una vez efectuadas las diluciones, colocar sobre el hielo picado una gradilla conteniendo suficientes tubos de 12 X 75 mm con el objeto de correr la prueba por duplicado; a dicha serie de tubos agregar los siguientes reactivos: hemolisina, complemento, eritrocitos al 2%, GVB (ver cuadro 10 para ver

## CUADRO No.9

## TITULACION DE LA HEMOLISINA

TUBO	DILUCION	1 ml DE HEMOLISINA (1:100)			GVB
1	1:500	"	"	"	4 ml
2	1:600	"	"	"	5 ml
3	1:700	"	"	"	6 ml
4	1:800	"	"	"	7 ml
5	1:1000	"	"	"	4.5 ml
6	1:2000	"	"	"	1 ml
7	1:6000	"	"	"	5 ml
8	1:8000	"	"	"	7 ml

CUADRO No.10

## TITULACION DE LA HEMOLISINA PARTE 2

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
DILUCIONES DE HEMOLISINA (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.20	0.2	0.2
COMPLEMENTO	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ERITROCITOS (2%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.20	0.2	0.2
GVB	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Nota : Volúmenes en mililitros.

cantidades).

- d) Control de eritrocitos: En un tubo de 12 X 75 mm depositar 0.2 ml de la suspensión de eritrocitos al 2% y agregarle 0.8 ml de GVB.
- e) Agitar perfectamente los tubos e incubar a baño maria de 37 grados centígrados, durante 30 minutos con agitación cada diez minutos.
- f) Centrifugar los tubos durante 3-5 minutos a 2000 r.p.m. con el objeto de sedimentar los eritrocitos y facilitar a lectura.
- g) Interpretación de los resultados: El tubo que contenga la más alta dilución de hemolisina y que presente hemólisis total representa una unidad hemolítica.

**Nota:** Para la prueba de fijación del complemento es importante usar dos unidades, para lo cual se requiere dividir entre dos el título obtenido; por ejemplo el título de hemolisina obtenido en este trabajo fué de 1:2000 ya que esta dilución mostró hemólisis total con menor concentración de hemolisina, ( este título representa 1 U. fijadoras de complemento ) se divide entre 2 y la dilución de trabajo será 1:1000 que son las 2 U requeridas.

#### TITULACION DEL ANTIGENO:

La titulación del antígeno se efectuó probando diluciones seriadas del antígeno contra un control de suero positivo de título desconocido que contiene los anticuerpos positivos, aunque también se puede realizar la titulación del antígeno

contra diluciones seriadas de suero positivo control sin saber exactamente su título. Para las diluciones del antígeno se ocuparon tubos de 13 X 100 mm, y las diluciones fueron desde 1:2 hasta 1:128 o más si se sospecha de un título alto.

Mientras se preparaban las diluciones del antígeno, se inactivaba el suero control positivo y el suero control negativo a 56 grados centígrados durante 30 minutos; luego procedió lo siguiente:

- a) En todas las cavidades de una microplaca de fondo en U agregar con micropipeta 0.025 ml de GVB.
- b) En la primera hilera vertical de la microplaca agregar con micropipeta 0.025 ml de suero control positivo en cada cavidad y con los microdilutores efectuar las diluciones de manera horizontal desde 1:2 hasta 1:128; descartar los 0.025 ml que quedan en los microdilutores al mezclar la última cavidad.
- c) Agregar las diluciones del antígeno de la siguiente manera: A cada cavidad de la primera hilera horizontal agregar 0.025 ml de la dilución 1:2 de antígeno, a las cavidades de la segunda hilera horizontal agregar 0.025 ml de la dilución 1:4 de antígeno, y así sucesivamente hasta la dilución 1:128 del antígeno.
- d) Agregar a todas las cavidades de la placa 0.025 ml de complemento en su óptima dilución de dos unidades.
- e) Preparar todos los siguientes controles:

#### 1.- CONTROL DE SUERO POSITIVO.

En la microplaca hacer diluciones del suero positivo desde 1:2 hasta 1:128 usando como diluyente GVB. Así de

esta manera las cavidades deben contener:

0.025 ml de GVB.

0.025 ml de la dilución del suero positivo.

0.025 ml del antígeno título conocido 2U.

0.025 ml de complemento a 2U.

## 2.- CONTROL DE ANTICOMPLEMENTARIDAD DEL SUERO POSITIVO.

En otra hilera de la placa se hacen las mismas diluciones o sea desde 1:2 hasta 1:128. Las cavidades destinadas para el control de anticomplementaridad deben contener lo siguiente:

0.025 ml de GVB

0.025 ml de dilución del suero positivo.

0.025 ml de complemento a 2U.

## 3.- CONTROL NEGATIVO DEL ANTIGENO CON EL SUERO POSITIVO.

En otra hilera de la placa efectuar las mismas diluciones anteriores. Las cavidades destinadas al control negativo del antígeno con el suero positivo deben contener:

0.025 ml de GVB.

0.025 ml de la dilución del suero positivo.

0.025 ml de control negativo del antígeno.

0.025 ml de complemento 2 U.

## 4.- CONTROL DE SUERO NEGATIVO.

En otra hilera de las placas efectuar las mismas diluciones anteriores. Las cavidades para este control deben tener:

0.025 ml de GVB

0.025 ml de la dilución del suero negativo.

0.025 ml de antígeno de positividad conocida  
diluida a 2U.

0.025 ml del complemento a 2U.

5.-- CONTROL DEL ANTIGENO POSITIVO CONOCIDO.

Agregar con micropipeta a 2 ó 3 cavidades de la  
microplaca:

0.025 ml de GVB.

0.025 ml de el control positivo del antígeno.

0.025 ml del complemento.

6.-- CONTROL DE LOS ERITROCITOS SENSIBILIZADOS.

Colocar en dos o más cavidades:

0.075 ml de GVB.

7.-- CONTROL DEL COMPLEMENTO.

Para comprobar que el complemento está funcionando bien,  
a 2U se coloca lo siguiente:

0.050 ml de GVB.

0.025 ml de complemento.

PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO (FC').

- a) En primer lugar inactivar el o los sueros problema, el control positivo y el control negativo en un baño serológico a una temperatura de 56 grados centigrados durante 30 minutos; mientras tanto se prepara el material para realizar las diluciones.
- b) Rotular las microplacas.
- c) Colocar en todas las cavidades que se van a usar de la microplaca 0.025 ml de GVB.
- d) En las dos primeras cavidades de la microplaca agregar 0.025 ml del suero problema y hacer las diluciones correspondientes, de 1:2 hasta 1:128.

1.- La primera hilera horizontal debe contener:

0.025 ml de GVB.

0.025 ml de la dilución del suero problema.

0.025 ml del antígeno de Toxoplasma gondii

a 2U.

0.025 ml de complemento a 2U.

Esta primera hilera sirve para identificar los anticuerpos presentes en el suero.

2.- La segunda hilera horizontal debe contener:

0.025 ml de GVB.

0.025 ml de la dilución del suero problema.

0.025 ml complemento a 2U.

Esta hilera sirve para observar anticomplementaridad que pudiese presentar el

suero problema. De esta manera los dos pasos anteriores deben de realizarse para cada suero problema.

- f) Junto con los sueros problema deben de correrse los siguientes controles ya detallados anteriormente.
- Control de suero positivo.
  - Control negativo del antígeno con el suero positivo.
  - Control de suero negativo.
  - Control de antígeno positivo conocido.
  - Una hilera sólo con GVB que posteriormente servirá para el control de eritrocitos sensibilizados.
- g) Agitar perfectamente las placas, taparlas con papel parafilm y dejar a 4 grados centigrados durante 18 a 24 horas.
- h) Al cabo de este tiempo colocar las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- i) Preparar una cantidad adecuada de eritrocitos sensibilizados y agregar a cada cávidad 0.050 ml.
- j) Agitar nuevamente las placas con el objeto de homogeneizar perfectamente, tapar e incubar a 37 grados centigrados en cámara húmeda durante 120 minutos, con agitación cada 15 minutos.
- k) Dejar sedimentar durante 15 minutos a 4 grados centigrados para interpretarlas, o bien para mayor rapidez y comodidad, centrifugar a 2000 r.p.m. durante 2 a 3 minutos en centrifuga refrigerada.
- l) Leer e interpretar.

## INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Para realizar la interpretación es necesario que todos los controles hayan funcionado correctamente; esto quiere decir que tanto el botón formado como el grado de hemólisis que se presente sea importante, de lo contrario la prueba debe repetirse. La prueba de fijación de complemento se considera positiva en las cavidades donde se presente una fijación tres o cuatro "cruces" del complemento, es decir, en las que se observó el botón completo y no hay prácticamente nada de hemólisis. El control de anticomplementaridad del suero debe presentar lisis completa, de lo contrario deberá repetirse la prueba inactivando el suero más tiempo, en lugar de tratarlo 30 minutos a 56 grados centígrados se inactivará durante 60 minutos a la misma temperatura.

## METODOLOGIA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

### I.- PREPARACION DE PLACAS CON EL ANTIGENO:

- 1) Se lavan portaobjetos con agua, jabón y secan perfectamente.
- 2) Colocar portaobjetos, los cuales se limpian previamente con alcohol, sobre una charola de aluminio limpia y seca.
- 3) Colocar 10 microlitros de la suspensión del antígeno de Toxoplasma, tratados con formaldehído en cada uno de los círculos del portaobjetos.
- 4) En cada portaobjetos se aplican ocho alícuotas de 10 microlitros cada una, formando dos columnas de pozos a cada columna le corresponden cuatro pozos, para las

diferentes diluciones del suero problema.

- 5) Los portaobjetos con los parásitos se dejan secar a temperatura ambiente, y se fijan al vidrio calentando este a 56-60 grados centígrados por 10 minutos.
- 6) Después de lo anterior las placas están listas para la reacción, de inmunofluorescencia indirecta. Se congelan a menos 20 grados centígrados para conservar lotes grandes.

## II.- TÉCNICA PARA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI):

- 1) Tomar una placa de microtitulación que puede tener fondo plano o fondo en U.
- 2) Cada columna corresponde a cada muestra.
- 3) Realizar las diluciones del suero problema de la siguiente manera: En el primer pozo se añaden 90 microlitros de PBS para Toxoplasma.
- 4) En los restantes 7 pozos de la misma columna se añaden 50 microlitros de PBS por pozo.
- 5) Tomar una muestra de suero y añadir con una micropipeta 10 microlitros en el primer pozo que tiene 90 microlitros de PBS lo que corresponde a una dilución de 1:10.
- 6) Agitar o mezclar el contenido del primer pozo con la micropipeta.
- 7) Tomar 50 microlitros de este primer pozo y añadirselos al segundo pozo que contiene 50 microlitros de PBS. Lo que corresponde a una dilución de 1:20.
- 8) Repetir la operación con los pozos restantes, desechando 50 microlitros en la última dilución. De esta manera se

habrán realizado diluciones del suero a 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640.

- 9) Durante la preparación de las diluciones al suero se pueden incubar las placas con el antígeno, durante 30 minutos y a 37 grados centígrados antes de su uso.
- 10) La estandarización del azul de Evans y del isotiocianato de fluoresceína-anti Ig G dieron títulos óptimos para Toxoplasma de 1:30 y 1:10 respectivamente. Se puede preparar la dilución del conjugado mientras transcurre el tiempo de incubación.
- 11) Después de transcurrido el tiempo de incubación de la placa con el antígeno se procede a aplicar 10 microlitros de cada una de las diluciones en cada uno de los pozos e incubar nuevamente durante 30 minutos a 37 grados centígrados.
- 12) A continuación se procede a lavar las placas con PBS con el fin de eliminar el exceso de suero.
- 13) Secar la placa y añadir 10 microlitros de conjugado a cada pozo.
- 14) Incubar durante 30 minutos a 37 grados centígrados.
- 15) Después de esto lavar la placa como en el paso 11 con el fin de eliminar el exceso de conjugado que no reacciona.
- 16) Dejar secar la placa evitando la exposición a la luz.
- 17) Añadir una pequeña cantidad de glicerina pH 7.6 a cada pozo, con el fin de mejorar la observación al microscopio de fluorescencia.

18) Lectura: Se observan varios campos. En las muestras negativas aparecen los parásitos teñidos de rojo debido a la tinción diferencial, mientras que en las muestras positivas los parásitos aparecen teñidos de un verde fluorescente, en algunos casos se observa teñido el parásito completamente y en otros sólo se observa la tinción verde-amarillo fluorescente en la periferia del del cuerpo del parásito (ver fotografía 1).



Fot. 1 Observación de tanizoides fluorescentes

CAPITULO IV

RESULTADOS

## R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos del grupo de 100 pacientes por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Fijación del Complemento (FC') fueron los siguientes los que se expresan como títulos de anticuerpos.

No. de Muestra.	I.F.I.	F.C'.
1.-	Neg.	Neg.
2.-	Neg.	Neg.
3.-	1:80	1:32
4.-	1:320	1:128
5.-	1:20	1:8
6.-	Neg.	Neg.
7.-	1:320	1:128
8.-	Neg.	Neg.
9.-	1:80	1:16
10.-	Neg.	Neg.
11.-	Neg.	Neg.
12.-	Neg.	Neg.
13.-	1:40	1:16
14.-	Neg.	Neg.
15.-	Neg.	Neg.
16.-	1:20	Neg.
17.-	Neg.	Neg.
18.-	1:20	1:16
19.-	Neg.	Neg.
20.-	Neg.	Neg.

No. de muestra.	I.F.I.	FC'
21.-	1:20	Neg.
22.-	Neg.	Neg.
23.-	Neg.	Neg.
24.-	Neg.	Neg.
25.-	Neg.	Neg.
26.-	Neg.	Neg.
27.-	Neg.	Neg.
28.-	1:20	1:8
29.-	1:40	1:16
30.-	1:20	Neg.
31.-	Neg.	Neg.
32.-	1:20	1:8
33.-	Neg.	Neg.
34.-	1:20	1:16
35.-	1:20	1:8
36.-	Neg.	1:4
37.-	Neg.	Neg.
38.-	Neg.	Neg.
39.-	Neg.	Neg.
40.-	Neg.	Neg.
41.-	Neg.	1:32
42.-	Neg.	Neg.
43.-	1:320	1:64
44.-	Neg.	Neg.
45.-	Neg.	Neg.
46.-	1:20	1:8

No. de muestra	I.F.I.	FC'
47.-	Neg.	Neg.
48.-	Neg.	Neg.
49.-	Neg.	Neg.
50.-	Neg.	Neg.
51.-	Neg.	Neg.
52.-	Neg.	Neg.
53.-	Neg.	Neg.
54.-	Neg.	Neg.
55.-	Neg.	Neg.
56.-	Neg.	Neg.
57.-	Neg.	Neg.
58.-	Neg.	Neg.
59.-	Neg.	Neg.
60.-	Neg.	Neg.
61.-	Neg.	Neg.
62.-	Neg.	Neg.
63.-	1:320	1:32
64.-	Neg.	1:2
65.-	Neg.	Neg.
66.-	1:20	1:4
67.-	1:80	1:16
68.-	1:20	1:8
69.-	Neg.	Neg.
70.-	Neg.	Neg.
71.-	Neg.	Neg.
72.-	Neg.	Neg.
73.-	Neg.	Neg.

No. de muestra	I.F.I.	FC <sup>1</sup>
74.-	Neg.	Neg.
75.-	Neg.	Neg.
76.-	Neg.	Neg.
77.-	Neg.	Neg.
78.-	Neg.	Neg.
79.-	1:20	1:4
80.-	1:80	1:64
81.-	1:320	1:128
82.-	Neg.	Neg.
83.-	Neg.	Neg.
84.-	Neg.	Neg.
85.-	Neg.	Neg.
86.-	1:20	1:4
87.-	Neg.	Neg.
88.-	Neg.	Neg.
89.-	Neg.	Neg.
90.-	Neg.	Neg.
91.-	1:80	1:32
92.-	1:80	1:64
93.-	Neg.	Neg.
94.-	Neg.	Neg.
95.-	Neg.	Neg.
96.-	1:20	1:4
97.-	1:80	1:64
98.-	1:20	1:4
99.-	1:320	1:128
100.-	1:160	1:64

MANIFESTACIONES CLINICAS ENCONTRADAS  
EN PACIENTES CON TOXOPLASMOISIS Y CON SEROLOGIA POSITIVA.

MANIFESTACION	No.	%
Ictericia	11	34
Daños oculares	10	31
- Conjuntivitis		
- Microftalmia		
- Opacidad corneal		
- Corioretinitis		
Microcefalia	8	25
Convulsiones	7	22
Hidrocefalia	6	18
Hepatoesplenomegalia	6	18
Dermatitis	5	16

RELACION DE TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA Toxoplasma gondii  
 CON LOS DATOS CLINICOS (INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA )

No. DE CASOS

TITULOS / DAÑO	A	B	C	D	E	F	G
1:20	4	5	4	1	0	2	0
1:40	0	2	2	2	1	1	1
1:80	1	1	3	2	2	2	2
1:160	0	1	0	0	1	0	1
1:320	0	2	1	3	2	1	3

A: Dermatitis

B: Ictericia

C: Daños Oculares

D: Microcefalia

E: Hidrocefalia

F: Hepatoesplenomegalia

G: Convulsiones

PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA Toxoplasma gondii  
 RELACIONADA AL CUADRO CLINICO ( FIJACION DEL COMPLEMENTO ).

No. de casos.

TITULO / DAÑO	A	B	C	D	E	F	G
1:2	0	0	0	0	0	1	1
1:4	0	1	0	0	0	1	0
1:8	1	1	2	1	0	1	0
1:16	2	4	4	1	1	2	2
1:32	2	1	3	2	2	1	2
1:64	0	1	1	2	1	0	1
1:128	0	2	1	2	2	0	1

A: Dermatitis

B: Ictericia

C: Lesiones oculares

D: Microcefalia

E: Hidrocefalia

F: Hepatoesplenomegalia

G: Convulsiones

CARACTERISTICAS GENERALES DE LA POBLACION  
MATERNA ESTUDIADA

DATOS	%
Convivencia con gatos	6
Abortos anteriores	4
Residencia rural	35
Población marginada	93

COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON.

Con el fin de observar la correlación que existe entre las dos variables, se le aplicó el coeficiente de correlación obteniéndose los siguientes datos:

$$X = FC \quad Y = I.F.I.$$

Estadísticos obtenidos:

$$N = 100$$

$$\sum X = 1130$$

$$\sum Y = 3040$$

$$\sum X^2 = 92132$$

$$\sum Y^2 = 694400$$

$$\sum X Y = 231120$$

$$(\sum X)^2 = 1276900$$

$$(\sum Y)^2 = 9241600$$

$$\bar{X} = 11.3$$

$$\bar{Y} = 30.4$$

$$\text{Ecuación} \quad r = \frac{N \sum XY - \sum X \sum Y}{\sqrt{[N \sum X^2 - (\sum X)^2][N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

$$\text{Desarrollo} \quad r = \frac{100 (231120) - (1130) (3040)}{\sqrt{[100 (92132) - 1276900] [100 (694400) - (9241600)]}}$$

$$r = \frac{2311200 - 3435200}{\sqrt{[9213200 - 1276900] [69440000 - 9241600]}}$$

$$r = \frac{19676800}{\sqrt{[7936300] [60198400]}}$$

$$r = \frac{19676800}{21857552}$$

$$r = 0.90022$$

## ANALISIS DE REGRESION

Con el fin de evaluar los titulos de anticuerpos que detecta la FC<sup>1</sup> respecto de I.F.I. se realizó el estudio de regresión.

Ecuaciones :

$$Y = a + b X$$

$$b_{yx} = \frac{\sum XY - (\sum X)(\sum Y) / N}{\sum X^2 - (\sum X)^2 / N}$$

$$a_{yx} = \bar{Y} - b (\bar{X})$$

Desarrollo:

$$b_{yx} = \frac{231120 - [(1130)(3040) / 100]}{92132 - (1276900) / 100}$$

$$b_{yx} = \frac{196768}{79363}$$

$$b_{yx} = 2.4793418$$

$$a_{yx} = 30.4 - 2.4793418 (11.3)$$

$$a_{yx} = 2.383$$

Ecuación de Regresión

$$Y' = 2.383 + 2.4793 ( X )$$

## C A P I T U L O V

### ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

## ANALISIS DE RESULTADOS

Con el fin de evaluar estadísticamente los resultados obtenidos por las técnicas de fijación de complemento e inmunofluorescencia indirecta se realizaron los ensayos estadísticos de A) Coeficiente de correlación y B) Análisis por regresión lineal.

A) Correlación de Pearson: Mediante este ensayo se obtuvo el resultado de la relación que existe entre las dos variables (FC' e IFI) observándose una correlación positiva de 0.90022 (90.022 %), esto indica una relación directamente proporcional entre las técnicas de FC' e IFI empleadas en nuestro estudio. Esta comparación es interesante ya que nos permite relacionar los resultados de los títulos de anticuerpos en una misma población, aunque los dos métodos muestren diferentes títulos en la detección de sus niveles de anticuerpos Ig G e Ig M (ver cuadros de resultados).

B) Regresión lineal: Mediante esta técnica estadística se encontró la ecuación matemática que expresa la forma exacta de como están relacionadas ambas variables; obteniéndose la relación de I.F.I. en función de FC. La ecuación de ajuste es la siguiente:

$$Y = 2.383 + 2.4793 X$$

De esta manera en el caso de obtener títulos de anticuerpo por FC', los correspondientes a la técnica de I.F.I. pueden ser los siguientes:

FC'	I.F.I.
1:8	1:22.2 ~ 1:20
1:16	1:42.05 ~ 1:40
1:32	1:81.72 ~ 1:80
1:64	1:161.05 ~ 1:160
1:128	1:319.73 ~ 1:320

De lo anterior podemos darnos cuenta del grado de relación entre estas dos técnicas. Muchas veces se llega a considerar que un coeficiente de correlación de 0.60 es bueno y aceptable para fines prácticos, sin embargo en el presente trabajo se obtuvo un coeficiente de correlación bastante bueno (0.90), lo cual habla de una muy buena correlación entre ambas variables. En los resultados obtenidos sólo se observó una excepción en cuanto a la correlación y fue el caso del suero no. 64, en este suero se observó que la prueba de I.F.I dio un título negativo, mientras que FC' dio un título 1:2. Este último título para fines prácticos se considera negativo, pero sin embargo de inmediato puede surgir la pregunta: ¿Cómo descartar falsos positivos y falsos negativos? A esto se responde que con el hecho de meter los controles ya mencionados que son los siguientes: control de suero positivo, control de anticomplementaridad de suero positivo, control de suero negativo, control de antígeno positivo, control de eritrocitos sensibilizados y control de complemento, la suma de todos ellos evita o hace muy difícil que la prueba de un falso positivo o negativo.

Se observa mediante la prueba de regresión lineal que ambas pruebas serológicas corren a la par en relación a sus títulos de anticuerpos, esto indica una relación directamente proporcional entre las dos técnicas; sin embargo se observa con menor sensibilidad la prueba de Fijación del Complemento en relación a los títulos que se anotan por el método de inmunofluorescencia, posiblemente se deba a factores inherentes al isotipo determinado, y el determinante antigénico que está expuesto. En principio es importante tomar en cuenta que los sueros son de pacientes asistentes a la consulta externa u hospitalizados debido a cualquiera de los trastornos patológicos que se incluyen en el Síndrome de TORCH y de acuerdo con esto se puede decir que los pacientes pueden estar en fase activa de infección pero con evolución mayor de 18 semanas.

Sabemos además que generalmente al comienzo de una infección, el primer isotipo de inmunoglobulina que se reconoce es la Ig M y que puede estar presente desde las primeras semanas de infección hasta algunos meses después. La variedad Ig G aparece después de iniciada la infección y la elevación es lenta durante dos a cuatro semanas y alcanza su máximo en tres y seis meses. Por otra parte se sabe que la Ig M puede tener mayor capacidad para fijar complemento en relación a la Ig G debido a su condición de pentámero, pero a su vez muchas veces el alto ascenso de Ig G puede competir por los determinantes antigénicos de la Ig M. Aunque se sabe que existe cierta especificidad porque se han identificado por inmunoblot franjas de 4 KDa las cuales tienen afinidad por la Ig M y otras bandas de 35 KDa las que muestran afinidad por la Ig G, además de saber que al realizar un fijado

de taquizoitos de fase activa en acetona sólo son reactivos frente a la Ig G, mientras que el fijado de taquizoitos de fase crónica son reactivos tanto a la Ig M como a la Ig G; lo que indica cierta relación de la Ig G por la membrana del taquizoito, mientras que la membrana del bradizoito muestra afinidad por Ig G e Ig M. De esto la importancia del punto en el que se leyeron los títulos de anticuerpos, así como los isotipos de inmunoglobulina que se midieron preferentemente en todos los ensayos

Entre los datos más comunes encontrados en muestras positivas para la infección de Toxoplasma gondii fueron los siguientes: Ictericia, lesiones oculares, Microcefalia, Convulsiones, Hidrocefalia, Hepatoesplenomegalia y dermatitis.

La incidencia de cada uno de los anteriores datos clínicos encontrados es la siguiente: En el caso de la ictericia, esta se observó en un 34 % de las muestras positivas y se relacionó con títulos comprendidos entre 1:20 y 1:40 para Inmunofluorescencia y 1:16 para fijación del complemento; las lesiones oculares alcanzaron un porcentaje en muestras positivas del 31 %, observándose un mayor número en el caso de títulos entre 1:20 a 1:80 por I.F.I. y 1:16 a 1:32 para F C'; la microcefalia se observó hasta en 8 % de los pacientes para Toxoplasmosis y el mayor número de casos se relacionó con títulos 1:320 por I.F.I. mientras que en el caso de F C' se observa más distribuido entre los títulos de 1:32 hasta 1:128; las convulsiones se observan en un 7 % de los pacientes con Toxoplasmosis y se relacionan con títulos de anticuerpos de 1:320 por I.F.I. y 1:32 por F C', estos mismos se observan para el caso de hidrocefalia; mientras que la

hepatoesplenomegalia y la dermatitis se observa en un 6 % y 5 % respectivamente, observándose títulos de anticuerpos 1:20 por I.F.I. mientras que por F C' se observa 1 :16 preferentemente. Se observa de inmediato que la microcefalia y las convulsiones están claramente relacionadas con títulos elevados de anticuerpos antitoxoplasma ( 1:320 para I.F.I y 1:128 para F C' ), mientras que las otras patologías se relacionan con títulos intermedios de anticuerpos.

Otros datos de importancia observados en pacientes con infección de toxoplasmosis fueron en relación a la convivencia con gatos, sólo el 6 % de los pacientes de acuerdo a su historia clínica convivían con ellos. Los casos de aborto se observaron en un 8 % de esos pacientes, un dato más sobresaliente fue con la residencia rural del paciente, el 35 % de los pacientes positivos a toxoplasmosis viven en un ambiente rural, se observa además que el 93 % de todos estos pacientes viven en condiciones socioeconómicas y culturales muy deficientes lo cual se relaciona al igual que muchas otras infecciones con su incidencia.

Los datos clínicos antes señalados no son específicos de la toxoplasmosis debido a que también se observan en infecciones por otros microorganismos como son: Citomegalovirus, Herpes, Rubeola y Sífilis. En el caso de los Citomegalovirus estos producen infecciones que principalmente se pueden activar durante el embarazo y el cuadro clínico que a menudo se refiere es insuficiencia hepática o renal, neumonía y síntomas neurológicos; la infección por Herpes incluye principalmente un cuadro

manifestado por erupción papulo-vesicular; la rubeola en el caso de la infección congénita puede manifestar algunos padecimientos como abortos (principalmente durante el primer trimestre) y si sobrevive puede padecer sordera, cataratas, anomalías cardíacas, microcefalia u otras lesiones congénitas, además de padecer hepatoesplenomegalia, ictericia, anemia e insuficiencia de peso al nacer. En el caso de la Sífilis en etapa secundaria suele observarse un exantema cutáneo generalizado y también lesiones en ojos, huesos, articulaciones o Sistema nervioso central. Las patologías de los microorganismos antes mencionados, también están presentes en algunos pacientes con títulos positivos a Toxoplasma gondii, por lo que el parásito forma parte del del síndrome de TORCH.

## CONCLUSIONES

La infección por toxoplasmosis al igual que muchas, provoca en el organismo humano una respuesta inmune humoral que esta encaminada a menguar la infección por el microorganismo. De esta manera comienza la producción de anticuerpos Ig M e Ig G específicos a Toxoplasma gondii. En el presente trabajo se compararon las técnicas serológicas de FC'e I.F.I para la detección de anticuerpos antitoxoplasma, observándose una relación directamente proporcional entre ambas técnicas: es decir corrieron las pruebas muy parejas en cuanto a la detección anticuerpos; pero se observó que la prueba de I.F.I. fue más sensible en relación a FC' en cuanto a la detección de anticuerpos, sin embargo la prueba de FC' es también adecuada y para el caso de relación con I.F.I. se encontró la ecuación que relaciona ambas pruebas.

El interés por las técnicas de diagnóstico que relacionen sus títulos de anticuerpos a determinar es muy justificado porque de ello depende un diagnóstico preciso de la toxoplasmosis y más aun en el caso de que es difícil por medios clínicos deducir la infección, debido a que existen otros microorganismos que presentan el mismo cuadro clínico y que además como se observa en este trabajo, es difícil discriminar la infección por un microorganismo u otro de los correspondientes al síndrome de TORCH.

En cuanto a la relación de los títulos de anticuerpos con los signos clínicos, se pudo observar que no muestran especificidad para un título, pero para el caso de grado de daño se observa que la hidrocefalia, microcefalia y convulsiones se relacionaron con títulos de anticuerpos altos (1:320 por I.F.I. y hasta 1:128); mientras que otros signos clínicos como la ictericia, lesiones oculares, hepatoesplenomegalia, dermatitis mantienen títulos intermedio de anticuerpos para Toxoplasma gondii; Por lo tanto se puede hablar de una pequeña relación de los cuadros clínicos como hidrocefalia, microcefalia y convulsiones cerebrales con altos títulos de anticuerpos para I.F.I y F.C.

Una cuestión muy importante es el costo económico del diagnóstico por el laboratorio de infección por Toxoplasma gondii. Muchas veces las personas que acuden para que se les realice un estudio serológico no cuentan con los recursos económicos o representa un porcentaje muy alto en sus ingresos, que aunado al hecho de que el cuadro clínico no es específico de Toxoplasma esto representa un alto costo. Actualmente el estudio serológico de I.F.I. tiene un costo alrededor de 60 mil pesos mientras que el de F.C' es de aproximadamente 30 mil pesos. Así es que con la correcta evaluación serológica de estas dos técnicas podemos darnos cuenta que en el caso de realizar el estudio por la técnica más económica que es F. C', se observa que títulos por encima de 1:32 son críticos y se piensa por tanto en un daño claro por Toxoplasmosis; en el caso de I.F.I. títulos de 1:20 pueden ser representativos de daño. De esta manera es posible evaluar la infección por Toxoplasmosis sin el menor

riesgo a equivocarnos en cuanto a la severidad, daño o algún problema de reactividad cruzada respecto de los títulos de anticuerpos observados.

Finalmente es importante remarcar la importancia de este trabajo respecto del incremento observado en el número de casos con SIDA. Necesariamente hay una tendencia a incremento de casos de Toxoplasmosis por lo tanto es muy importante estar documentado sobre todos aquellos aspectos que involucran al parásito con el fin de evitar una potencial infección y algún efecto desastroso por Toxoplasma gondii.

**A P E N D I C E**

## PREPARACION DE SOLUCIONES.

### SOLUCION SALINA DE FOSFATOS pH 7.2 (PBS):

Se prepara a partir de una solución de fosfato monoácido ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y una solución de fosfato diácido, completando el volumen con solución salina 0.85 %

Fosfato monoácido 0.1 M ..... 71.5 ml

Fosfato diácido 0.1 M ..... 28.5 ml

Solución salina 0.85 % ..... 900 ml

### SOLUCION AMORTIGUADORA DE GELATINA-VERONAL-BARBITURAL (GVB):

En un matraz volumétrico de 1000 ml, se agregan todas las sales de la solución I (que se detalla más adelante) y agua destilada hasta lograr la disolución completa de las sales y se afora a la marca con agua destilada. En un matraz erlenmeyer de 1000 ml colocar 800 ml agua destilada hasta el punto de ebullición; agregar gelatina y esperar hasta que se disuelva totalmente. Retirar del fuego y agregar el ácido dietil barbitúrico; agitar hasta disolución total y dejar enfriar a temperatura ambiente, hasta que se iguale a esta (no enfriar a chorro de agua). Mezclar ambas soluciones en un matraz volumétrico de 2000 ml y agregar 10 ml de la solución III antes de aforar, aforar hasta la marca con agua destilada. Proceder a medir el pH el cual debe ser de 7.6; guardar la solución amortiguadora en un frasco limpio, de ser posible estéril y a una temperatura de 4 grados centígrados con el objeto de evitar en lo posible las contaminaciones.

### SOLUCION I

Cloruro de Sodio ..... 85g.  
Diethyl-Barbiturato de Sodio ..... 3.25 g  
Agua destilada c.b.p. .... 1000 ml.

### SOLUCION II

Agua destilada caliente..... 800 ml.  
Ac. diethyl-barbiturico ..... 5.75 g.  
Gelatina ..... 2.0 g.

### SOLUCION III

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.0 M ..... 10 g.  
CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.3 M ..... 1 g.  
Agua destilada c.b.p. .... 1000 ml.

**SOLUCION ANTICOAGULANTE ALSEVER:**

La solución Alsever es una solución isotónica que permite preservar la sangre de carnero en refrigeración cerca de diez semanas.

**Formula**

Dextrosa ..... 20.5 g  
Citrato de Sodio ..... 8.0 g.  
Ac. Citrico ..... 0.55 g.  
Agua destilada c.b.p..1000 ml

**CONJUGADO DE ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA - ANTI Ig G HUMANA:**

Se utilizo conjugado comercial de los laboratorios Beringh a una dilución 1:30.

**GLICERINA pH 7.2:**

Glicerina ..... 9 ml.  
PBS 7.2 ..... 1 ml.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Beck, W. J. 1984. "Parasitología Medica" 3a ed. Editorial Interamericana. México D.F. pp 84-90.
- 2.- Biagi, F. 1986. "Enfermedades Parasitarias" 2a. ed. Prensa Medica Mexicana. pp 171-182.
- 3.- Faust, C. E. 1975. "Parásitología Clínica" 2a. reimp. Editorial Salvat. México D.F. pp 229-235.
- 4.- Nelson E, W. 1971. "Tratado de Pediatría" 6a. ed. Tomo I. Editorial Salvat. México D.F. pp 757-760.
- 5.- Lee, V. R. 1988 "Parasites and Pregnancy: The problems of Malaria and Toxoplasmosis" Clinics in Perinatology. June 15 (2), 351-358.
- 6.- Siragusa, J.J. 1988. "Toxoplasmosis: The time has come" The New Engl. J. Med. 318; 313-316.
- 7.- Fernandez, T. M. et al. 1986. "Encuesta seroepidemiológica de anticuerpos antitoxoplasma gondii en 125 mujeres embarazadas del oriente del estado de tabasco. Bol. Med. Infant. México 43, 5, 274-278.
- 8.- Calderón, J. E. et al. 1985. "Interpretación de las pruebas inmunoserológicas para el diagnostico de la Toxoplasmosis. Infectología año V,10, 258-263.
- 9.- Koskiniemi, M. et al. 1989 "Toxoplasmosis Needs Evaluation" A.J.D.C. 143, 724-728.
- 10.- Hedman, K. et al. 1989 "Recent primary Toxoplasma Infection Indicated by a low avidity of specific Ig G" The J. Infect. Dis. 159, 4, 736-740.

- 11.- Fischl, A. M. 1985 "Tuberculous brain abscess and Toxoplasma encephalitis in a patient with the acquired Immunodeficiency Syndrome" J.A.M.A. 253, 23, 3428-3430.
- 12.- Suzuki, Y. et al. 1989 "Differences in Virulence and Development of Encephalitis during chronic infection vary with the strain of Toxoplasma gondii" J. Infect. Dis. 159, 4, 790-794.
- 13.- Desmonts, G. C. 1974 "Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies" New Engl. J. Med. Vol. 290, 1110-1116.
- 14.- Feldman, A. H. 1958 "Toxoplasmosis" Pediatrics, Sept. 559-571.
- 15.- Daffos, F. et al. 1988 "Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital Toxoplasmosis" The New England and Journal of Medicine. 318, 5, 271-275.
- 16.- Garcia, R. J. 1986 "Toxoplasmosis ocular en nifost Estudio de 33 casos. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 43, 12, 769-772.
- 17.- Magid, K. S. 1983 "Serologic Evidence for acute Toxoplasmosis in polymyositis-dermatomyositis increased frequency of specific antitoxoplasma Ig M antibodies" Am. J. Med. 75, 313-319.
- 18.- Pomesory, C. et al. 1989 "Reactivation of Toxoplasma gondii by Cytomegalovirus disease in mice: Antimicrobial activities of macrophages" J. Infect. Dis. 160, 2, 305-311.
- 19.- Allegra, J. C. et al. 1987 "Potent in vitro and in vivo antitoxoplasma activity of the lipid-soluble antifolate trimetrexate" J. Clin. Invest. 79, 478-482.

- 20.- Kovacs, A. J. et al. 1989 "Characterization of novo folate syntesis in Pheumocystis carini and Toxoplasma gondii: Potential for screening therapeutic agents" J. Infect. Dis. 160, 2. 312-314.
- 21.- Calderón, J. E. 1986. "Respuesta Inmune a la toxoplasmosis" Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 43, 10, 658-661.
- 22.- Roitt, M. I. 1986. "Inmunologia" Ed. Medsi, Barcelona España. 8-1-8-8.
- 23.- Nasrallah, R. E. 1986 "Toxoplasmosis como riesgo perinatal" Bol. Med. Hosp. Infantil México. 43, 10, 662-664.
- 24.- Sulzer, J. A. et al. 1986. "An oocyst- transmitted outbreak of toxoplasmosis patterns of immunoglobulin G and M over one year" Am. J. Trop. Med. Hyg. 35,2, 290-296.
- 25.- Potasman, I. et al 1986 "Analysis of Toxoplasma gondii antigens reconized by human sera obtained before and after acute infection" J. Infect. Dis. 154, 4, 650-657.
- 26.- Susuki, Y. et al. 1988 "Antigens responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of Toxoplasma Infection in humans" J. Clin. Microbiol. 901-905.
- 27.- Stites, P. D. et al 1985 "Inmunologia básica y Clínica" 5a. ed. Manual Moderno S.A. México D.F. pp 119-131, 321-322, 342-348, 352-355.
- 28.- Koei, S. et al. 1987 "Detection of Toxoplasma Ig M antibody by passive latex agglutination reaction" Journal of Immunological Methods. 101, pp 183-191.

- 29.- Naginton, J. et al. 1983 "Technical method: A rapid method the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* using a modification of Toxoreagent latex test". *J. Clin. Pathol.* 36, 3, 361-362.
- 30.- Raizman, E. R. et al. 1975 "Detection of circulating antigen in acute experimental infectious with *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 132.1, 44-48.
- 31.- Lennette, H. E. et al 1979 "Dianostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial Infectious. 5a Ed. American Public Health Association Washington D.C. U.S.A. 153-159.
- 32.- Rotmans, J. et al. 1988 "Comparative study of three immunoassays for detection of Immunoglobulin M antibodies *Toxoplasma gondii*" *Europ. J. Clin. Microl. Infect. Dis.* 7,4, 535-539.
- 33.- De Sanches Nora et al. 1982 " Observaciones practicas para la patronización de la reacción de inmunofluorescencia Indirecta en el diagnostico de algunas enfermedades parasitarias" *Rev. Latinoamericana de Microbiologia. Ene-Mar; 24,1, 55-58.*
- 34.- Barret, T. J. 1972 "Inmunologia: Introducción a al Inmunofísica y a la Inmunobiología" Ed. Interamerican; México D.F. pp 134-147.
- 35.- Davis, D. B. et al 1979 " Tratado de Microbiología" 2a ed. Ed. Salvat, Barcelona España. pp 533-547, 414-417, 427-437.
- 36.- Boletin informativo de H.I.M. 1987 "Encuesta serológica de anticuerpos antitoxoplasma en mujeres embarazadas. Vol. 44, Feb. 1987.

- 37.- Boletín informativo de H.I.M. 1987 "Prevalencia de anticuerpos para *Toxoplasma gondii* en adolescentes femeninas de estratos socioeconómicos diferentes" Vol 23, Sept. a Dic. No. 3, 2a. parte.
- 38.- Rytel, W.M. et al 1986 "Manual de enfermedades infecciosas" Ed. Interamericana. México D.F. pp 224-227.
- 39.- Shanks, G. D. 1987 "Toxoplasma encephalitis in a infant with Acquired Immunodeficiency Syndrome" Pediatric Infectious Disease. 6, 1, 70-71.
- 40.- Searinen, M. U. et al 1987 "Detection of *Toxoplasma gondii* in the spinal fluid of bone marrow trasplant recipient" Pediatric Infect. Dis. 6, 1, pp 81-83.
- 41.- Jones, C. T. et al, 1985 "H-2 complex linked resistance in Murine Toxoplasmosis" J.Infect. Dis. 151, 739-740.
- 42.- Murray, W. H. et al 1985 "Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: Oxygen-dependent vs. oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*" J. Immunol. 134, 3, 1982-1983.
- 43.- Sacks, J. J. et al. 1982 "Toxoplasmosis Infection Associated with raw goat's milk" J.A.M.A. 248, 1728-1732.
- 44.- Jackson, M.H. et al 1987 "A seroepidemiological survey of toxoplasma in Scotland and England" Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 81, 4, 359-365.
- 45.- Susuki, Y. et al, 1988 "Western Blot analysis of the antibody response of patients with A.I.D.S. and *Toxoplasma encephalitis*: Antigenic diversity among *Toxoplasma* strains" J. Infect. Dis. 157, 1, 7-13.

- 46.- Joun, C. F. 1985 "Serologic diagnostic of Toxoplasmosis with emphasis on the detection of Toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies.
- 47.- Brown, W. H. 1977 "Parasitologia Clinica" 4a. ed. Editorial Interamericana. México D.F. 63-68.
- 48.- O.M.S. 1969 "Toxoplasmosis: Informe de una reunion de investigadores de la O.M.S. en Ginebra" Informe NO. 431.
- 49.- Rich, A. P. et al, 1984 "Purification of zoites from peritoneal exudates by eigh methods" Exp. Parasitol. Apr. 57, 2, 195-207.