



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



V N A M

'UTILIZACION DE LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION PASIVA
PARA LA DETECCION DE LA DINAMICA DE ANTICUERPOS
CONTRA
Toxoplasma gondii
EN CAPRINOS CON INFECCION EXPERIMENTAL'

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
JORGE ENRIQUE SAINZ MONTOYA

Asesor: M. V. Z. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz

CUAUTITLAN-IZCALLI, EDO. DE MEX. 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAG.
RESUMEN	1
1.- INTRODUCCION	3
2.- TOXOPLASMOSIS	6
2.1 Etiología	7
2.2 Ciclo biológico	8
2.3 Epizootiología	10
2.4 Patogenia	12
2.5 Signos clínicos y lesiones	12
2.6 Diagnóstico	16
2.7 Tratamiento	20
2.8 Control	21
3.- OBJETIVOS	25

4.- MATERIAL Y METODOS	26
4.1 Localización	26
4.2 Animales	26
4.3 Cepa	26
4.4 Inóculo	27
4.5 Diseño experimental	28
4.5.1 Lotificación de los animales	28
4.5.2 Inoculación	29
4.5.3 Obtención de muestras	29
4.5.4 Tratamiento y almacenamiento de muestras	30
4.5.5 Detección de anticuerpos contra <u>I.</u> <u>gondii</u> a través de la técnica de hemaglutinación pasiva o indirecta	30
A) Manejo de sueros	30
B) Controles	31
5.- RESULTADOS	33
6.- DISCUSION	37
7.- CONCLUSIONES	41
8.- APENDICE	42
9.- LITERATURA CITADA	51

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en el módulo de caprinos del Centro de Producción Agropecuaria y en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y consistió en inocular a un grupo de tres caprinos con trofozoitos de T. gondii, provenientes del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (I.S.E.T), dependiente de la Secretaría de Salud; a estos animales y a los de un grupo testigo, se les estuvo tomando muestras sanguíneas los días 17, 14, 9 y 3 antes de la inoculación, en el momento de la inoculación, diariamente del primero al séptimo día post-inoculación (PI), cada 48 horas del séptimo al décimo noveno día PI y cada 120 horas del día 19 al día 45 PI.

De las muestras obtenidas se uso el suero, el que fue evaluado mediante el uso de la técnica de hemaglutinación pasiva, para así poder determinar los títulos de producción de anticuerpos durante las distintas fases de la infección y antes de la inoculación, y así estructurar una curva de producción de los mismos.

Con base en el análisis de los resultados obtenidos, se detectó una muy baja producción de anticuerpos, dado que los sueros procedentes del lote experimental no mostraron un título superior promedio a 1:16, que fue cuando se llegó al pico máximo, dándose esto en las muestras obtenidas los días 15, 17, 19 y 24 post-inoculación, para posteriormente descender en forma paulatina y estabilizarse del día 39 al día 45 en 1:16; lo anterior es atribuible a que al

inicio del trabajo los caprinos mostraron títulos bajos de 1:2, 1:4 y 1:8, no existiendo la posibilidad de encontrar animales seronegativos; ésto debido a que probablemente ya padecían una toxoplasmosis crónica ya sea congénita o adquirida; lo cual hace pensar en una respuesta inmune previamente montada.

Finalmente se ve que la técnica de hemaglutinación pasiva posee mucha sensibilidad, pero poca especificidad, pudiendo ser muy útil para estudios de seroprevalencia, donde interesa conocer el estado inmunológico de los animales de un hato o una región, sin embargo, si se quiere hacer el estudio de casos con evidencia clínica de abortos, se cuenta con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que es el método idóneo para confirmar una infección aguda, en donde un título único de 1:80 o más es suficiente para fundamentar el diagnóstico.

INTRODUCCION

La cabra es un animal que posee su propio sitio ecológico dentro de la producción pecuaria, su número e importancia económica en el mundo son considerables, sin embargo su atención ha sido relegada a lugares secundarios (FAO, 1988).

Desde la época prehistórica el hombre ha utilizado a las cabras y hasta donde se sabe, éstas fueron los primeros animales domesticados después del perro (FAO, 1988).

Ha sido un animal de controversia dados sus hábitos de pastoreo. Como frecuentemente se le encuentra en terrenos sobrepastoreados, se dice que ella ha acabado con la vegetación y que por lo tanto es responsable de la erosión (FAO, 1988).

Sin embargo, es el hombre quien con frecuencia causa el deterioro de la vegetación, por un manejo inadecuado y el sobrepastoreo de los terrenos, a grado tal que sólo las cabras son capaces de sobrevivir en estos lugares (FAO, 1988).

Aunado a lo anterior, se ha argumentado que es la única culpable de la brucelosis humana (De la Fuente y Canales, 1981).

En respuesta a ésto, la cabra ha sido aislada y marginada a los medios peor dotados económicamente y menos cultos, en consecuencia sus problemas

de tipo sanitario, genético, de selección, alimentación, alojamiento y manejo se han desatendido (De la Fuente y Canales, 1981).

Reflejo de lo anterior es el hecho de que en los últimos 20 años, la producción caprina en Europa ha declinado en forma regular, hasta casi llegar a la desaparición de esta especie animal en el ámbito económico, esta situación también se observa en los países mediterráneos donde aún la población caprina es importante (Le Jaouen, 1981).

En México y América Latina la población caprina ha disminuido progresivamente en los últimos decenios, llegando casi a su desaparición total en esos lugares (Peraza, 1981).

Dada su versatilidad y rusticidad, la cabra es más abundante en las zonas más áridas y pobres del país, como por ejemplo: La mixteca oaxaqueña, el sur de Nuevo León, San Luis Potosí, la región montañosa de Guerrero, Baja California Sur, partes de Tamaulipas, las zonas semiáridas de Hidalgo y Puebla, la zona árida de Chihuahua, el centro y norte de Coahuila, el bajío y Yucatán (Casas y Fernández, 1981).

Actualmente la gente que posee caprinos es generalmente de pocos recursos y su vida depende de la explotación de estos animales (FAO, 1988).

La mayoría de las explotaciones en México son de tipo extensivo, con un manejo rústico y poco tecnificado. En la actualidad la caprinocultura en el país

ha tendido a entrar en una etapa de tecnificación de las explotaciones y a la optimización racional de los recursos forestales de algunas zonas del país en las que se explota esta especie (De la Fuente y Canales, 1981), y se ha orientado hacia la producción de leche, carne y pieles (Montaldo y Sánchez, 1981).

Debido a que los 40 millones de cabras existentes en América Latina se encuentran en regiones aisladas con suelos poco fértiles y que la gente que las explota no está bien capacitada y tiene pocos recursos, los animales están mal alimentados y mal manejados (FAO, 1988); ésto da lugar a una producción deficiente y paralelamente a una mayor predisposición a enfermedades tales como la toxoplasmosis, cuya relevancia radica en las pérdidas económicas ocasionadas por abortos, interferencia con la producción de leche y carne y por los problemas de salud pública que provoca (Polydorov, 1979; Carrada, 1983).

TOXOPLASMOSIS

La toxoplasmosis caprina, también llamada coccidiosis tisular o aborto toxoplásmico es una enfermedad infecciosa parasitaria de distribución cosmopolita perteneciente al grupo de las enfermedades antroponozoonóticas, cuyo agente patógeno es el Toxoplasma gondii que fue aislado a principios de este siglo en roedores silvestres del género Ctenodactylus gondii por Nicolle y Mancoaux (Villegas *et al.*, 1977; Leyva, 1979 y Soulsby, 1982). Este esporozooario heterógeno utiliza al gato como hospedador definitivo y a una gran variedad de animales como aves, roedores, animales herbívoros y carnívoros, incluyendo las especies domésticas y el hombre como hospedadores intermediarios.

Se piensa que la toxoplasmosis puede ser importante como causa de considerables pérdidas reproductivas de los caprinos en México (Rodríguez y Vega, 1986).

Etiología

Toxoplasma gondii, clasificación según Levine y col (1980) citado por Soulsby (1982).

Reino	:	Animalia
Subreino	:	Protozoa
Phylum	:	Apicomplexa
Clase	:	Sporozoea
Subclase	:	Coccidia
Orden	:	Eucoccidiida
Suborden	:	Eimeriina
Familia	:	Sarcocystidae
Subfamilia	:	Toxoplasmatinae
Género	:	<u>Toxoplasma</u>
Especie	:	<u>I. gondii</u>

Según Soulsby (1982) el Toxoplasma gondii es un protozoo heterógeno, que se encuentra intraepitelialmente en los felinos y se le puede encontrar en cualquiera de las tres formas siguientes:

a.- Ooquistes. Los ooquistes son eliminados por las células epiteliales y excretados en las heces de los gatos y otros felinos; tienen forma esférica y miden de 10 a 12 micrómetros. Su tiempo de esporulación en el ambiente, después de ser excretados es de 2 a 3 días a una temperatura de 24°C y

contienen dos esporoquistes, cada uno de los cuales contiene cuatro esporozoitos.

b.- Quiste. Son agregados de más de 60,000 bradizoitos y pueden medir más de 100 micrómetros de diámetro. Los bradizoitos contenidos en quistes son estados de lenta multiplicación y son característicos de infecciones crónicas; se multiplican por endodiogenia y se localizan principalmente en cerebro, corazón y músculo esquelético.

c.- Taquizoito. Son estados de rápida multiplicación que se encuentran en tejidos extraintestinales de gatos, otros mamíferos y gran número de aves; tienen forma de media luna, miden de 4 a 7 micrómetros y se dividen por endodiogenia. Esta es la forma proliferativa y se observa durante el estado agudo de la infección.

Ciclo Biológico

El ciclo biológico es indirecto. Los gatos se infectan por la ingestión de ooquistes por contaminación fecal de su alimento y por la ingestión de taquizoitos o bradizoitos contenidos en la carne de los hospedadores intermediarios (Frenkel, 1973). Sin embargo Sharma y Dubey (1981) afirman que los taquizoitos son susceptibles al pH ácido del estómago, por tanto es baja la posibilidad de adquirir la infección a partir de esta fase por vía oral.

En el gato el parásito se localiza intraepitelialmente reproduciéndose sexualmente (gametogonia), resultando la producción de ooquistes, los cuales son eliminados por las células epiteliales y excretados en las heces. Estos bajo

condiciones de temperatura y humedad adecuadas, esporulan, formándose en cada ooquiste dos esporoquistes y éstos a su vez forman cuatro esporozoitos. Simultáneamente con el ciclo intraepitelial, en el gato también puede ocurrir el ciclo extraintestinal, los esporozoitos penetran a la lámina propia del intestino y se multiplican como taquizoitos, llegan a los nódulos linfáticos mesentéricos y órganos distantes (Frenkel, 1973).

En los hospedadores intermediarios, después de la ingestión de ooquistes esporulados, los esporozoitos son liberados y penetran en las paredes intestinales y los vasos sanguíneos produciendo una parasitemia y estableciéndose la forma de taquizoito.

El desarrollo del taquizoito se lleva a cabo en una gran variedad de tipos celulares que incluyen fibroblastos, hepatocitos, células reticulares, células miocárdicas y células del sistema retículo-histiocitario del sistema nervioso central (Soulsby, 1982). Los taquizoitos se multiplican asexualmente por repetidas endodiogonias. Generalmente se acumulan de 8 a 16 organismos en las células del hospedador que se desintegran e infectan a otras, por lo que el hospedador llega a morir debido a una toxoplasmosis aguda.

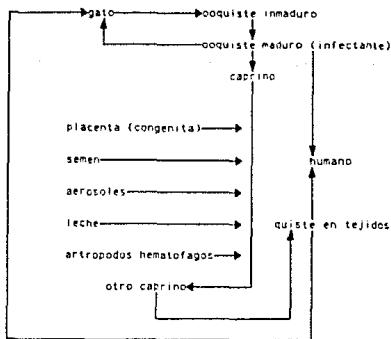
Dependiendo de la inmunidad puede ocurrir la formación de bradizoitos.

Si la inmunidad se debilita, los bradizoitos son capaces de iniciar nuevamente la formación de taquizoitos (Soulsby, 1982).

Epizootiología

Por el descubrimiento de que los felinos excretan ooquistes altamente resistentes, el gato es esencial en el ciclo de vida del parásito, por lo que se deduce que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en lugares donde la población de gatos es mayor y donde es más factible la contaminación de los alimentos y el agua de los animales con sus heces (Wallace, 1973).

En el siguiente esquema se anotan las principales formas de transmisión de la toxoplasmosis a los caprinos y entre ellos:



El gato al eliminar ooquistes en sus excrementos, representa la principal fuente de adquisición de la toxoplasmosis en los hospedadores intermediarios (caprino) ya que tales ooquistes están contaminando su alimento. Los ooquistes ingeridos por la cabra deberán estar esporulados (maduros) para que puedan ser infectantes. Para lo anterior es necesario que transcurran de 2 a 3 días y la infectividad de los ooquistes puede ser de semanas a meses bajo condiciones ambientales adecuadas (Quiroz, 1984).

La toxoplasmosis se trasmite de un caprino a otro de diversas maneras. La más importante desde el punto de vista clínico, es la congénita (placenta), cuyas características variarán dependiendo de la etapa de gestación de la cabra (Soulsby, 1982).

Asimismo, se ha reportado la presencia de *T. gondii* en el semen de los animales con toxoplasmosis aguda, sin embargo la eliminación del protozooario se limita a 7 semanas, por lo que su valor epizootiológico se reduce (Spence *et al.*, 1978 y Dubey y Sharma, 1980).

Las otras vías de transmisión, entre los mismos animales, aún no han sido totalmente demostradas en cabras, pero es importante aclarar, que en el caso de la leche (donde habría taquizoitos), es baja la probabilidad de adquirir la enfermedad, dado que el taquizoito es susceptible a la digestión gástrica y es destruido (Sharma y Dubey, 1981).

En el hombre la transmisión del T. gondii puede ser por consumir alimentos de origen animal crudos o mal cocidos, que contengan quistes del parásito.

Además se ha considerado también la transmisión por contacto sexual, lo mismo que por la saliva (Quiroz, 1984).

Patogenia

Después de la ingestión de los ooquistes o bradizoitos en quistes, el camino de la infección es en tracto intestinal (Frenkel, 1973), pasan a los nódulos linfáticos regionales y por vía porta al hígado, posteriormente pasan a otros órganos por vía sanguínea. El parásito se multiplica en forma de taquizoito produciendo áreas de necrosis en nódulos mesentéricos, intestino y muchos otros órganos tales como corazón, adrenales, etc. El proceso inflamatorio sigue a la necrosis inicial y 3 semanas después los taquizoitos empiezan a desaparecer de los tejidos viscerales, pero permanecen como quistes en tejido nervioso como cerebro y médula, dependiendo de la inmunidad. Si la inmunidad se debilita, los bradizoitos son capaces de iniciar nuevamente la formación de taquizoitos (Soulsby, 1982 y Quiroz, 1984).

Signos clínicos y lesiones

La infección por Toxoplasma es común, pero la enfermedad clínica asociada con ésta es relativamente rara. Wistphal y Bauer (1952) (citados por Soulsby 1982), mencionan que la toxoplasmosis no es una enfermedad, más bien parece haber una condición de simbiosis entre el hospedador y el parásito y

raramente ocurre el balance en favor del parásito. Cuando se da esta condición, los signos clínicos varían según la localización del parásito o de los órganos afectados.

La toxoplasmosis puede presentarse de dos formas, la aguda que puede ser adquirida o congénita y la crónica o latente (Cuéllar *et al.*, 1986).

Toxoplasmosis aguda adquirida.- El cuadro clínico es muy variable y depende del órgano afectado. Las cabras con este tipo de infección manifiestan signos digestivos como anorexia, diarrea y emaciación progresiva; signos nerviosos; fiebre; signos respiratorios; tos y disnea así como trastornos de gestación con abortos y fetos momificados (Watson, 1972; Timoney, 1976; Dubey *et al.*, 1980; Plant *et al.*, 1980; Soulsby, 1982 y Mehdi *et al.*, 1983).

Las lesiones encontradas en este tipo de infección son las siguientes: abomasitis, enteritis, inflamación de ganglios linfáticos mesentéricos, esplenomegalia, hepatomegalia con focos blancos de necrosis de 1 a 3 mm de diámetro, agrandamiento de páncreas, miocarditis, encefalitis, cistitis y cuando ocurre aborto hay necrosis de los cotiledones (Dubey *et al.*, 1980 y Mehdi *et al.*, 1983).

Toxoplasmosis aguda congénita.- Ocurre cuando el animal se infecta durante la gestación, y la severidad de aquella depende de la gestación y el tiempo de infección. En la gestación de 45 a 55 días causa muerte fetal y expulsión que raramente es posible observar. En gestaciones de 90 días resulta

muerte fetal y expulsión, y los organismos son fácilmente demostrables en la placenta y tejidos fetales (Dubey *et al.*, 1980). A los 120 días de gestación causa infección fetal pero no la muerte y los cabritos generalmente sobreviven (Soulsby, 1982). El aborto ocurre en el último mes de gestación.

En la patogenia de este tipo de toxoplasmosis los taquizoitos que llegan al aparato reproductor producen una placentitis alterando así el intercambio nutricional y de oxigenación, provocando que el producto muera cuando aún es un feto o bien que nazca con trastornos sobre todo cerebrales, también el parásito puede afectar directamente los órganos del producto (Soulsby, 1982).

Las lesiones encontradas en la placenta en este tipo de toxoplasmosis, consisten en focos de necrosis menores de 1 mm, calcificación de vellosidades cotiledonarias y presencia de taquizoitos (Dubey *et al.*, 1981 y Cuéllar *et al.*, 1986).

Al examen histológico de la placenta, sobre todo en los sitios donde la infección es poco activa, se observa edema del mesénquima con una moderada invasión difusa de células mononucleares siendo evidentes áreas focales de epitelio inflamado y necrosis con descamación. Donde hay áreas de trofoblastos puede resultar desprendimiento de nódulos necróticos. Los cotiledones muestran toxoplasmas intra y extracelularmente (Hartley y Marshall, 1957).

En los pulmones hay nódulos necróticos en el tejido parenquimatoso y exudado pleural. Los organismos pueden encontrarse en células alveolares, tráquea y bronquios (Soulsby, 1982 y Carrada, 1983).

Bazo e hígado se encuentran agrandados y los Toxoplasmas se encuentran en las células hepáticas del epitelio de los conductos biliares así como en las células retículo endoteliales del bazo.

En los estadios tempranos de la enfermedad las lesiones consisten en daño a las paredes vasculares produciendo inflamación endotelial, edema perivascular y proliferación de células de la adventicia con calcificación de la pared vascular (Soulsby, 1982).

Asimismo hay necrosis focal de hígado, hidrotórax, ascitis y enteritis; también se reportan lesiones oculares como coriorretinitis (Watson, 1972; Timoney, 1976; Soulsby, 1982 y Carrada, 1983).

El producto presenta: Encefalomiелitis no supurativa caracterizada por infiltración perivascular con células mononucleares, proliferación glial, necrosis central en cerebro, cerebelo, médula y cordón espinal. Hay presencia de focos de infiltración mononuclear en meninges, lengua, músculo esquelético, hígado y vasos sanguíneos (Munday y Mason, 1979 y Plant et al., 1980).

Toxoplasmosis crónica.- Este tipo de toxoplasmosis pasa completamente inadvertida, y se considera como el resultado de una infección aguda. En este

caso no hay reacción inflamatoria porque el Toxoplasma se aísla y se enquista (Timoney, 1976 y Carrada, 1983).

Diagnóstico

El diagnóstico de la toxoplasmosis desde el punto de vista clínico es usualmente difícil por la gran variedad de signos clínicos que presenta, porque la forma diseminada no es común y porque el aborto es seguido por una infección subclínica (Mehdi et al., 1983).

En el gato se utiliza la prueba de flotación para identificar los ooquistes del parásito en las heces (Rodríguez y Vega, 1986).

En el caprino y demás especies domésticas el diagnóstico más convencional es el de laboratorio, en el que se recurre muchas veces a hacer la demostración del organismo (métodos directos) o de los anticuerpos contra éste (métodos indirectos).

Métodos directos:

Inoculación de ratones con muestras sospechosas. Estos ratones son sacrificados días después de la inoculación y se observa el parásito ya sea en frotis de líquido peritoneal o cortes histológicos de cerebro (Soulsby, 1982).

Observación microscópica. El parásito puede demostrarse en cortes microscópicos de diversos órganos, teñidos con el método de PAS o con tinción argéntica de Grocott aunque la sensibilidad de la técnica se incrementa considerablemente con el uso de anticuerpos fluorescentes o de la microscopía electrónica (Villegas *et al.*, 1977 y Carrada, 1983).

Métodos indirectos:

Prueba de Sabin y Feldman. Es una prueba de neutralización basada en que los anticuerpos actúan sobre la pared del parásito incrementando su capacidad de captación del colorante azul de metileno alcalino (Soulsby, 1982).

Prueba de fijación de complemento. En este caso los anticuerpos fijadores de complemento generalmente aparecen después y desaparecen antes que los que se detectan por otras pruebas, y, en muchos casos, los anticuerpos no son evidentes cuando los signos clínicos desaparecen; su utilidad principal radica en usarla conjuntamente con otros métodos cuando se intenta confirmar la existencia de una infección aguda (Soulsby, 1982 y Carrada, 1983).

La inmunofluorescencia indirecta es un método económico, fácil, sensible y seguro. Los títulos de anticuerpos IgG medidos con esta técnica, son paralelos a los obtenidos mediante la técnica de Sabin-Feldman; haciéndose presentes a las dos semanas de la infección y alcanzando títulos $>1:1000$ o más de 6-8 semanas, los cuales disminuyen gradualmente en meses o años con valores persistentes entre 1:4 y 1:64.

La prueba de anticuerpos fluorescentes IgM, permite diagnosticar infecciones recientes, hasta de cinco días. La presencia de IgM en recién nacidos es un indicio seguro de infección prenatal; sin embargo, este método puede ser negativo en animales con problemas de inmunodeficiencias, o toxoplasmosis aguda (Carrada, 1983).

Prueba de hemaglutinación pasiva. Es una prueba en la cual los sistemas de precipitación se convierten en sistemas de aglutinación, y ésto consiste en adsorber antígenos solubles a una partícula grande e insoluble, como son los eritrocitos (Bautista y Morilla, 1978).

En general estas pruebas se usan más en medicina humana o en trabajos de investigación, siendo sus rangos de confiabilidad muy elevados.

Además para fortalecer el diagnóstico de este padecimiento existen diversos procedimientos, entre los que se pueden señalar los siguientes:

Aglutinación directa (Watson, 1972).

Difusión en gel de agar (Watson, 1972).

ELISA (Carrada, 1983; Turunen *et al.*, 1983; Wielaard *et al.*, 1983 y Tizard, 1988).

Impregnación argéntica de Grocott (Villegas *et al.*, 1977 y Carrada, 1983).

Impregnación argéntica de Wilder (Villegas *et al.*, 1977).

Prueba de látex sensibilizado de Garín y Despeiges (Leyva, 1979).

Radioinmunoanálisis (Carrada, 1983).

Reacción azul alciana (Villegas *et al.*, 1977).

Técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes (Fletcher, 1965; Watson, 1972; Munday y Mason, 1979; Soulsby, 1982; Carrada, 1983 y Tizard, 1988).

Toxoplasmina (Carrada, 1983 y Tizard, 1988).

La presencia de títulos positivos con cualquiera de las pruebas serológicas, establece el diagnóstico de infección por toxoplasma, sin embargo las pruebas de Sabin-Feldman o Inmunofluorescencia indirecta negativas realizadas en sueros sin diluir, excluyen tal diagnóstico (Carrada, 1983).

La toxoplasmosis aguda se confirma demostrando una elevación significativa cuando menos al cuádruple de los títulos de anticuerpos en dos muestras de suero tomadas con un intervalo de 2 a 6 semanas. Un título alto único en Sabin-Feldman o en hemaglutinación pasiva o indirecta, no tiene valor confirmatorio. Cuando el diagnóstico se sospecha tardíamente en el curso de la enfermedad, se puede recurrir a la fijación de complemento (Carrada, 1983).

El método más recomendado para confirmar la infección aguda es la inmunofluorescencia indirecta para IgM, en donde un título único de 1:80 o más es suficiente para fundamentar el diagnóstico. Una titulación en Sabin-Feldman (SF) o inmunofluorescencia indirecta (IFI) de 1:1000 o de fijación de complemento 1:32 o más en presencia de IFI-IgM a título bajo y síndrome clínico característico, es compatible con la toxoplasmosis aguda. En la mayoría de los casos, el título de IgM se eleva rápidamente; después de algunas semanas

desciende a 1:10 1:40 o desaparece, aunque ocasionalmente puede permanecer en niveles de 1:40 a 1:20 por varios años. En animales inmunológicamente normales con título positivo en SF o IFI, la ausencia de IFI-IgM excluye la infección aguda, aunque puede haber falsos negativos en sujetos inmunodeficientes. Estas pruebas también se pueden realizar en el líquido cefalorraquídeo o el humor acuoso del ojo, en donde pudiera demostrarse una elevación significativa local en la producción de inmunoglobulinas antitoxoplasma (Carrada, 1983).

La prueba cutánea con toxoplasmina, permite medir la respuesta inmune celular tardía contra toxoplasma; habitualmente se hace positiva después de varios meses y se usa principalmente en encuestas epidemiológicas para medir la prevalencia de la infección (Carrada, 1983).

Tratamiento

En el caprino no existe un tratamiento completamente satisfactorio contra este parásito ya que su costo limita su aplicación, usándose solamente en humanos. La combinación más frecuentemente utilizada es la pirimetamina y sulfadiazina (Eyles, 1956 y Roch, 1971).

La pirimetamina es antagonista del ácido fólico, es un compuesto liposoluble que se absorbe fácilmente en el tubo digestivo y aparentemente penetra al interior celular. El tratamiento se practica por 2 ó 3 semanas. Tiene la desventaja de producir depresión de la médula ósea, pudiendo originar

problemas de trombocitopenia, leucopenia y anemia (Villegas *et al.*, 1977 y Soulsby, 1982).

De las sulfadiazinas, las más recomendables son: la sulfadiazina o la mezcla de trisulfas con partes iguales de sulfadiazina, sulfamerazina y sulfametazina. Tienen la desventaja de poder producir cristaluria, hematuria y reacciones alérgicas diversas. En general, las sulfamidas se administran junto con la pirimetamina, obteniéndose un efecto sinérgico entre ambos compuestos. Este tratamiento se mantiene por espacio de un mes (Frenkel y Smith, 1982).

Se puede emplear la dimetil-clorotetraciclina asociada a otros medicamentos, o como producto de relevo a partir de la tercera semana en casos de intolerancia o toxicidad a las sulfamidas o pirimetamina (Villegas *et al.*, 1977).

La espiramicina es un antibiótico menos activo que las sulfamidas o la pirimetamina, tiene buena tolerancia, alta concentración tisular placentaria y ausencia de teratogenicidad. La dosis recomendada es de 2g/día/un mes; después con intervalos de 15 días, repitiéndose el tratamiento hasta el parto (Villegas *et al.*, 1977).

Control

El control de esta enfermedad es difícil, pero se pueden establecer algunas medidas para disminuir la posibilidad de infección por este parásito tales como:

En cabras.

- El uso de amoníaco como desinfectante para áreas en donde el gato defeque accidentalmente (Timoney, 1976).
- Eliminación de las materias fecales de los gatos diariamente (Grosso *et al.*, 1975).
- Los cadáveres de animales infectados y sospechosos deben destruirse totalmente, o por lo menos ponerse fuera del alcance de los carnívoros (Blood *et al.*, 1988).
- Eliminar completamente a los grupos de animales en los que surge la enfermedad (Blood *et al.*, 1988).
- Controlar roedores, cucarachas, moscas y gatos vagabundos (Grosso *et al.*, 1975).
- Alimentar a los gatos con alimentos bien cocidos y evitar que salgan de caza (Grosso *et al.*, 1975).
- Tratamiento y diagnóstico periódico coprológico y serológico a los gatos de la granja (Grosso *et al.*, 1975 y Dubey *et al.*, 1980).

En humanos.

- Eliminación de las heces de los gatos para evitar contacto con los humanos (Timoney, 1976).
- Alejar a los niños de las áreas donde el gato defecue (Timoney, 1976).
- No permitir el contacto de mujeres gestantes con gatos cuya fuente de alimentación sea desconocida (Grosso et al., 1975; Timoney, 1976 y Carrada, 1983).
- Usar guantes cuando se manipulen las cazuelas de los gatos (Grosso et al., 1975).
- Cocimiento de las carnes, considerando que los quistes se destruyen a una temperatura de 90°C durante 30 segundos y de 50°C durante 2.5 minutos (Grosso et al., 1975; Timoney, 1976 y Carrada, 1983).
- Evitar el consumo de carne cruda o mal cocida (Timoney, 1976 y Carrada, 1983).
- Frutas y verduras pueden estar contaminadas con ooquistes resistentes, por lo que debe insistirse en el lavado mecánico cuidadoso (Carrada, 1983).
- Los sujetos seropositivos a Toxoplasma gondii, no deben ser usados como donadores de órganos para trasplantes (Carrada, 1983).

- **En pacientes inmunodeficientes o con terapia inmunodepresora, es importante vigilar las transfusiones sanguíneas (Carrada, 1983).**

OBJETIVOS

El presente trabajo contempla los siguientes objetivos:

- 1.- Inducir la enfermedad en caprinos, inoculando trofozoitos de Toxoplasma gondii cepa RH, proporcionada por el I.S.E.T. (Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales), dependiente de la Secretaría de Salud.
- 2.- Realizar el montaje y estandarización de la técnica de hemaglutinación pasiva a partir de animales experimentalmente infectados.
- 3.- Evaluar la técnica arriba mencionada como un método indirecto de diagnóstico de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

1.- Localización.

El presente trabajo se desarrolló en el módulo de caprinos del Centro de Producción Agropecuaria y en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán U.N.A.M.

2.- Animales.

Se utilizaron 5 caprinos mestizos, machos castrados, de 18 meses de edad aproximadamente.

Los animales permanecieron en estabulación y se alimentaron con paja de avena, alfalfa achicalada, alfalfa fresca y alimento balanceado comercial de las marcas La Hacienda, S.A. DE C.V. y Purina, S.A. DE C.V. (ambos libres de desparasitantes), teniendo libre acceso al agua.

3.- Cepa del Toxoplasma.

La cepa de I. gondii fue la RH de origen humano, proporcionada por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (I.S.E.T), dependiente de la Secretaría de Salud.

Dicha cepa fue mantenida por pases en ratones albinos mediante inoculaciones intraperitoneales cada 72 horas, hasta el momento de su utilización.

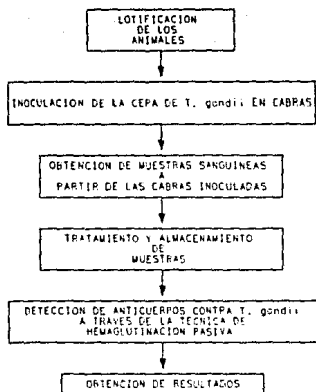
4.- Inóculo.

Consistió en un exudado peritoneal con 400 trofozoitos de I. gondii/ml aproximadamente, proveniente de un lote de 60 ratones albinos, en los que se hizo el último pase, éste fue diluido en una proporción de 1:5 (80 trofozoitos/ml aproximadamente) con solución salina fisiológica al 0.9% previa constatación de la presencia de trofozoitos de I. gondii por medio del microscopio.

A cada uno de los animales del grupo experimental se le inocularon 4 ml de la preparación anterior (320 trofozoitos aproximadamente), mientras que a los del grupo testigo se les inoculó 4 ml de solución salina fisiológica al 0.9% a cada uno.

5.- Diseño experimental.

El diseño experimental se llevó a cabo de acuerdo al siguiente cuadro.



5.1 Lotificación de los animales.

Se formaron dos grupos de cabras; el primero con dos animales, los cuales fungieron como grupo control y el segundo con tres animales, que fue el grupo experimental o parasitado.

5.2 Inoculación.

Previo depilación y asepsia de la zona de aplicación, a cada uno de los animales del grupo experimental o parasitado se le aplicaron 4 ml del inóculo, de exudado peritoneal de ratón, diluido en solución salina fisiológica y conteniendo trofozoitos de I. gondii por vía intraperitoneal. A los animales del grupo control se les administró a cada uno 4 ml de solución salina fisiológica por la misma vía, haciéndose una sola aplicación, y a ese día se le tomó como día cero del experimento.

5.3 Obtención de muestras.

Se efectuaron 23 muestreos sanguíneos a cada animal en ambos grupos para la obtención del suero.

Los muestreos se realizaron 17, 14, 9 y 3 días antes de la inoculación, en el momento de la inoculación, diariamente del primero al séptimo día post-inoculación (PI), cada 48 horas del séptimo al décimo noveno día PI y cada 120 horas del día 19 al día 45 PI.

5.4 Tratamiento y almacenamiento de muestras.

Las muestras fueron obtenidas por punción yugular, utilizando agujas y tubos Vacutainer, se esperó la retracción del coágulo para posteriormente retirarlo y centrifugar los tubos con el suero a 2000 r.p.m. durante 15 minutos y se separó el suero limpio. A cada tubo de suero así tratado se le adicionó azida de sodio y se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

5.5 Detección de anticuerpos contra T. gondii, a través de la técnica de Hemaglutinación pasiva o indirecta.

Para la detección de anticuerpos contra T. gondii, todas las muestras fueron procesadas por medio de la técnica propuesta por Jacobs y Lunde en 1957 y descrita por Bautista G. en 1978. (Ver apéndice).

A.- Manejo de sueros:

- Se descongelaron todos los sueros en forma paulatina a temperatura ambiente.
- Los sueros fueron descomplementados, sometiéndolos a baño María a 56°C durante 30 minutos.
- Se hizo la absorción de anticuerpos heterófilos, adicionando a cada 0.9 ml de suero 0.1 ml de eritrocitos, incubando a 37°C durante 30 minutos.

- Se hizo el control de sueros.
- Finalmente se realizó el corrimiento de todos los sueros con la técnica arriba mencionada.

B.- Controles:

- Control del diluyente: Se transfirieron 0.5 ml de suero normal de conejo al 1% a varios pozos y se agregaron 0.025 ml de eritrocitos sensibilizados al 1.5%, siendo negativa la reacción.
- Control de suero: Se preparó una suspensión al 1.5% de eritrocitos tanizados no sensibilizados en suero normal de conejo al 1%, se montó una placa por duplicado con diluciones seriadas de los sueros a probar (6 pozos por cada suero). A cada pozo se añadió 0.025 ml de eritrocitos tanizados no sensibilizados al 1.5%, obteniendo reacción negativa.
- Sueros controles: El suero control positivo se obtuvo mediante hiperinmunización de un conejo, el cual dio un título 1:128.

El suero control negativo fue un suero de conejo no hiperinmunizado y que dio reacción negativa en la prueba.

Se corrió la prueba con todos los sueros y controles (control de diluyente, control positivo y control negativo), siguiendo los pasos descritos en el apéndice, obteniéndose los siguientes resultados:

RESULTADOS

Se trabajó con un total de 115 muestras para detectar la presencia de anticuerpos contra *I. gondii* a través de la técnica de hemaglutinación pasiva; de éstas muestras, 46 (40%) correspondieron al lote de caprinos testigo y las restantes 69 (60%) fueron procedentes del lote de caprinos inoculados con trofozoitos de *I. gondii*.

Al realizar la prueba de hemaglutinación pasiva, las muestras procedentes de los caprinos del lote testigo reflejaron títulos bajos pero constantes de anticuerpos (1:8), disminuyendo a 1:4 en aquellas que fueron obtenidas los días 4, 5, 6 y 7 post-inoculación de la solución salina fisiológica. (Fig. 1, Cuadro de resultados).

Los sueros procedentes del lote experimental o parasitado (Cuadro de resultados), tuvieron un comportamiento distinto, dado que mostraron un título constante de 1:8 antes del día en que se llevó a cabo la inoculación y hasta el día 2 post-inoculación, momento a partir del cual se empezó a manifestar un incremento paulatino en el título de anticuerpos hasta llegar a un pico máximo promedio de 1:16 que se dio en las muestras obtenidas los días 15, 17, 19 y 24 post-inoculación (Fig. 1); de aquí en adelante se observó un descenso paulatino en el título de anticuerpos, que finalmente se estabilizó del día 39 al día 45 post-inoculación, que fue cuando se sacrificó a los caprinos. Únicamente los sueros obtenidos el día 7 y el día 34 post-inoculación reflejaron un brusco descenso en los títulos de anticuerpos.

Finalmente cabe señalar que antes de efectuarse la inoculación, se detectaron títulos bajos de anticuerpos (1:2, 1:4 ó 1:8) en todos los animales, no existiendo la posibilidad de encontrar sujetos seronegativos.

CUADRO DE RESULTADOS

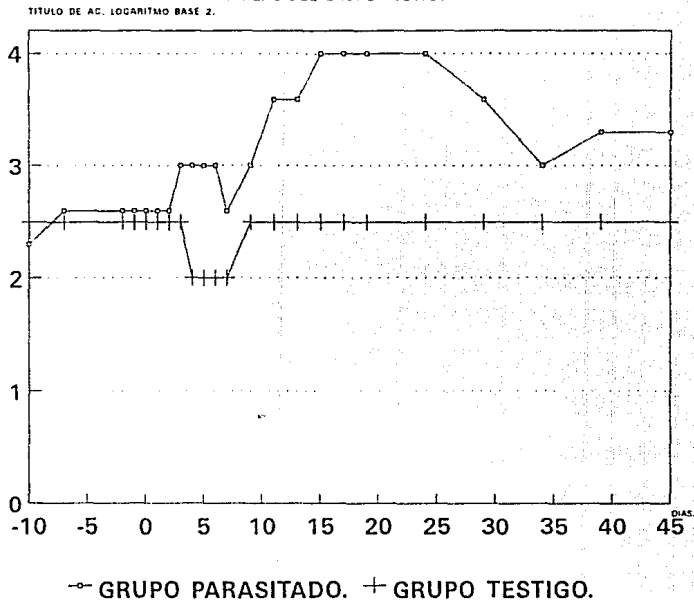
TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA *T. gondii* EN DILUCIONES DOBLES OBSERVADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE HEMAGLUTINACION PASIVA EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS A PARTIR DE LOS CAPRINOS DEL GRUPO PARASITADO Y CONTROL.

DIA	GRUPO TESTIGO		X	GRUPO PARASITADO			X
	ANIMAL			ANIMAL			
	B	E		A	C	D	
-10	1/8	1/4	2.5	1/8	1/2	1/8	2.3
-7	1/8	1/4	2.5	1/8	1/4	1/8	2.6
-2	1/8	1/4	2.5	1/8	1/4	1/8	2.6
-1	1/8	1/4	2.5	1/8	1/4	1/8	2.6
0	1/8	1/4	2.5	1/8	1/4	1/8	2.6
1	1/8	1/4	2.5	1/8	1/4	1/8	2.6
2	1/8	1/4	2.5	1/8	1/4	1/8	2.6
3	1/8	1/4	2.5	1/8	1/4	1/16	3.0
4	1/4	1/4	2.0	1/8	1/4	1/16	3.0
5	1/4	1/4	2.0	1/8	1/4	1/16	3.0
6	1/4	1/4	2.0	1/8	1/4	1/16	3.0
7	1/4	1/4	2.0	1/8	1/4	1/8	2.6
9	1/4	1/8	2.5	1/8	1/4	1/16	3.0
11	1/4	1/8	2.5	1/16	1/8	1/16	3.6
13	1/4	1/8	2.5	1/16	1/8	1/16	3.6
15	1/4	1/8	2.5	1/32	1/8	1/16	4.0
17	1/4	1/8	2.5	1/32	1/8	1/16	4.0
19	1/4	1/8	2.5	1/32	1/8	1/16	4.0
24	1/4	1/8	2.5	1/32	1/8	1/16	4.0
29	1/4	1/8	2.5	1/32	1/8	1/8	3.6
34	1/4	1/8	2.5	1/16	1/4	1/8	3.0
39	1/4	1/8	2.5	1/16	1/4	1/16	3.3
45	1/4	1/8	2.5	1/16	1/4	1/16	3.3

NOTA: Los promedios están expresados en logaritmo base 2.

Fig. 1

TITULO DE ANTICUERPOS DETECTADOS POR MEDIO DE LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION PASIVA EN CABRAS INOCULADAS CON *T. gondii* Y EN LAS DEL GRUPO TESTIGO.



DISCUSION

La toxoplasmosis congénita es reconocida como importante causa de pérdida de fetos en ovejas y con base en evidencias serológicas, es considerada como causa significativa de muerte perinatal en cabras. Asimismo, la presencia de abortos o nacimiento de cabritos muertos es también en gran parte debido a esta enfermedad (Munday y Mason, 1979).

Por otra parte en cabras, la enfermedad en forma clínica debe diferenciarse del aborto provocado por otros agentes (Coxiella burnetti, Brucella spp. y Chlamydia spp.) que causan placentitis, en cuyo caso comprende la región intercotiledonaria, mientras que en el caso del aborto toxoplásmico ocurre necrosis sólo en cotiledones (Cuéllar et al., 1986).

El comportamiento serológico observado en el presente trabajo, no mostró una intensidad mayor a 1:16, sin embargo su dinámica es similar a la reportada por Carrada en 1983 en un estudio serológico hecho en humanos con toxoplasmosis aguda y en donde al igual que en éste trabajo se observa un incremento de títulos de las 2 a las 4 semanas posteriores a la infección.

Lo anterior se puede atribuir a que al inicio del trabajo los caprinos mostraron títulos bajos (1:2, 1:4 y 1:8), no existiendo la posibilidad de encontrar animales seronegativos; estos animales probablemente ya padecían una toxoplasmosis crónica ya sea congénita o adquirida; lo cual hace pensar en una respuesta inmune previamente montada.

El comportamiento de los niveles de anticuerpos en el lote experimental, que se aprecia en la figura 1 y que ya fue descrito, se explica de la siguiente manera:

Los días 3, 4, 5, y 6 post-inoculación se detectó un incremento de anticuerpos correspondiente probablemente a la presencia de IgM; éste tipo de inmunoglobulina se hace presente en la respuesta inmune primaria, siendo su producción muy baja, y luego tiende a declinar; posterior a esta declinación, se observa un nuevo incremento en los títulos de anticuerpos, éstos quizá corresponden ya a una producción de IgG, que van substituyendo en forma progresiva a las IgM de la respuesta inmune primaria; el título de las probables IgG sigue aumentando hasta llegar a un máximo los días 15, 17, 19 y 24 post-inoculación. La baja de anticuerpos en los días subsecuentes se debe al proceso de enquistamiento por parte del parásito.

Cabe mencionar que la anterior explicación encuentra fundamento en el trabajo presentado por Turunen en 1983, en donde por medio de la prueba de ELISA se demuestra el comportamiento de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA en respuesta a una toxoplasmosis humana, y que en conjunto reflejan una dinámica también muy similar a la obtenida por nosotros en el presente trabajo. Turunen señala que las IgG en el caso de un paciente con toxoplasmosis aguda muestran una rápida y fuerte respuesta, llegando a un pico máximo aproximadamente tres meses más tarde y el título más bajo se alcanza dos años después aproximadamente; sin embargo en el caso de las IgM el incremento inicial es mas rápido que el de IgG. El pico máximo se alcanza aproximadamente

un mes después de la infección. El decremento de estos anticuerpos también es rápido dependiendo del individuo, de tal forma que a los seis meses posteriores a la infección en la mayoría de los pacientes este tipo de inmunoglobulinas ha desaparecido. En cuanto al aumento inicial en la respuesta de IgA es más lenta que la observada con las IgG; el pico máximo es alcanzado aproximadamente al mismo tiempo que el pico máximo de IgG. La respuesta declina en forma más lenta que en el caso de las IgM, pero más rápidamente que las IgG, de manera que solo en unos cuantos pacientes después de un año pueden ser detectados muy bajos niveles de este tipo de anticuerpos.

En el caso del grupo testigo el descenso en los títulos de anticuerpos que se registro los días 4, 5, 6 y 7 post-inoculación, es atribuido a una situación de estrés.

Lo anterior se fundamenta en los niveles de cortisol sanguíneo encontrados por Carbajal en 1990 en éstos mismos animales durante la realización del presente trabajo.

Aunado a lo anterior hay que señalar que la principal respuesta inmune contra *I. gondii* es de tipo celular, dado que es un parásito intracelular estricto que se duplica dentro de las células durante su etapa de taquizoito, sin embargo simultáneamente se desencadena la producción de anticuerpos los cuales junto con el complemento dan cuenta rápida de los parásitos que se encuentran libres en los líquidos corporales, disminuyendo así el paso de los mismos de una célula

a otra, pero influyen poco en las variedades intracelulares del parásito. Estos son destruidos por una respuesta inmune debida a células (Tizard, 1988).

Además los linfocitos T. sensibilizados liberan linfocininas en respuesta a ribonucleoproteínas del toxoplasma. Estas linfocininas actúan sobre los macrófagos volviéndolos resistentes a los efectos destructores del toxoplasma y luego ayudándoles a matar al parásito intracelular, quizá suprimiendo el bloqueo que impide la fusión de los lisosomas con el fagosoma. Por otra parte, los linfocitos T. citotóxicos también pueden destruir taquizoitos de toxoplasma y células con toxoplasmosis. Así mismo el interferón es activo contra toxoplasma por su capacidad de activar macrófagos y estimular células citotóxicas T. de ésta forma se combinan la respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral para eliminar la etapa de taquizoito (Tizard, 1988).

Por último hay que tomar en cuenta que a partir del momento en que esta respuesta inmune ya previamente armada empieza a neutralizar al parásito, éste tiende a enquistarse no ofreciendo antigenicidad alguna; de ésta forma baja aún más rápidamente la cantidad de antígeno circulante, la estimulación antigénica y por tanto la producción de anticuerpos (Tizard, 1988).

El hecho de que en el grupo testigo se hayan presentado títulos constantes de anticuerpos pero en promedio bajos (1:4 ó 1:8), confirma la presencia de una respuesta inmune ya previamente armada, que al no ser estimulada no registró títulos mayores.

CONCLUSIONES

Tomando en cuenta el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, en los cuales se observa que los sueros procedentes del grupo experimental mostraron un título constante de 1:8 antes del día en que se llevó a cabo la inoculación y hasta el día 2 post-inoculación, momento a partir del cual se empezó a manifestar un incremento paulatino en el título de anticuerpos hasta llegar a un pico máximo promedio de 1:16 que se dió en las muestras obtenidas los días 15, 17, 19 y 24 post-inoculación, para posteriormente descender y finalmente estabilizarse a partir del día 39 y hasta el día 45 post-inoculación; mientras que los sueros procedentes del grupo testigo reflejaron títulos bajos pero constantes de anticuerpos (1:8), disminuyendo en aquellos que fueron obtenidos los días 4, 5, 6 y 7 post-inoculación a 1:4, se concluye que:

La técnica de hemaglutinación pasiva aplicada en cabras inoculadas con trofozoitos de *I. gondii*, posee mucha sensibilidad, pero poca especificidad, pudiendo ser muy útil para estudios de seroprevalencia, donde interesa conocer el estado inmunológico de los animales de un hato o una región, sin embargo, si se quiere hacer el estudio de casos con evidencia clínica de abortos, se cuenta con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que es el método idóneo para confirmar una infección aguda, en donde un título único de 1:80 o más es suficiente para fundamentar el diagnóstico.

A P E N D I C E

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA.

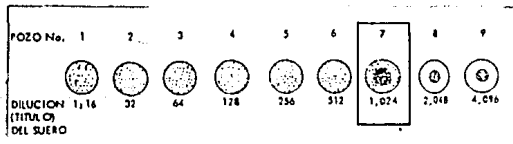
Es una prueba en la cual los sistemas de precipitación se convierten en sistemas de aglutinación, y éste consiste en adsorber antígenos solubles a una partícula grande e insoluble, como son los eritrocitos. Esta prueba es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpos (de 0.02 a 0.04 μg de proteína de anticuerpo).

Al tratar los eritrocitos de carnero o tipo "O" de humano con una solución diluida de ácido tánico, adquieren la propiedad de adsorber proteínas sobre su superficie. De tal manera que dichos eritrocitos cubiertos con proteína son aglutinados en presencia de antisuero específico contra la proteína adsorbida. La ventaja principal de esta técnica es su sensibilidad, además de que se puede probar un gran número de sueros al utilizar métodos de microtitulación.

Los sueros a probar primero se descomplementan y luego se absorben con un volumen igual de eritrocitos con objeto de eliminar anticuerpos heterófilos. Para obtener resultados reproducibles, la concentración de eritrocitos a sensibilizar con antígeno, debe estandarizarse, puesto que hay una relación inversa entre la concentración de células y el título de anticuerpos. El título de aglutinación se duplica cuando la concentración de células se disminuye a la mitad.

Para conocer el título de anticuerpos en un suero, se efectúan diluciones seriadas de éste en un diluyente apropiado (Suero Normal de Conejo (SNC) al 1% en PBS pH 7.2) y luego se añaden cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos sensibilizados con antígeno específico. La dilución más alta que provoque una clara aglutinación se considera como punto final de la reactividad y representa el título de anticuerpos del suero.

En el siguiente esquema se ejemplifica el patrón de lectura en la prueba de hemaglutinación pasiva o indirecta, así como su interpretación.



PATRON DE LECTURA EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA.

INTERPRETACION:

POZOS 1 - 6 (+) AGLUTINACION.
 POZO 7 (+/-) AGLUTINACION PARCIAL.
 POZOS 8 - 9 (-) SEDIMENTACION.

EQUIPO Y REACTIVOS**Equipo:**

Agujas Vacutainer.

Tubos Vacutainer.

Refrigerador con capacidad de -20°C .

Centrífuga, capaz de 800 x g.

Baños María, 56 y 37°C .

Tubos de centrífuga cónicos graduados de 12 ml.

Material de cristalería:

Pipetas serológicas.

Matraces.

Vasos de precipitados.

Tubos de ensayo de 10 x 75 mm.

Equipo de microtitulación:

Pipetas de 0.05 ml y de 0.025 ml.

Microdilutores de 0.05 ml.

Placas con fondo en "U".

Vibrador.

Reactivos:

Azida de sodio.

Solución de Alsever.

Solución salina buferada (PBS pH 7.2 y pH 6.4).

Suero Normal de Conejo (SNC).

Acido tánico.

Antígeno.

Suero positivo de título conocido y suero control negativo.

Eritrocitos: de carnero o de humano tipo "O" ("añejar las células cuando menos 8 días a 4°C antes de usarlas).

Preparación de reactivos.

Soluciones anticoagulantes

Solución de Alsever:

Dextrosa	2.05 g.
Citrato de sodio dihidratado	0.8 g.
Cloruro de sodio	0.42 g.
Acido cítrico	0.055 g ó 0.55 ml. de Acido acético al 10%.
Agua destilada	100.0 ml.
(esterilizar por filtración y almacenar a 4°C).	

Solución salina bufferada (PBS)

Soluciones stock:

Na₂HPO₄ 0.15 M 21.3 g/litro de agua destilada.KH₂PO₄ 0.15 M 20.4 g/litro de agua destilada.

NaCl 0.15 M 8.8 g/litro de agua destilada.

PBS, pH 6.4:Na₂HPO₄ 0.15 M 32.3 ml.KH₂PO₄ 0.15 M 67.7 ml.

NaCl 0.15 M 100.0 ml.

PBS, pH 7.2:Na₂HPO₄ 0.15 M 76.0 ml.KH₂PO₄ 0.15 M 24.0 ml.

NaCl 0.15 M 100.0 ml.

Diluyente: Suero normal de conejo (SNC) al 1%

Inactivar suero de conejo normal a 56°C por 30 minutos. Absorber con eritrocitos de carnero, (0.1 ml de eritrocitos + 0.9 ml de suero). El suero inactivado puede guardarse congelado y debe ser reactivado a 56°C por 10 minutos antes de ser usado.

Mezcle 1 ml de suero en 99 ml de PBS, pH 7.2.

Si el diluyente reacciona con eritrocitos tanizados o con eritrocitos sensibilizados, se debe descartar y se utiliza otro suero de un conejo que no reaccione.

Preparación de las diluciones de ácido tánico, 1:1,000 y 1:20,000

Inmediatamente antes de usarse, prepare una solución fresca de una dilución 1:1,000 de ácido tánico, disolviendo 20 mg de ácido tánico en 20 ml de PBS, pH 7.2. Diluya la solución stock 1:1,000 a 1:20 para obtener la dilución de 1:20,000 que se usa en la prueba (2.0 ml de 1:1,000 + 38.0 ml de PBS, pH 7.2). Si las células no tienen el efecto de tanizado o si hay una aglutinación espontánea, se deben de probar diferentes concentraciones de ácido tánico para determinar la dilución óptima para el tanizado.

A. TANIZADO DE ERITROCITOS.

- 1.- Lavar los eritrocitos 3 veces en PBS, pH 7.2 a 800 x g por 5 minutos 2 veces y por 10 minutos una vez.
- 2.- Poner 1 ml del paquete de eritrocitos en 39 ml de PBS, pH 7.2 para obtener una suspensión al 2.5%.
- 3.- Añadir un volumen igual (40 ml) de solución de ácido tánico 1:20,000; mezclar e incubar en un baño María a 37°C por 10 minutos.
- 4.- Sacar los eritrocitos del baño María y centrifugar por 5 minutos a 800 x g. Descartar el sobrenadante, lavar con PBS, pH 7.2, centrifugar a 800 x g

por 10 minutos y resuspender los eritrocitos en PBS, pH 6.4 para hacer una suspensión al 2.5% (1 ml) de eritrocitos + 39 ml de PBS).

B. SENSIBILIZACIÓN DE ERITROCITOS.

- 1.- Sensibilizar los eritrocitos tanizados agregando un volumen igual de una dilución óptima de antígeno en PBS, pH 6.4 a la suspensión de células.
- 2.- Incubar la mezcla en un baño María a 37°C por 15 minutos. La dilución óptima debe ser predeterminada para cada lote de antígeno por medio de la titulación de éste con el antisuero conocido.

Determinación de la concentración óptima de antígeno:

a.- Preparar 4 diluciones de antígeno en PBS, pH 6.4 por ejemplo: 1:25, 1:50, 1:100, 1:150.

b.- Sensibilizar los eritrocitos.

c.- Utilizar un suero negativo y otro positivo por cada dilución. La concentración más baja del antígeno que da el mayor título con el suero inmune y no reacción con el suero negativo es considerada como óptima.

Nota: En el caso del presente trabajo, la dilución óptima fue de 1:25.

- 3.- Centrifugar a 800 x g por 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y lavar las células 2 veces con SNC al 1% en PBS, pH 7.2; la primera a 800 x g por 5 minutos y la última a 800 x g por 10 minutos.

- 4.- Ajustar los eritrocitos a una suspensión al 1.5% en SNC al 1% (por ejemplo: 0.15 ml del paquete de eritrocitos + 9.85 ml de SNC al 1%).

C. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.

- 1.- Inactivar los sueros por 30 minutos a 56°C Absorber los sueros con eritrocitos (0.1 ml de eritrocitos + 0.9 ml de suero e incubar por 30 minutos a 37°C).
- 2.- En placas de microtitulación transferir 0.05 ml de SNC al 1% con una pipeta a los pozos en donde se vayan a hacer las diluciones.
- 3.- Transferir 0.05 ml de suero que se vaya a probar con un microdilutor al primer pozo que contenga 0.05 ml de SNC al 1%.
- 4.- Mezclar y hacer 12 diluciones de suero pasando 0.05 ml a cada pozo y eliminar los 0.05 ml. del último pozo.
- 5.- Mezclar las diluciones poniendo la placa en un vibrador. Con una pipeta agregar 0.025 ml de la solución sensibilizada de eritrocitos al 1.5% a cada dilución de suero.
- 6.- Mezclar con un vibrador y dejar la placa en reposo a temperatura ambiente por 2 ó 3 horas (o incubar a 4°C por 12 horas).
- 7.- Leer la placa por medio de los patrones en el fondo de los pozos.

**ESTA TESIS NO DEBE--
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONTROLES.

Control del diluyente: Transferir 0.05 ml de SNC al 1% a varios pozos y agregar 0.025 ml de los eritrocitos sensibilizados al 1.5%. Esta reacción debe ser negativa.

Control de suero: Preparar una suspensión al 1.5% de eritrocitos tanizados no sensibilizados en SNC al 1%. Preparar una placa por duplicado con diluciones seriadas del suero a ser probado, 6 pozos de cada suero en vez de 12. A cada pozo, añadir 0.025 ml de eritrocitos tanizados no sensibilizados al 1.5%. Se debe obtener una reacción negativa con cada suero; si el suero reacciona se le debe absorber con eritrocitos.

LITERATURA CITADA

- 1.- Bautista, G.R.; Morilla, G.A. (1978). Manual de técnicas inmunológicas aplicadas en medicina veterinaria. pp. 44-51, Patronato del I.N.I.P. S.A.B.H. México.
- 2.- Blood, D.C.; Radostits, O.M.; Henderson, J.A.; Arundel, J.H.; Gay, C.C. (1988). Medicina Veterinaria. pp. 973-976. 6a. edición, Nueva Editorial Interamericana. México, D.F.
- 3.- Carbajal, C. M. (1990). Evaluación del estrés inducido por la toxoplasmosis aguda en cabras a través de los niveles plasmáticos de cortisol.- Tesis licenciatura. F.E.S.C. U.N.A.M. México.
- 4.- Carrada, B.T. (1983). La toxoplasmosis problema de salud pública, avances y perspectivas. Boletín médico del Hospital Infantil de México. 40: 353-362.
- 5.- Casas, P.V.M.; Godard, F.L. (1981). Estrategias para el desarrollo de la caprinocultura en México. En: Memorias del Primer Encuentro Nacional sobre Producción de Ovinos y Caprinos. F.E.S.C. U.N.A.M. S.A.B.H. México. pp. 14-30.

- 6.- Cuéllar, O.J.; Hernández, V.C.; Oviedo, F.G. (1986). Toxoplasmosis. En: Producción de Caprinos, ed. Arbiza, A.S.S., pp. 577-579. AGT Editor, S.A. México, D.F.
- 7.- De la Fuente, E.G.; Canales, R.M. (1981). Situación de la caprinocultura en México. En: Memorias del Primer Encuentro Nacional sobre Producción de Ovinos y Caprinos. F.E.S.C. U.N.A.M. S.A.R.H. México. pp. 312-321.
- 8.- Dubey, J.P.; Sharma, S.P. (1980). Parasitemia and tissue infection in sheep fed Toxoplasma gondii oocysts. J. Parasitol., 66: 111-114.
- 9.- Dubey, J.P.; Sharma, S.P. (1980). Prolonged excretion of Toxoplasma gondii in semen of goats. Am. J. Vet. Res., 41: 794-795.
- 10.- Dubey, J.P.; Sharma, S.P.; López, C.W.; Williams, J.F.; Williams, C.S.; Weisbrode, S.E. (1980). Caprine toxoplasmosis: Abortion, clinical signs and distribution of Toxoplasma in tissues of goats fed Toxoplasma gondii oocysts. Am. J. Res., 41: 1072-1076.
- 11.- Dubey, J.P.; Sundberg, J.P.; Matiuck, B.A. (1981). Toxoplasmosis associated with abortion in goats and sheep in Connecticut. Am. J. Vet. Res., 42: 1624-1625.
- 12.- Eyles, D.E. (1956). Newer knowledge of the chemotherapy of toxoplasmosis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 64: 252-267.

- 13.- FAO.; SEP. (1988). Manuales para educación agropecuaria. Tomo 4 (Cabras). pp. 9 y 10. 7a. edición, Editorial Trillas, México, D.F.
- 14.- Fletcher, S. (1965). Indirect fluorescent antibody technique in the serology of Toxoplasma gondii. J. Clin. Path., 18: 193-199.
- 15.- Frenkel, J.K. (1973). Toxoplasmosis: Parasite life cycle, pathology and immunology. In: The Coccidia, ed. D. A. Hammond and P.L. Long. pp. 343-410. Baltimore: University Park Press.
- 16.- Frenkel, J.K.; Smith, D. (1982). Immunization of cats against shedding of Toxoplasma oocysts. J. Parasitol., 68: 744-748.
- 17.- Grosso, A.M.; Morales, C.C.; Prieto, C. (1975). Toxoplasmosis una zoonosis que debe ser controlada. Gaceta Vet., 37: 177-179.
- 18.- Hartley, W.J.; Marshall, S.C. (1957). Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. N.Z. Vet. J., 5: 119-124.
- 19.- Le Jaouen, J.C. (1981). Situación de la producción caprina en Francia: programa de desarrollo. En: Memorias del Primer Encuentro Nacional sobre Producción de Ovinos y Caprinos. F.E.S.C. U.N.A.M. S.A.R.H. México. pp. 233-268.
- 20.- Leyva, C.A. (1979). Toxoplasmosis. Rev. Cub. Med. Trop., 31: 141-158.

- 21.- Mehdi, N.A.; Kazacos, K.R.; Carlton, W.W. (1983). Fatal disseminated toxoplasmosis in a goat. J.A.V.M.A., 183: 115-117.
- 22.- Montaldo, V.H.; Sánchez, F. (1981). Programas de selección y criterios del mejoramiento del ganado caprino. En: Memorias del Primer Encuentro Nacional sobre Producción de Ovinos y Caprinos. F.E.S.C. U.N.A.M. S.A.R.H. México pp. 135-141.
- 23.- Munday, B.L.; Mason, R.W. (1979). Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. Aust. Vet. J., 55: 485-487.
- 24.- Peraza, C. (1981). Algunas consideraciones actuales sobre la nutrición y alimentación en la cabra lechera. En: Memorias del Primer Encuentro Nacional sobre Producción de Ovinos y Caprinos. F.E.S.C. U.N.A.M. S.A.R.H. México. pp. 161-201.
- 25.- Plant, J.W.; Glastonbury, J.R.; Saunders, E.J. (1980). Toxoplasmosis in goats. Aust. Vet. J., 56: 254.
- 26.- Polydorov, K. (1979). Brucellosis in sheep and goats in Cyprus. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 2: 99-106.
- 27.- Quiroz, R.H. pp. 144-151. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Editorial Limusa. México, D.F.

- 28.- Roch, U.E. (1971). Compendio de Toxoplasmosis, México, Ed. Patria S.A.
- 29.- Rodríguez, O.A.; Vega S.C. (1986). Estudio de la presencia de Toxoplasma gondii y Brucella spp. en un hato caprino con antecedentes de abortos.- Tesis licenciatura. F.E.S.C. U.N.A.M. México.
- 30.- Sharma, S.P.; Dubey, J.P. (1981). Quantitative survival of Toxoplasma gondii tachyzoites and bradyzoites in pepsin and tripsin solutions. Am. J. Vet. Res., 4: 128-130.
- 31.- Soulsby, E.J. (1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. pp. 670-682. 7th Edition of Monning,s Veterinary Helminthology and Entomology. Lea and Febiger. U.S.A.
- 32.- Spence, J.B.; Faulkner, J.; Henry, L.; Watson, W.A. (1978). Toxoplasma gondii in the semen of rams. Vet. Rec., 102: 38-39.
- 33.- Timoney, J.F. (1976). Toxoplasmosis. Vet. Clin. North America., 6: 379-383.
- 34.- Tizard, I. (1988). Inmunología Veterinaria. pp. 143-144, 177-178 y 275-276. 2a. edición, Nueva Editorial Interamericana. México, D.F.

- 35.- Turunen, H.; Vuorio, K.A.; Leiniki, P.O. (1983). Determination of IgG, IgM, IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Scand. J. Infect. Dis., 15: 307-311.
- 36.- Villegas, G.J.; Fastag, A.; Villegas, S.R. (1977). Toxoplasmosis. Características anatomoclínicas e identificación morfológica del parásito mediante técnicas de impregnación argéntica. Bol. Med. Hosp. Infant., 34: 473-486.
- 37.- Wallace, G.D. (1973). The role of the cat in the natural history of Toxoplasma gondii. Am. J. Trop. Med. Hyg., 22: 313-322.
- 38.- Watson, W.A. (1972). Toxoplasmosis in human and veterinary medicine. Vet. Rec., 91: 254-258.
- 39.- Wielgaard, F.; Van Gruijthuijsen, H. Duermeyer, W.; Joss, A.W.; Skinner, L.; Williams, H.; Van Elven, E. (1983). Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol., 17: 981-987