



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

BUSQUEDA DE ANTIGENOS CIRCULANTES DE  
TOXOPLASMA GONDII POR COAGLUTINACION  
Y HEMAGLUTINACION INDIRECTA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

SONIA ARCE ARRIAGA

MARIA GUADALUPE CASTILLO ACOSTA

MEXICO, D.F.

ENERO DE 1987



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.
INTRODUCCION .....	1
1. ANTECEDENTES .....	1
2. GENERALIDADES .....	3
2.1. Clasificación .....	3
2.2. Morfología .....	4
2.3. Aspectos biológicos .....	5
2.4. Ciclo biológico .....	6
2.5. Patogenia .....	8
2.6. Respuesta inmune en la toxoplasmosis ...	11
2.7. Estructura antigénica .....	13
2.8. Métodos de diagnóstico .....	15
FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA .....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
OBJETIVOS .....	22
HIPOTESIS .....	22
MATERIAL Y METODOS .....	23
PREPARACION DE SOLUCIONES .....	26
METODOS .....	27
RESULTADOS .....	37
DISCUSION DE RESULTADOS .....	52
CONCLUSIONES .....	58
BIBLIUGRAFIA .....	60

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

### 1.- ANTECEDENTES:

A partir del descubrimiento de Toxoplasma gondii en 1908 (1), se fue obteniendo información bibliográfica con respecto a su biología, cada vez más abundante. Pero a partir de los trabajos de Wolf y Cohen (2), quienes encontraron al parásito en un niño con meningoencefalitis el interés en el protozoario fue extraordinario y la bibliografía derivó a aspectos clínicos, y consecuentemente los investigadores del tema se dedicaron a la búsqueda de métodos de diagnóstico y así, en 1937 se conoció la técnica serológica de Fijación de complemento (FC) (3). En 1948 Sabin y Feldman (4) describieron la prueba del colorante o azul de metileno (DT) la cual se llegó a considerar, incluyendo sus diversas modificaciones (5), como una -- prueba específica en el diagnóstico de la toxoplasmosis. Después se conocieron las pruebas de Hemaglutinación indirecta (HAI) de Jacobs y Lunde (6) y sus modificaciones (7,8,9,10). Los adelantos en el conocimiento de la toxoplasmosis permitieron demostrar que la infección, en la mayoría de los casos es asintomática, que gran parte de la población mundial, en las investigaciones epidemiológicas presenta anticuerpos contra Toxoplasma gondii (1), lo cual hizo que el diagnóstico de la enfermedad fuera más difícil, puesto que una prueba serológica positiva podría considerarse como infección pasada o reciente.

La mayoría de las pruebas señaladas detectan particularmente, anticuerpos de la clase IgG, con excepción de las pruebas de FC, IF (inmunofluorescencia) y ELISA que identifican anticuerpos del tipo IgM (11,12).

A través de los años los médicos han ido encontrando cada vez mayores problemas para interpretar los resultados obtenidos en el laboratorio clínico; sin embargo con los avances en el conocimiento de la inmunología y particularmente de la respuesta inmune en la toxoplasmosis, se han logrado nuevas pruebas que permiten diferenciar hasta cierto punto, la infección crónica o latente, de la infección aguda, mediante la detección por separado de las inmunoglobulinas IgG e IgM; entre otras está la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IF) (11), que detecta tanto IgG como IgM, -- aunque hay que considerar falsas reacciones positivas ocasionadas por la presencia de anticuerpos antinucleares y factor reumatoide en pacientes con enfermedades autoinmunes (13,14). La prueba de - ELISA (15,16) que presenta una correlación con la prueba de DT mayor del 90% (17), aunque también interfieren en dicha prueba anticuerpos antinucleares y factor reumatoide.

Actualmente se acepta en el laboratorio clínico, que las técnicas que detectan particularmente IgM, como las mencionadas, permiten diagnosticar infección aguda, como lo demostraron Remington et al(17).

A partir de los trabajos de Van Knapen y Pangebeun (18), la atención se ha encaminado a la demostración de antígeno circulante --

que afina más el diagnóstico de toxoplasmosis activa y existen varios métodos que detectan este antígeno circulante como son inmunolectroforesis (IEF), inmunodifusión en gel y ELISA (20,21). Por otra parte en el año de 1984 (22) se emplearon Staphylococcus aureus para detectar anticuerpos de Toxoplasma gondii.

Por los datos presentados, concluimos que el diagnóstico de laboratorio de toxoplasmosis activa es de vital importancia para el tratamiento y pronóstico de pacientes, principalmente mujeres embarazadas en las que el futuro del producto del embarazo puede resultar fatal o de secuelas graves.

## 2.- GENERALIDADES:

Toxoplasma gondii es un protozoario cosmopolita, descubierto en 1908 en un roedor del desierto, Ctenodactylus gundi, en el Instituto Pasteur en Túnez, actualmente la cepa se conserva en dicho Instituto. Desde entonces el parásito ha sido encontrado en casi todos los países del mundo en muchas especies de carnívoros, insectívoros, roedores, cerdos, herbívoros, primates y otros mamíferos, así como en aves (1).

### 2.1. CLASIFICACION: (23)

Phylum: Protozoa  
Subphylum: Apicomplexa  
Clase: Sporozoa  
Subclase: Coccidia

Orden: Eucoccidia

Suborden: Eimeriina

Familia: Sarcocystidae

Subfamilia: Toxoplasmatinae

Género: Toxoplasma

Especie: gondii

## 2.2. MORFOLOGIA:

Es un parásito intracelular estricto, de amplia distribución geográfica, con un ciclo sexual estenoxeno en félidos y un ciclo asexual eurixeno en mamíferos y aves.

Trofozoito: Tiene aspecto falciforme o de arco; de 3 a 7 micrómetros de largo por 1 a 2 micrómetros de ancho. En su extremo anterior presenta un complejo apical formado por un anillo polar, un conoide estructura que tiene forma de un cono truncado, constituido por fibras espiriladas; una serie de 22 microtúbulos subpeliculares que recorren el cuerpo desde el anillo polar hasta dos terceras partes (2/3). Tiene además, de 2 a 7 cuerpos en forma de clava, densos al microscopio electrónico llamados roptrias, conocidos en un principio como toxonemas, de posición anterior; unas estructuras cilíndricas alargadas denominadas micronemas que se extienden hacia atrás desde el extremo anterior del conoide y que junto con las roptrias es probable que tengan algún papel en el me

canismo de penetración a las células del hospedero. El núcleo, de tipo vesiculoso, está situado hacia la mitad del cuerpo; es esférico u oval y tiene en su interior un gran nucleolo. Cerca del núcleo se encuentra el aparato de Golgi y varias mitocondrias. Repartido en el citoplasma se observa el retículo endoplásmico; es frecuente observar unos gránulos densos constituidos por lípidos; a veces se observa un micropilo. En el extremo posterior hay otro anillo polar. Fig. no. 1 (23)

### 2.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS:

Toxoplasma gondii utiliza glucosa como fuente de energía, la que es degradada por la vía Emden-Meyerhof-Parnas. Posee un sistema de citocromos, una NAD oxidasa, produce catalasa y es sensible al cianuro (23). No sobrevive fuera del organismo pero lo hace a  $-70^{\circ}\text{C}$  en glicerina al 10% en nitrógeno líquido, resiste el fenol al 5% y el etanol al 70% durante 10 minutos. Muere a  $55^{\circ}\text{C}$  en cinco minutos. Los oocistos sobreviven a temperatura ambiente hasta un año, pero pierden su viabilidad a  $50^{\circ}\text{C}$  en 30 minutos y a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos(23).

Es un parásito intracelular obligado capaz de parasitar un gran número de hospederos (mamíferos y aves) y no se le ha podido cultivar en medios artificiales; sin embargo, crece fácilmente en cultivos de tejidos de muchas estirpes celulares.



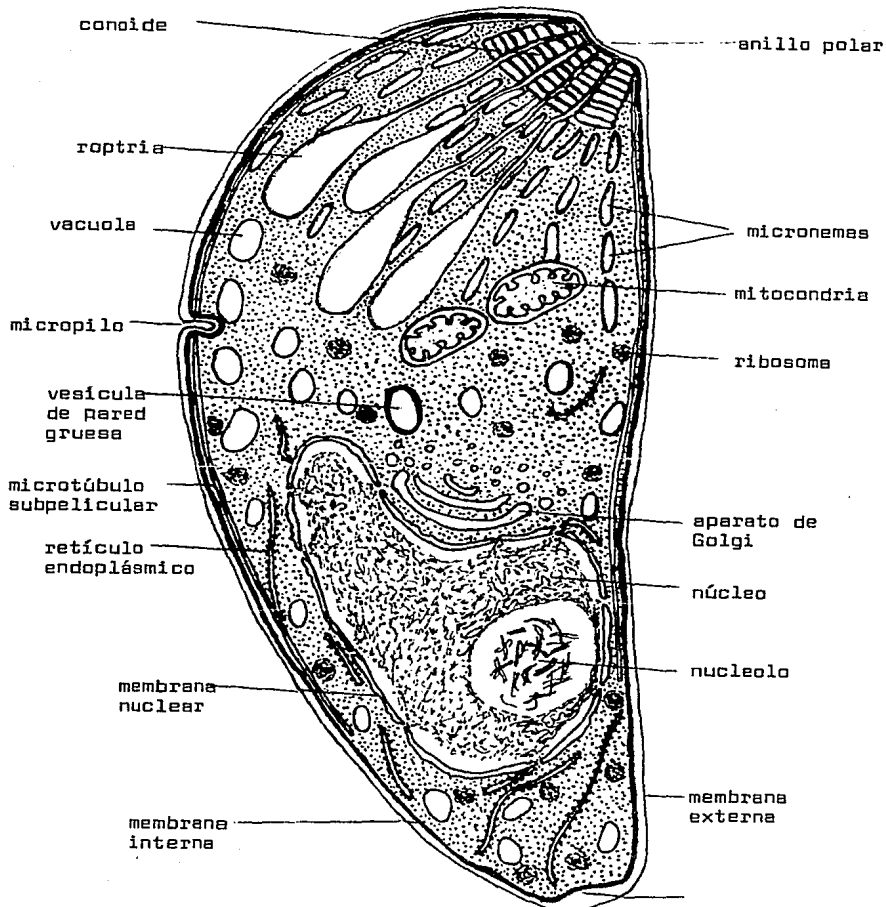


FIG. NO. 1 Trofozoito de Toxoplasma gondii

res; músculo y cartílago embrionarios, riñón de mono y conejo, macrófagos humanos y de ratón, células HeLa, células Vero, fibroblastos de embrión de pollo y otros (23).

#### 2.4. CICLO BIOLÓGICO:

Ciclo extraintestinal o asexual: Cuando los ooquistes, que miden de 11 a 14 micrómetros de largo y de 9 a 11 micrómetros de ancho son ingeridos por el hospedero (4 esporozoitos en c/esporoquiste por ooquiste), los esporozoitos en número de 8 se liberan en el intestino delgado. En los gatos algunos de los esporozoitos entran a las células epiteliales y permaneciendo ahí inician el ciclo enteroepitelial, mientras que -- otros penetran a la mucosa intestinal y por vía linfática y sanguínea, llegan a diversos tejidos invadiendo cualquier tipo de célula preferentemente macrófagos. En hospederos diferentes a los felinos no existe desarrollo enteroepitelial, - los esporozoitos entran a la célula y se reproducen por endodiogenia; los elementos resultantes invaden nuevas células reproduciéndose muy rápidamente por lo que se les ha denominado taquizoitos, que forman "grupos" de 8 a 16 parásitos - los cuales desintegran a la célula liberándose e infectando nuevas células. Fig. no. 2, Fig. no. 3 (1,23)

Cuando la infección se hace latente los trofozoitos que afec-

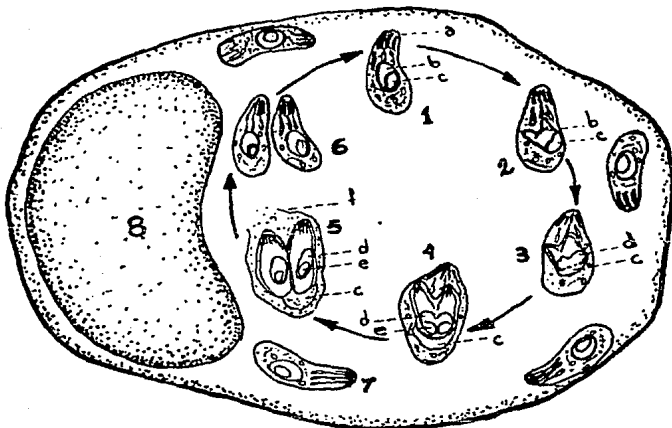
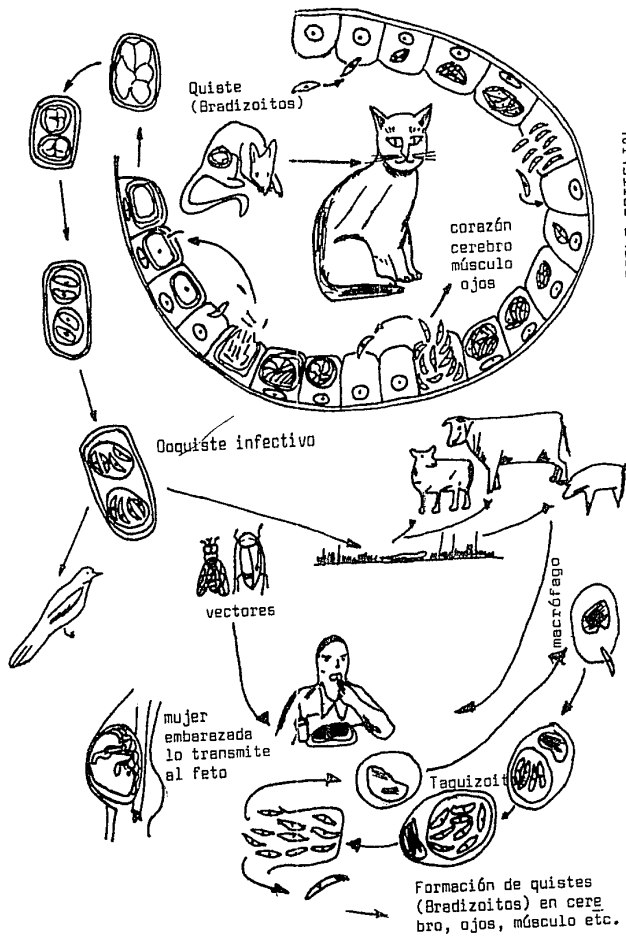


FIG. NO. 2 Esquema del proceso de multiplicación por endogamia en Toxoplasma gondii. 1.- Célula madre en estado de reposo, 2.- Gemación del núcleo de la célula madre e iniciación de la formación de dos trofozoitos hijos, 3.- Crecimiento de los dos trofozoitos hijos con formación del endosoma en ambas células y lisis del núcleo materno, 4.- Desarrollo de los trofozoitos por crecimiento, alargamiento anterior y maduración de sus núcleos, 5.- Ruptura de la célula madre y liberación de los trofozoitos, todavía unidos por su parte media, 6.- Separación de los trofozoitos hijos, 7.- Trofozoitos en el citoplasma del macrófago hospedero, a.- conoide, b.- núcleo del trofozoito, c.- núcleo de la célula madre, d.- núcleo del trofozoito hijo, e.- nucleolo del trofozoito hijo, f.- restos de la célula madre.

(Dibujos del Dr. Fernando de la Jara A., tomados de la tesis del Q.B.P. Luis Isita S. Ref. 23).

FIG. NO. 3 CICLO BIOLÓGICO



CICLO EPIITELIAL  
Intestino delgado (Ileon) de felinos.

CICLO EXTRAEPITELIAL  
(Humanos, cerdos, aves, roedores, etc.)

tan cerebro, corazón y músculo esquelético se multiplican mucho más lentamente que en la fase aguda, por lo que reciben - el nombre de bradizoitos que se acumulan en gran número dentro de las células hospederas. Conforme avanza la infección inducen a la célula hospedera a formar una pared delgada alrededor de ella, dando lugar a los llamados quistes o zoitoquistes (Frenkel, 1973).

Ciclo enteroepitelial o sexual: Es iniciado cuando los gatos ingieren quistes, ooquistes u ocasionalmente taquizoitos. Otro - posible mecanismo de infección epitelial es por migración de - trofozoitos extraintestinales hacia el intestino. Dentro de la célula epitelial del intestino delgado o colon el parásito llega a trofozoito y se prepara para la esquizogonia. El número - de ciclos esquizogonios es variable, pero los gametocitos son producidos de 3 a 15 días después de la infección. Los trofozoitos llegan al estado de gametocitos desarrollándose más comúnmente en el ileon; de 2 a 4% de los gametocitos son masculinos, produciendo cada uno 12 microgametos. Después de la maduración los gametos se unen dando lugar a un cigoto, este da finalmente un ooquiste inmaduro que es expulsado junto con las heces al exterior, donde maduran en el término de cinco días porque requieren de oxígeno para esporular (Frenkel et al, 1970) transformándose en el ooquiste infectante, constituido por dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno. Los ooquistes

pueden permanecer infectivos hasta por un año (Olsen, 1974).  
Fig. no. 3 (1,23)

## 2.5. PATOGENIA:

La toxoplasmosis clínica es rara aún en vista del hecho de que los anticuerpos contra toxoplasma están presentes en la mayoría de los humanos. Muchos factores influyen este fenómeno no como son: la virulencia de la cepa de toxoplasma, la susceptibilidad individual, la de las especies y la edad del hospedero así como el grado de inmunidad del mismo (1,23,24).

Las infecciones asintomáticas pueden llegar a ser fulminantes si se administran fármacos inmunosupresores o cuando el individuo está inmunocomprometido.

Las infecciones sintomáticas pueden ser clasificadas en agudas, subagudas y latentes. En las infecciones agudas el intestino es el primer sitio de infección, posteriormente se infectan los nódulos linfáticos mesentéricos y el parénquima del hígado, ahí hay una rápida regeneración de células y se ejecuta una secreción preliminar de los parásitos. Los síntomas más comunes de la toxoplasmosis aguda son dolor óseo, inflamación de los nódulos linfáticos cervicales, supraclaviculares y de la región inguinal; estos síntomas pueden estar asociados con fiebre, dolor de cabeza, dolor mus-

cular, anemia y algunas veces complicaciones pulmonares, dicho síndrome puede ser confundido con influenza. Esta infección puede raramente causar la muerte. Si la inmunidad se desarrolla lentamente las condiciones clínicas pueden ser prolongadas, y entonces la infección se llama subaguda.

En la infección subaguda las condiciones patogénicas están extendidas el daño puede ser mayor en el SNC que en otros órganos, debido a la baja competencia inmunológica en estos tejidos.

Infección latente: resulta cuando la inmunidad eficiente disminuye la proliferación de taquizoitos, esto coincide con la formación de quistes; estos pueden permanecer intactos por años sin producir efectos clínicos, ocasionalmente la ruptura de la pared del quiste libera bradizoitos, la mayoría de ellos serán muertos por los anticuerpos y complemento y algunos formarán nuevos quistes .

La muerte de los bradizoitos en el cerebro estimula una reacción inflamatoria de hipersensibilidad formándose nódulos de células glía. Si se forman muchos nódulos el hospedero puede desarrollar síntomas de encefalitis crónica con parálisis espástica en algunos casos. Las infecciones repetidas en células de la retina pueden romperla y causar ceguera. Otros tipos de patología son miocarditis con daño permanente en el corazón y neumonía (1,24,25).

### 2.5.1. Infección congénita:

La infección toxoplasmósica prenatal únicamente tiene lugar cuando una mujer contrae esta parasitosis por primera vez en el embarazo (1,23).

Toxoplasma gondii, a semejanza de lo que sucede con otros agentes de enfermedades infecciosas, solo puede invadir el fruto después de la finalización de la placentación y por lo tanto, también de la organogénesis. Para que este hecho ocurra, se considera necesaria la existencia de una parasitemia fenómeno relacionado con la primoinfección (26,27).

El riesgo fetal es mayor cuando la madre adquiere la infección durante el segundo y tercer trimestre de la gestación, como resultado de dicha infección puede haber aborto, óbito o nacimiento con malformaciones como son: microcefalia, macrocefalia, hidrocefalia y calcificaciones cerebrales, en el mejor de los casos manifestaciones tardías como retraso mental y ceguera (26,27).

Los daños en el feto como consecuencia de la primoinfección materna están condicionados por los siguientes factores:

- 1) Masividad de la infección y virulencia de los parásitos.
- 2) Capacidad de defensa de la madre.
- 3) Tiempo de incubación fetal.
- 4) Factores inmunológicos fetales.
- 5) Momento de la invasión del feto con relación al parto.



De lo anterior expuesto surge que la infección de la madre no es seguida indefectiblemente por la del niño y que, también la gravedad de las lesiones puede ser variable. Actualmente se acepta que cualquiera que sea el momento de la gestación en el cual ocurre la primoinfección de la madre, a continuación puede presentarse la invasión del feto. De la primoinfección en el primer trimestre se deriva un 16% de fetos infectados de los cuales el 10% presentan lesiones graves, el 3% daños leves y el 3% no evidencian sintomatología alguna. Las primoinfecciones producidas en el segundo trimestre del embarazo provocan 25% de infecciones fetales, las lesiones en el niño son respectivamente 8% serias, 6% leves y 11% asintomáticas. Las infecciones maternas en el tercer trimestre se acompañan en un 65% del compromiso del feto, con 0% de lesiones serias, 5% leves y 60% de infecciones asintomáticas (24,26,270).

## 2.6. LA RESPUESTA INMUNE EN LA TOXOPLASMOSIS:

Mucho se ha discutido acerca del papel que juegan los anticuerpos en el proceso infeccioso, pues aunque pueden alcanzar títulos altos, los parásitos prevalecen viables en los quistes. También es un hecho conocido que la infección tan ampliamente diseminada entre la población no produce enfermedad. Es evidente que la inmunidad humoral tiene una importante acción en el desarrollo de la parasitosis. Al estudiar la relación entre -

el título de anticuerpos y las modificaciones que éstos pueden causar en la morfología de los toxoplasmas, se encontró (Werner, 1963) que cuando los títulos son bajos entre 1:4 y 1:128 el parásito aún puede reproducirse; cuando el título se elevó a 1:4 000 el número de parásitos disminuyó sensiblemente y al término de la división endodiogénica, los parásitos quedan unidos sin separarse; cuando el título llegó a cifras de 1:16 000 ó más, la mayoría de los parásitos se lisan y sólo un pequeño grupo quedó en el interior de las células parasitadas formando quistes (17).

Inmunidad mediada por células o macrófagos: es conocido que los eventos intracelulares que siguen a la fagocitosis del microorganismo son, la liberación de los productos metabólicos y constituyentes de lisosomas dentro de la vacuola fagocítica y en la mayoría de las veces hay destrucción y muerte de los microorganismos. Sin embargo ciertas bacterias y protozoarios como T.gondii son capaces de vivir y multiplicarse dentro del medio ambiente intracelular (24,28). Evidencias morfológicas indican que los toxoplasmas vivos alteran la membrana vacuolar fagocítica, la vacuola se rodea de retículo endoplásmico y mitocondrias, esto puede estar relacionado importantemente con la ausencia de fusión lisosomal y el impedimento de la liberación de los componentes lisosomales.

En estudios con microscopía electrónica se observó que en los macrófagos el 50% de los toxoplasmas eran destruidos y el 50% restante sobrevivían y seguían siendo capaces de reproducirse (28).

Linfocitos: en experimentos donde se incubaban macrófagos con linfocitos sensibilizados con T. gondii, a los cuales se les agregó antígeno de toxoplasma se observó que inhibían o mataban al parásito a diferencia de los macrófagos incubados con linfocitos no sensibilizados. Con esto se demuestra que la inmunidad a la infección, causada por este parásito intracelular está mediada por células y que puede ser transferida por linfocitos de donadores inmunizados (24).

## 2.7. ESTRUCTURA ANTIGENICA:

Toxoplasma gondii provoca una respuesta inmunológica media da por anticuerpos y células en los hospederos. Existen un gran número de técnicas diferentes para medir la respuesta de anticuerpos hacia este parásito, sin embargo la naturaleza de los antígenos hacia los cuales está dirigida esta respuesta permanece sin estar bien estudiada. Algunas de las investigaciones que se han hecho para examinar la es

estructura de T.gondii, han utilizado inmunolectroforesis, inmunolectrotransferencia y electroforesis en poliacrila mida encontrando que algunos de los antígenos son reconocidos únicamente por anticuerpos del tipo IgM y otros por IgG (29,30,31,32,33).

Hadman y Remington encontraron que los anticuerpos IgG e IgM reconocen 4 polipéptidos correspondientes a un P.M. de 43 000, 33 000, 27 000 y 21 000 daltons, los cuales están presentes en las fracciones enriquecidas de membranas (29). Existe considerable controversia acerca de la existencia de glicoproteínas como principal componente de membrana. Hughes y colaboradores, en su trabajo experimental encontraron 11 antígenos; 9 de los cuales eran de naturaleza proteica y con un P.M. de 10 000 a 324 000 daltons. Uno de los antígenos era una glicoproteína de P.M. 139 000 y un polisacárido con P.M. de 105 000 daltons, éste último muy discutido en su naturaleza por otros autores (30,31). Una alternativa para estudiar los componentes antigénicos, es la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra de terminantes antigénicos relevantes del parásito. Por medio de ellos se ha demostrado que los anticuerpos en la prueba del colorante reconocen antígenos de membrana, los cuales son proteínas. También por este método se ha identificado un antígeno específico de la infección aguda denominado 6K

sin embargo, aún cuando en análisis de sueros de recién nacidos se detectan anticuerpos IgG dirigidos contra el antígeno 6K, no hay presencia de anticuerpos IgM contra el mismo. La naturaleza del antígeno 6K es glicoproteica y parece estar asociado con la membrana del protozoario (32).

## 2.8. METODOS DE DIAGNOSTICO:

Tradicionalmente se han utilizado diversas pruebas inmunológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis, así como - para conocer la prevalencia de la enfermedad.

En el diagnóstico de toxoplasmosis se plantean varias si tuaciones clínicas y se trata de averiguar si la exposición con Toxoplasma gondii es previa, actual o persistente.

La determinación de anticuerpos antitoxoplasma con fines de diagnóstico se ha realizado mediante el empleo de muy diversas técnicas: Fijación de complemento propuesta por Nicolau y Ravelo (1937), Hemaglutinación indirecta (HAI) de Jacobs y Lunde (1957, Precipitación por O'Connor (1957) Prueba de aglutinación indirecta de Fulton y Turk (1959), prueba de Colorante de Sabin y Feldman (1948), Inmunofluorescencia de Goldman (1957) y ELISA de Wells (1977), (3,4, 6, 11, 12).

Recientemente se ha investigado la detección de antígenos circulantes de T.gondii en la sangre de sujetos infectados con fines diagnósticos. Para la demostración de antígenos circulantes se han utilizado varias pruebas: Inmunodifusión en gel, Inmunolectroforesis, ELISA y últimamente se ha empleado Coaglutinación y HAI.

#### COAGLUTINACION:

La coaglutinación es una técnica que se utiliza como soporte de los anticuerpos Staphylococcus aureus. La mayoría de las cepas de S.aureus tienen como principal componente en su pared celular a la Proteína A (34,35).

No está muy clara la correlación entre su presencia y su patogenicidad "in vivo". La proteína está covalentemente unida a la parte de los péptidos glucanos de la pared celular.

Existe una marcada variación entre la cantidad de proteína A sintetizada por la mayoría de las cepas de S.aureus. Una de las cepas mejor productoras es la Cowan I (ATCC-12598, NCTC-8530). La cepa Wood no produce proteína A.

Propiedades fisicoquímicas de la proteína A:

La principal característica de la proteína A es su extraordinaria afinidad por las inmunoglobulinas, notablemente la IgG. Esta propiedad tan útil e interesante ha sido

ampliamente explotada en técnicas inmunológicas. La proteína A es una cadena única de polipéptidos de un P.M. de - 42 000 y contiene poco o nada de carbohidratos, su absorción al 1% y 275 nm es de 1.65 y la molécula contiene 4 - residuos de tirosina y nada de triptófano; es fácilmente radioionizada, su punto isoeléctrico es de 5.1 (36).

Existen 3 regiones altamente homólogas a la unión con la fracción Fc de la inmunoglobulinas, consistente en más de 50 aminoácidos. La molécula es muy estable al calor y agentes desnaturizantes, y la unión con IgG persiste después de tratamiento con Urea 4M, tiocianato 4M, ácido pH 2.5 e hidrocloreuro de guanidina 6M (36).

En la molécula intacta hay por lo menos dos sitios accesibles para unirse con IgG y la unión es una fracción Fc de la cadena gamma, la presencia de bajas concentraciones de detergentes no iónicos, no afecta la unión. La afinidad -- constante de IgG humana o de conejo es aproximadamente  $10^8$ /mol. La unión de IgG a proteína A activa complemento pero no hay relación entre la habilidad de una IgG para unirse a proteína A y su habilidad para fijar complemento (36).

La principal inmunoglobulina que se une a la proteína A es la IgG y la afinidad de subespecie de IgG humana es - IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>, además IgA<sub>2</sub> algunas subclases de IgM

se unen fuertemente, mientras que IgG<sub>3</sub> no se une al igual que IgA<sub>1</sub> (36).

La interacción de inmunocomplejos es extremadamente rápida ocurriendo en segundos, mientras que la unión de IgG libre es más lenta. Además la unión de antígenos acomplejados no se desplaza del absorbente ni por grandes cantidades de - IgG normal o IgG libre.

#### HEMAGLUTINACION INDIRECTA PARA BUSQUEDA DE ANTIGENOS

Esta técnica utiliza como soporte para los anticuerpos -- eritrocitos de carnero, los cuales se recubren de anticuerpos mediante tratamiento con cloruro crómico. Al poner en contacto el complejo eritrocitos de carnero- anticuerpos en presencia de Toxoplasma gondii se presenta la reacción de Hemaglutinación (38).



## FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA

Se han utilizado diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de la toxoplasmosis. La prueba de Sabin y Feldman (prueba del colorante azul de metileno) es la más aceptada debido a su especificidad y sensibilidad, pero es muy subjetiva además de que se requiere mucho tiempo y es potencialmente peligrosa ya que usa toxoplasmas vivos (4). La prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IF) es ampliamente utilizada para el serodiagnóstico concuerda bien con la prueba del colorante, pero necesita de mucho tiempo y requiere para su interpretación de una persona experta, además de que resulta costosa su realización (11). Para vencer estas dificultades, se ha ensayado la preparación de antígenos solubles en varios sistemas de prueba tales como fijación de Complemento Fc, Hemaglutinación indirecta (2,6,7,8,9,10) y recientemente estas preparaciones de antígenos se han empleado en la prueba de ELISA, un sistema de ensayo sencillo, rápido, objetivo y adecuado para automatización; su única desventaja es que es una determinación costosa. Todas estas pruebas son usadas para detección de anticuerpos específicos del tipo IgG y sabemos que el nivel de éstos es alto por largo tiempo incluso hasta años, lo que no discrimina entre una infección aguda y una latente. Aparte existen técnicas para la detección de IgM, tales como IgM-IF e IgM-ELISA; en la primera Camargo sugiere que su uso está limitado únicamente en el diagnóstico de toxoplasmosis congénita en niños re

ción nacidos (13,14). La IgM-ELISA es una determinación aplicable solamente en adultos porque el antígeno para el cual es específica la IgM se presenta en esta edad (32).

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La toxoplasmosis es una infección que puede evolucionar en forma grave, a veces mortal o bien en forma subclínica y aún asintomática. El estudio serológico más comúnmente usado es la búsqueda de anticuerpos, pero los niveles altos de los mismos no nos discriminan entre una fase aguda y una latente, porque ambas fases los presentan. Es importante distinguir entre las dos fases porque el tratamiento sólo es efectivo en la fase aguda, y sólo en esta fase una mujer embarazada que la presente tendrá un niño toxoplásmico (2,27).

El diagnóstico clínico en laboratorio de la toxoplasmosis aguda ha sido principalmente auxiliada por la detección de anticuerpos IgM y recientemente se ha incrementado la atención hacia la detección de antígenos de toxoplasma en la sangre de sujetos infectados.

En esta tesis se probarán dos técnicas: Coaglutinación utilizando Staphylococcus aureus como soporte y Hemaglutinación indirecta con eritrocitos de carnero como soporte para los anticuerpos, como métodos alternativos, y por medio de los cuales

se hará la búsqueda de antígenos libres (circulantes) de Toxoplasma gondii.

OBJETIVOS:

- 1.- Obtención de sueros hiperinmunes, y acoplarlos en eritrocitos de carnero y en *Staphylococcus aureus*.
- 2.- Estandarización de cada técnica determinando la concentración óptima de los antígenos para obtener la sensibilidad de las técnicas.
- 3.- Utilización de las técnicas de Coaglutinación y Hemaglutinación indirecta para establecer el diagnóstico confirmativo de toxoplasmosis aguda.
- 4.- Difusión de estas técnicas de diagnóstico de toxoplasmosis como medida preventiva para establecer un buen diagnóstico y tratamiento.

HIPOTESIS:

Si únicamente en la fase aguda de la infección existe proliferación activa de los toxoplasmas y por ende liberación de los antígenos circulantes, entonces el empleo de las técnicas de Coaglutinación y Hemaglutinación indirecta para detectarlos, nos darán un diagnóstico oportuno de toxoplasmosis aguda.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Ratones cepa CDW-1 de 20-22g

Toxoplasma gondii cepa RH

Conejos blancos Nueva Zelanda de 4-5Kg de peso

Staphylococcus aureus cepa NCTC-8530

Eritrocitos de carnero en alsever

Albúmina sérica bovina comercial

REACTIVOS:

Solución salina 0.85%

Fenol 5%

Solución fosfato salina amortiguada (PBS) pH=7.2, 7.3, 7.0

Tartrato de sodio y potasio grado reactivo

Sulfato cúprico grado reactivo

Cloruro crómico 0.01% grado reactivo

Dextrosa grado reactivo

Citrato de sodio dihidratado grado reactivo

Acido cítrico hidratado grado reactivo

Ager Muller-Hinton

Azida de Sodio grado reactivo

Solución saturada de ácido pícrico

Ager nutritivo

Colorante negro Sudán

Agua destilada

Agua desionizada

**MATERIAL:**

Jeringas de 1ml, 5 ml, 10ml

Agujas no. 22x32, 21x32 y 16x25

Cubreobjetos de 18x18 mm del no. 1

Pinzas de disección

Cubre bocas

Guantes de látex para cirujano

Mechero Fisher

Matraces de Erlenmeyer de 100, 250, 500 y 1000ml

Tubos de ensaye de 13x100 mm

Pipetas Pasteur de vástago c orto

Pipetas graduadas de 1,2,5 y 10ml

Cámara de Neubauer

Vasos de precipitados de 100, 250, 500 y 1000ml

Gradillas

Termómetro de -10 a 180°C

Gasa

Algodón

Pipetas automáticas de 25 y 100 microlitros

Placas microhemaglutinación de poliestireno

Microdilutores de 25 microlitros

EQUIPO:

Microscopio binocular ZEISS West Germany 46 40 22-9901

Certrifuga clínica Sol-Bat Mod. J-12

Sonicador Biosonick sonicator W-370

Agitador Vortex Mod. K-22

Autoclave PRESTO MDD. 854

Baño María CHROMALDX CHR 22 227

Balanza analítica METTLER Tipe HG dig.. Cap. 160g no. 188009

PREPARACION DE SOLUCIONES:

CLORURO CRÓMICO: CONCENTRACION 0.1%

Pesar un gramo de cloruro crómico ( $\text{CrCl}_3$ ) y disolverlo en 1000 ml de solución salina 0.85%. El pH se debe ajustar tres veces en una semana a  $\text{pH}=5$  o tres veces en tres semanas.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS  $\text{pH} = 7.3$

$\text{NaCl}$	7.01 gramos
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.83 "
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.62 "

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS  $\text{pH} = 7.2$

$\text{NaCl}$	8.00 gramos
$\text{KCl}$	0.2 "
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.15 "
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 "

Aforar a 1000 ml con agua destilada.



MÉTODOS:

PREPARACION DE ANTIGENO PARTICULADO

El antígeno particulado de T. gondii se preparó con taquizoitos obtenidos de exudado peritoneal de ratón infectado dos días antes con T. gondii cepa RH. El exudado fue lavado tres veces con solución salina y tratados con PBS formalado al 1% por tres horas y nuevamente lavado con solución salina y ajustado en cámara DE Neubauer a una concentración final de  $15 \times 10^7$  toxoplasmas por 0.5 ml de solución salina. (37)

PREPARACION DE ANTIGENO SOLUBLE:

El antígeno soluble de T. gondii fue preparado usando taquizoitos obtenidos de la misma manera que el punto anterior. El exudado se pasó a través de una aguja no. 26 para liberar a los taquizoitos que aún permanecían dentro de los macrófagos; se centrifugó a continuación a 400 rpm durante 10 minutos para centrarlos. Se lavaron tres veces con solución salina, se trataron por congelación y descongelación y después se sonicaron a tres pulsos por 30 minutos a intervalo de 2 minutos cada uno. El sonicado se centrifugó a 6000 rpm por una hora, el botón formado se desechó y al sobrenadante se le determinaron proteínas por Lowry (39).

#### ANTICUERPOS CONTRA T.GONDII:

Los anticuerpos contra T.gondii fueron obtenidos de conejos --- blancos Nueva Zelanda de 3 Kg de peso. La inmunización inicial se realizó con inmunización intravenosa de 0.5 ml de antígeno particulado, a los tres días otra inoculación de 0.5 ml, después a los cuatro días otra vez siguiéndose este modelo por espacio de un mes. Diez días después de la última inoculación con antígeno particulado, se retó al conejo con 10 000 toxoplasmas vivos por vía subcutánea; se sacrificó al animal 30 días más tarde, presentando un título de anticuerpos de 1:128 000 por HAI. El suero se precipitó con solución de sulfato de amonio al 33%, se dializó contra solución salina durante tres días; se le determinó proteínas obteniendo una concentración de 16 mg/ml en solución salina.

#### INMUNDELECTROFORESIS:

Se realizó la inmunoelectroforesis según Cawley (40,41), colocando extracto crudo de antígeno soluble de T. gondii, contra diferentes concentraciones de anticuerpos, para observar los diferentes tipos de antígenos circulantes reconocidos por nuestros sueros hiperinmunes.

#### CONTRAINMUNDELECTROFORESIS:

En esta técnica se utilizaron los mismos sueros y antígeno que

en el experimento anterior, simultáneamente con el mismo (40,41).

#### INFECCION EXPERIMENTAL EN CONEJOS

A dos conejos blancos Nueva Zelanda, se les inoculó intramuscularmente 1000 toxoplasmas vivos en 0.5 ml de solución salina - 0.85% estéril, les fue tomada una muestra de sangre previa a - la inoculación y presentaron un título de anticuerpos negativos (contra T. gondii), requisito indispensable para ser utilizados en el experimento.

Para comprobar la parasitemia en los animales infectados, se - inocularon tres ratones por conejo con 0.3 ml de sangre (por - ratón) con cada una de las muestras, inmediatamente después de obtenida ésta. Los exudados peritoneales de los ratones se analizaron cinco días después.

La virulencia de la cepa se verificó: inoculando cada exudado - peritoneal en más ratones (0.3 ml por ratón). Los exudados peritoneales de estos ratones se observaron a los tres días.

A cada una de las muestras obtenidas se les determinó presencia de antígenos circulantes por Coaglutinación y Hemaglutinación - indirecta.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR FOLIN (39)

REACTIVO A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% más tartrato de sodio y potasio al 0.02% en  $\text{NaOH}$  0.1 N

REACTIVO B:  $\text{CuSO}_4$  al 0.5% en agua

REACTIVO C: 50 ml del reactivo A más un ml del reactivo B.

REACTIVO D: Reactivo de FOLIN-CICALTEAU sin diluir.

TECNICA:

Un mililitro de muestra problema (2.5 - 500 microgramos/ml) más 3ml del reactivo C. Dejar reposar diez minutos y adicionar 0.1ml del reactivo D. Dejar reposar 30 minutos y leer a 600 nm. Leer contra blanco que lleva 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada más tres ml del reactivo D.

CURVA PATRON:

50 mg/100 ml aproximadamente 500 microgramos/ml de albúmina sérica bovina. Colocar: 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0 ml

TECNICA DE COAGLUTINACION (34,35)

ESTABILIZACION DE S. aureus

Staphylococcus aureus Cowan I NCTC-8530

Si esta en agar nutritivo  
sembrar 5 cajas con AMH

Si está liofilizada se  
resuspende en caldo nu  
tritativo e incubar a  
37°C/24 horas

Se sembraron 15 cajas con agar Muller Hinton  
incubar a 37°C durante 24 horas

Cosechar 5m de PBS pH= 7.3 por cada caja  
Lavar 3 veces con el mismo PBS.

Centrifugar a 3000 rpm 15 minutos y resus  
pender al 10% P/V en PBS

Inactivar durante tres horas con formal al 0.5%  
(o 1.5 horas con formal al 1.5%) agitando cada  
15 minutos.

Lavar tres veces con PBS pH= 7.3 y resuspender  
al 10% con PBS PH= 7.3

↓  
Poner en un baño maría de 80°C por 10 minutos  
previo calentamiento del matraz, seguidamente  
enfriar con agua de la llave.

↓  
Lavar tres veces con PBS. pH=7.3 y resuspender  
al 10% con el mismo PBS con azida de sodio al  
0.02%

SENSIBILIZACION DE Staphylococcus aureus (34,35,36)

Staphylococcus aureus

estabilizado

1 ml

Antisuero específico

0.1 ml

Se incubó a 37°C por una hora  
con agitación ocasional

Lavar dos veces con PBS pH= 7.3 con  
azida de sodio 0.02% a 3000 rpm por 10 min.

Resuspenderen PBS pH= 7.3 con azida de sodio  
a una concentración del 5%

Agregar una gota de cristal violeta  
al 1% y agitar

Reactivo coagulante.

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE COAGLUTINACION :

Para la estandarización de esta técnica se emplearon placas de microhemaglutinación, con las cuales se realiza lo siguiente.

Del pozo no. 1 al 12 horizontal y de la letra A a la H vertical se colocaron 25 microlitros de PBS pH=7.3.

En la columna 1 (pozo 1A hasta 1H) se adicionaron 25 microlitros de extracto crudo de I. gondii a cada pozo, se mezcla bien y se diluye 1:2, 1:4, 1:8 .....etc, en cada fila.

Partiendo de la suspensión de estafilococos al 5%, se realizan en tubos de ensayo diluciones 1:2, 1:4, 1:8.... etc.

Se adiciona a la fila A (1A hasta 12A) 25 microlitros de la dilución 1:2 de la suspensión de estafilococos; a la fila B la dilución 1:4 y así sucesivamente para formar el ajedrea.

Se mezclan todos los pozos, se toman 25 microlitros de la mezcla se colocan en un portaobjetos y se observa la aglutinación.



TECNICA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA PARA BUSQUEDA DE ANTIGENOS

- 1.- Se lavan los eritrocitos de carnero; puestos previamente en solución de alsever con no más de 15 días; con solución salina al 0.85% 3 veces.
- 2.- Del botón resultante de la última centrifugación se toman -- 0.1 ml de eritrocitos y se mezclan con 0.1 ml de anticuerpos (concentración 4 mg/ml) y después con 0.1 ml de cloruro crómico al 0.01% preparado en el momento (si se desea preparar días antes de debe ajustar 3 veces en una semana ó 3 veces - en 3 semanas a un pH de 5).
- 3.- Ya mezclados se agitan suavemente durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Después se lavan con solución salina al 0.85% una vez a 2000 rpm x 5 minutos.
- 5.- A continuación se lavan dos veces con PBS pH=7.2 y se resuspenden en PBS a una concentración final de 1%.

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA  
(BUSQUEDA DE AGS):

Se sensibilizaron los eritrocitos de carnero con diferentes --  
concentraciones de anticuerpos (0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 y -  
10 mg/ml). A cada concentración de los mismos se les realizó -  
el ajedres, pero en lugar de las diluciones 1:2, 1:4, ....etc.  
de los anticuerpos, se utilizaron concentraciones al 0.5%, 1%,  
1.5% y 2% de la suspensión de eritrocitos sensibilizados.  
En esta estandarización se empleó PBS pH= 7.2.

SUEROS HUMANOS

Se eligieron 64 sueros humanos al azar, 17 de los cuales fueron  
negativos y 47 fueron positivos por la técnica de Hemaglutina-  
ción indirecta para búsqueda de anticuerpos.  
Los 64 sueros se descomplementaron a 56°C por 30 minutos, antes  
de ser utilizados para la búsqueda de antígenos circulantes por  
coaglutinación y hemaglutinación indirecta.

## RESULTADOS

Los resultados se presentaran en forma de figuras, tablas y gráficas.

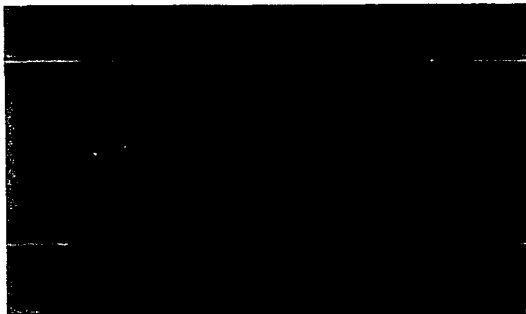


FIG. NO. 4 INMUNO Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

En las dos primeras placas se observa una banda de precipitación, cuando se usó extracto crudo de antígeno soluble de *T. gondii* (3mg/ml) y suero hiperinm. de conejo (placa 1: 17 mg/ml; placa 2: 50 mg/ml).

En la placa 3, se realizó contraimuno electroforesis con concentraciones de antígeno y suero iguales a la inmuno-electroforesis.

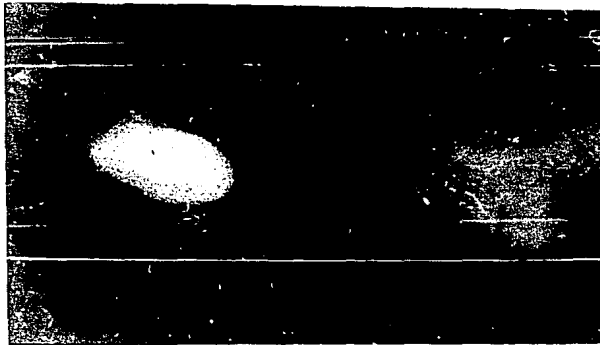


FIG. NO. 5 TECNICA DE COAGLUTINACION

En esta figura se presentan los testigos usados en la técnica. A la izquierda se observa el tes  
tigo negativo (suero de conejo  $t=0$ ), a la dere-  
cha el testigo positivo (extracto crudo de anti-  
genossolubles de T. gondii).

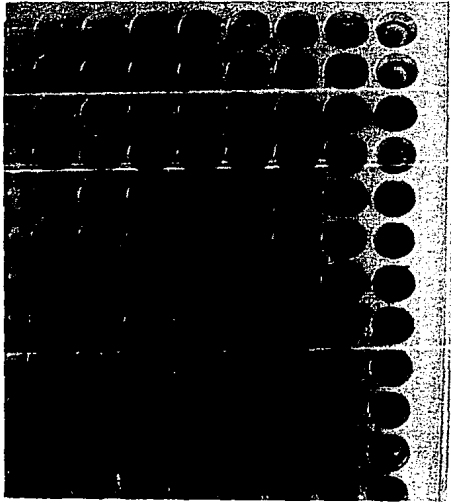


FIG. NO. 6 TECNICA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA  
(BUSQUEDA DE ANTIGENOS)

En esta figura se presenta una placa de microhema-  
maglutinación en donde se muestran algunos sue-  
ros humanos probados por esta técnica.

NO. DE MUESTRA	FECHA	CONEJO NO. 1		CONEJO NO. 2	
		PRUEBAS		PRUEBAS	
		CoA	HAI(Ags)	CoA	HAI(Ags)
1	24/II/86	-	1:8	-	1:8
2	26/II/86	-	1:8	-	1:8
3	27/II/86	-	1:8	-	1:8
4	28/II/86	-	1:8	-	1:8
5	3/III/86	-	1:8	-	1:8
6	4/III/86	-	1:8	+ <sup>d</sup>	1:16
7	5/III/86	+ <sup>d</sup>	1:16	+	1:16
8	6/III/86	++	1:32	++	1:32
9	10/III/86			+	1:16
10	13/V/86			-	1:8

TABLA NO. 1 Resultados de la toxoplasmosis en conejos.

d= débil positivo.

Al conejo no. 1 se le tomaron 8 muestras de sangre, murió el 9/III/86 .

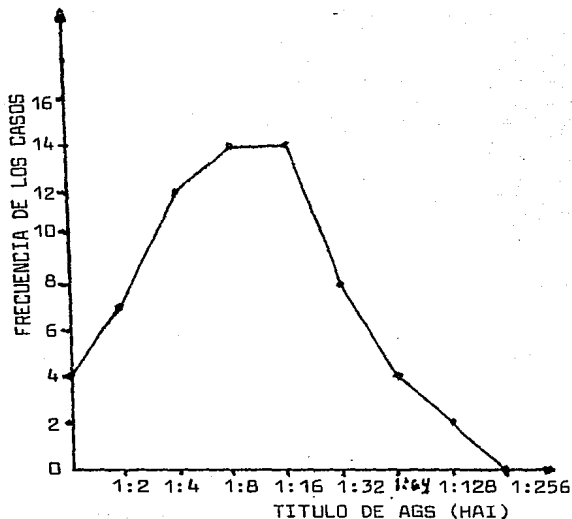
Resultados de la toxoplasmosis causada experimentalmente en 2 conejos, el título de anticuerpos fue determinado - únicamente el 1er. día (t=D) cuyo título fue negativo y al 8o. día con título de 1:4096.

TITULO DE AGS.	FRECUENCIA DE CASOS	%FRECUENCIA ACUMULADA
NEG.	4	6.25
1:2	7	17.18
1:4	12	35.93
1:8	14	57.81
1:16	14	79.68
1:32	8	92.18
1:64	4	98.43
1:128	1	100.00

TABLA NO. 2 Resultados de la prueba de HAI (Búsqueda de Ags.). En 64 sueros humanos, notando que los títulos de -- antígenos circulantes van desde 1:16 - hasta 1:128.

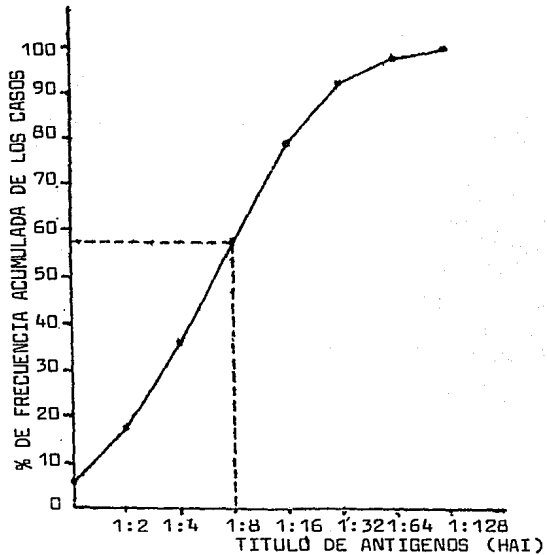
Testigo negativo se tomó el suero del conejo al  $t=0$ .

Testigo positivo se tomó el antígeno puro de toxoplasma y el suero de conejo el 80. día de infectado experimentalmente.



GRAFICA NO. 1 Resultados de la prueba de HAI (Búsqueda de Ags). Se representan los 64 sueros de pacientes con título de anticuerpos por HAI y los resultados obtenidos por HAI (Búsqueda de antígenos).

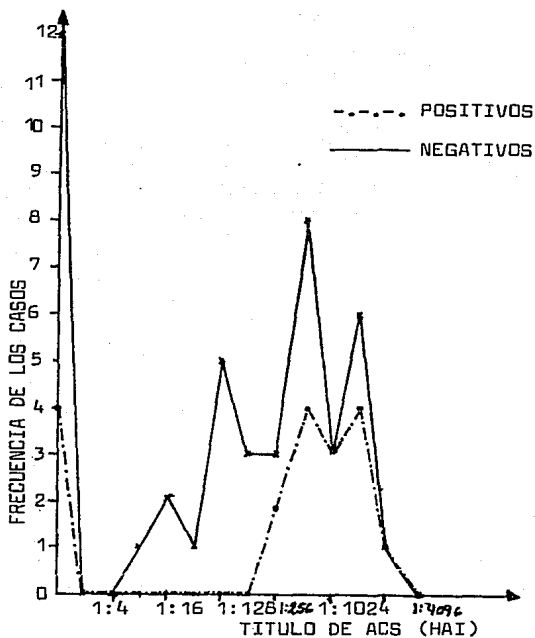




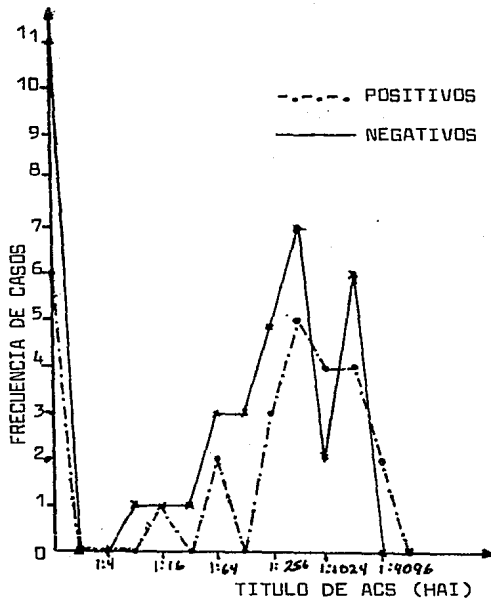
GRAFICA NO. 2 Resultados e la prueba de HAI (Búsqueda de Ags). Esta gráfica nos muestra que más del 50% de los sueros (64 pacientes) tienen un título menor o igual a 1:8. - En base a esto se tomaron como sueros negativos todos los que presentaran títulos semejantes. Se apoyó esta decisión en los resultados obtenidos con los sueros de los conejos Tabla no. 1.

TITULO DE ACS POR HAI	COAGLUTINACION		HAI (Ags)	
	POS	NEG	POS	NEG
NEG	4	12	6	11
1:2	0	0	0	0
1:4	0	0	0	0
1:8	0	1	0	1
1:16	0	2	1	1
1:32	0	1	0	1
1:64	0	5	2	3
1:128	0	3	0	3
1:256	2	3	3	2
1:512	4	8	5	7
1:1024	3	3	4	2
1:2048	4	6	4	6
1:4096	1	1	2	0

TABLA NO. 3 Resultados de las pruebas de Coaglutinación y HAI (Búsqueda de Ags). Observamos que existe casi el mismo comportamiento para ambas técnicas, ya sea con título de anticuerpos negativos como positivos, aunque se detectan más positivos por HAI que pos coaglutinación.



GRAFICA NO. 3 Resultados de la prueba de Coa (Coagulación contra la prueba de HAI (Búsqueda de Acs). La separación de los sueros negativos y positivos, nos muestra que los sueros positivos se encuentran entre los títulos 1:128 y 1:2048. Se muestran 64 sueros de pacientes.



GRAFICA NO. 4 Resultados de la prueba de HAI (Búsqueda de Ags) contra la prueba de HAI (Búsqueda de Acs). Aquí se observa que hay mayor sensibilidad de la prueba con respecto a la prueba de Coaglutinación presentada en la gráfica no. 3. A títulos bajos de Acs de 1:8 hasta títulos de 1:4096 se encuentra el rango de positivos para esta prueba lo que no ocurre en Coaglutinación. Se muestran 64 sueros de pacientes.

\* \* \* \* \* X1 HEMAGLUTINACION INDIRECTA (BUSQUEDA DE ACS) BY X2 \* \* \* \* \* COAGLUTINACION

X1	COUNT		X2		ROW TOTAL
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	
	0	1	0	1	
NEGATIVO	76	13	220	4	17
	200	2	200	2	26.6
POSITIVO	70	3	71	14	47
	71	2	77	3	73.4
	51	6	21	9	
COLUMN TOTAL	46	18	64		
TOTAL	71.9	23.1	100.0		

1 OUT OF 4 ( 25.0%) OF THE VALID CELLS HAVE EXPECTED CELL FREQUENCY LESS THAN 5.0.  
 MINIMUM EXPECTED CELL FREQUENCY = 4.781  
 CORRECTED CHI SQUARE = 0.03134 WITH 1 DEGREE OF FREEDOM. SIGNIFICANCE = 0.3595  
 RAW CHI SQUARE = 0.24185 WITH 1 DEGREE OF FREEDOM. SIGNIFICANCE = 0.6229

TABLA NO. 4 PRUEBA DE INDEPENDENCIA DE  $X^2$  PARA HEMAGLUTINACION INDIRECTA (BUSQUEDA DE ACS) CONTRA COAGLUTINACION.

Como  $0.03134 < 3.841$  ( $X^2$  de tablas); si existe independencia entre las dos pruebas. Por lo tanto los títulos de los anticuerpos son independientes de la presencia de los antígenos circulantes determinados por coaglutinación.

\*\*\* X1 HEMAGLUTINACION INDIRECTA (BUSQUEDA DE AGS) BY X3 HAI (BUSQUEDA DE AGS) \*\*\*

		X3		
	COUNT	PCT		ROW TOTAL
X1	COL	TOT	PCT	
		0	1	
NEGATIVO	0	11	6	17
		29.7	19.3	26.6
		17.2	10.6	
POSITIVO	1	26	21	47
		53.3	46.7	73.4
		40.5	27.8	
	COLUMN TOTAL	37	27	64
		57.8	42.2	100.0

CORRECTED CHI SQUARE = 0.14825 WITH 1 DEGREE OF FREEDOM. SIGNIFICANCE = 0.7002  
 RAW CHI SQUARE = 0.45101 WITH 1 DEGREE OF FREEDOM. SIGNIFICANCE = 0.5019

TABLA NO. 5 PRUEBA DE INDEPENDENCIA DE  $\chi^2$  PARA HAI (BUSQUEDA DE AGS) CONTRA HAI (BUSQUEDA DE AGS).

Como  $0.14825 < 3.841$  ( $\chi^2$  de tablas), si existe independencia entre las dos pruebas.

Los títulos de los anticuerpos son independientes de la presencia de los antígenos circulantes determinados por HAI (Búsqueda de Ags.).

\* \* \* \* \* X2 COAGLUTINACION BY X3 HAI (BUSQUEDA DE ABS) \* \* \* \* \*

X2	COUNT ROW PCT COL PCT TOT PCT	X3		ROW TOTAL
		0	1	
NEGATIVO	0	35 76.1	11 23.9	46 71.9
	1	4 8.7	2 4.2	6 9.6
POSITIVO	1	2 11.1	16 88.9	18 28.1
	COLUMN TOTAL	37 57.8	27 42.2	64 100.0

CORRECTED CHI SQUARE = 19.81003 WITH 1 DEGREE OF FREEDOM. SIGNIFICANCE = 0.0000  
 RAW CHI SQUARE = 22.30499 WITH 1 DEGREE OF FREEDOM. SIGNIFICANCE = 0.0000

TABLA NO. 6 PRUEBA DE INDEPENDENCIA DE  $X^2$  PARA COAGLUTINACION CONTRA HAI (BUSQUEDA DE ABS).  
 Como  $19.81003 > 3.841$  ( $X^2$  de tablas), no hay independencia, existe asociación entre  
 las dos pruebas.

```

$UNITS 4
$READ Y 35 11 2 16
$CAL FACTOR X2 = %GL(2,2); X3 = %GL(2,1)
$LINK Y L
$FIT + X2 + X3 $
CYCLE SCALED DEVIANCE DF
5 23.99 1

$DISPLAY E $ ESTIMATE S.E. PARAMETER
1 3.18200 XGM
2 -0.27700 X2(2)
3 -0.25331 X3(2)
SCALE PARAMETER TAKEN AS 1.000

$FIT + X2 X3 $
CYCLE SCALED DEVIANCE DF
3 0.2493E-14 0

$DISPLAY E $ ESTIMATE S.E. PARAMETER
1 3.55500 XGM
2 -2.86200 X2(2)
3 -1.15570 X3(2)
4 3.23370 X2(2) X3(2)
SCALE PARAMETER TAKEN AS 1.000

$END

```

TABLA NO. 7 PRUEBA DE LOGARITMOS PARA COAGLUTINACION CONTRA HAI (BUSQUEDA DE AGS).

Esta prueba nos indica que la dependencia o asociación que existe en la tabla no. 6 entre las técnicas ahí mencionadas se encuentra en la celda (2,2), la cual corresponde a encontrar sueros positivos por la prueba de Coaglutinación y esto mismo implica que también serán positivos por la prueba de HAI (Búsqueda de Ags).



## DISCUSIUN DE RESULTADOS

En las placas de inmunoelectroforesis que se corrieron , se observa tan sólo una banda de precipitación para cada uno de los diferentes sueros probados contra el mismo extracto crudo de antígenos solubles.

Esto podría deberse a que los anticuerpos con que se trabajó únicamente reconocen una fracción del extracto crudo o que éste no se separó lo suficiente y por lo tanto sólo se detecta una banda de precipitación.

Los conejos a los cuales se les provocó la infección aguda fueron solamente dos, pero los resultados obtenidos son muy valiosoa, porque no dan una idea de como se comporta la enfermedad causada experimentalmente.

Observamos que en la muestra tomada al inicio del experimento ( $t=0$ ) no se detecta la presencia de anticuerpos ni de antígenos, lo cuál es muy significativo.

No se logró seguir el título de anticuerpos día con día porque no se contaba con el kit para la prueba de HAI, pero vemos que las técnicas de Coaglutinación y Hemaglutinación indirecta nos detectan antígenos positivos al 7o. día posterior al inicio -

de la infección.

La presencia de parasitemia en los conejos fué positiva cuando se tomó la muestra al séptimo día de iniciada la infección, siendo también positiva la prueba de antígenos el mismo día, esto nos hace suponer que sí existe una relación entre antígenos - circulantes positivos y parasitemia positiva en el conejo.

La última muestra (no. 8) tanto para el conejo 1 como para el 2, nos dan un título de anticuerpos mayor a 1:4 000, la prueba de Coaglutinación es positiva en +++, el título de antígenos - por HAI es 1:32 y además se tiene parasitemia positiva. Con esto vemos que existe una relación entre título de anticuerpos elevado y presencia de antígenos circulantes en ambos conejos corroborado por la parasitemia.

Uno de los conejos murió de toxoplasmosis y el otro continuó - vivo, a este último se le tomó una muestra un mes más tarde y su título de anticuerpos fue de 1:256, no detectándose antígenos circulantes por ambas técnicas. Lo que nos sugiere que este conejo está en la fase latente de la infección, sin embargo el por qué un conejo murió de toxoplasmosis y el otro llegó a la fase latente de la enfermedad, es debido probablemente a la variabilidad biológica, ya que ambos siguieron el mismo tratamiento, tenían el mismo peso, edad, etc., pero esto no podemos

asegurarle totalmente porque hace falta un lote más grande de conejos y volver a repetir el experimento.

Por el escaso número de conejos experimentados se tomaron los datos del experimento como un estudio piloto, en el cual se basó la siguiente fase de la tesis.

Una vez establecidos los testigos positivos (extracto crudo de toxoplasma y suero de los conejos al octavo día) y los testigos negativos (PBS y suero de los conejos al  $t=0$ ); se probaron 64 sueros humanos tomados al azar. Todos los sueros fueron titulados con una prueba de hemaglutinación (prueba de referencia) para búsqueda de anticuerpos, tomándose como positivo de de el título 1:2..

La obtención de antígenos positivos con título de anticuerpos negativos lo podríamos interpretar de dos formas: una que se estén detectando resultados falsos positivos de ambas pruebas o que aún no se detectan anticuerpos porque es el inicio de la infección. .

Para verificar la existencia de relación entre título de anticuerpos alto y título de antígenos positivos, se realizó un es estudio estadístico con ji-cuadrada, y se encontró que es independiente el hallazgo de título de anticuerpos elevado y anti-

genos circulantes positivos. Pero existe relación entre los resultados obtenidos en las dos técnicas para búsqueda de antígenos -- circulantes, dándose esta asociación cuando se detectan títulos -- positivos en ambas técnicas, no así para los negativos, ésto puede deberse a que la técnica de HAI es más sensible y por lo tanto se reportarán más positivos que por la técnica de Coaglutinación.

La independencia de anticuerpos elevados y antígenos circulantes positivos puede ser debida a que la prueba de referencia utilizada en esta tesis, detecta niveles de anticuerpos del tipo IgG, los cuales son característicos de la etapa latente de la enfermedad, en este etapa no existe proliferación activa de los toxoplasmas y por ende no hay antígenos circulantes detectables.

Otras causas por las cuales puede disminuir la sensibilidad de -- las pruebas de búsqueda de antígenos circulantes puede deberse a la unión de antígenos a otras proteínas del suero, a la formación de complejos inmunes o a la degradación de los antígenos por proteasas presentes en el suero.

Para poder diferenciar entre la etapa aguda y latente de la enfermedad, debe establecerse la relación que existe entre los antígenos circulantes positivos y el tipo de inmunoglobulina detectada.

Al inicio de la infección (etapa aguda), el sistema inmune del --

hospedero elabora anticuerpos IgM dirigidos contra los componentes de la superficie del parásito (antígenos de membrana), con títulos máximos a los 14 días y con una duración de aproximadamente 3 meses. En la etapa latente, la respuesta inmune es desarrollada en respuesta a los antígenos liberados después de la muerte y lisis de los toxoplasmas (antígenos solubles o intracitoplasmáticos), y el anticuerpo formado es de tipo IgG principalmente, (dos a cuatro semanas de iniciada la infección) con títulos máximos a los 3-4 meses y que pueden permanecer elevados aún por años.

Esto nos lleva a analizar el tipo de inmunoglobulina que detecta la prueba de HAI para búsqueda de anticuerpos. Esta prueba reconoce anticuerpos del tipo IgG, debido al tipo de antígenos que se encuentran adheridos a los eritrocitos, el cual es soluble o intracitoplasmático.

Para solventar este problema se debieron de haber utilizado muestras de pacientes con toxoplasmosis activa diagnosticada por clínico y/o por técnicas como IgM-ELISA, IgM-IF o la prueba del coloreante. Seguidamente se hubiesen corrido las pruebas de Coaglutinación y Hemaglutinación indirecta para búsqueda de antígenos, y así se podría haber tenido una base mejor para relacionar presencia de antígenos positivos y toxoplasmosis aguda.

Como no tenemos estos datos no podemos establecer que las pruebas

de Coagulación y Hemaglutinación indirecta para búsqueda de antígenos circulantes, aunque den resultados positivos no detecten realmente la fase aguda de la infección.

Podemos decir que con las técnicas de Coagulación y Hemaglutinación indirecta es posible detectar antígenos circulantes en sueros de pacientes humanos, con una sensibilidad de 0.1 mg/ml.

Para mejorar estas técnicas para búsqueda de antígenos circulantes es necesario hacerlas más específicas, para ello es importante la purificación del antígeno más inmunogénico y más característico de la fase aguda de la infección, determinar su peso molecular, su naturaleza: lípido, proteína, carbohidrato, etc., y sobre todo el tipo de anticuerpo IgM a usar se debe purificar o producirlo como un anticuerpo monoclonal.

## CONCLUSIONES

Es posible obtener sueros de conejos hiperinmunes, sensibilizar con ellos eritrocitos de carnero y Staphylococcus aureus.

Se logró estandarizar las técnicas de Coagulación y Hemaglutinación indirecta , determinándose además su sensibilidad.

Se cumplió con la hipótesis propuesta, porque se detectaron antígenos circulantes por ambas técnicas.

Para que se determinara el estado agudo de la infección, tendríamos que relacionar títulos altos o bajos de IgM, títulos altos o bajos de IgG y presencia de antígenos circulantes positiva, o título de IgG elevado o bajo y antígenos circulantes positivo.

Si se tuviese cualquiera de los casos antes citados, se le daría o recomendaría dar tratamiento al paciente.

Para mayor seguridad en el diagnóstico de toxoplasmosis aguda se recomienda hacer paralelamente la búsqueda de antígenos circulantes por cualquiera de las técnicas y búsqueda de anticuerpos del tipo IgM.

Es recomendable continuar el estudio de estas técnicas para búsqueda de antígenos porque son fáciles de hacer, de bajo costo y

reproducibles.

Para aumentar la confiabilidad de ambas pruebas es necesario purificar los antígenos, estudiar y purificar los anticuerpos específicos o producir anticuerpos monoclonales para cada etapa de la infección.

Se observó que estas pruebas reconocen antígenos de Trypanosoma cruzi hasta un título de 1:32 .



## R E S U M E N .

El propósito de este trabajo fue el diseño de dos técnicas, Coaglutinación y Hemaglutinación indirecta para la detección de antígenos circulantes de T.gondii en sueros humanos.

Para ello se obtuvieron sueros hiperinmunes de conejos contra T.gondii, con estos sueros se sensibilizaron eritrocitos de carnero (HAI) y S.aureus (Coaglutinación) y posteriormente se procedió a la estandarización de cada una de las técnicas.

Con el fin de verificar el funcionamiento de ambas técnicas se realizó un estudio piloto, en el cual se causó la toxoplasmosis experimental en conejos y así se logró establecer la presencia de antígenos circulantes.

A continuación se trabajó con 64 sueros humanos a los cuales previamente se les determinó el título de anticuerpos contra T.gondii por HAI.

Se les aplicaron tanto Coaglutinación como HAI y los resultados fueron que por las dos técnicas se pueden detectar antígenos circulantes, siendo más sensible HAI ya que cuantifica 0.1 mg/ml .

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Schmidt G.D., Roberts L.S. Foundations of parasitology, The C.V. Mosby Company, ST. Louis Missouri, U.S.A. 1977. 128-134.
- 2.- Nicolau S., Ravelo A. 1937. La réaction de fixation du complément dans le sérum et dans les extraits d'organes D'animeux atteints de toxoplasmose expérimentale. Bull. Soc. -- Path. Exot. 66: 855-859
- 3.- Hirt J. 1980. Toxoplasmosis en toco-ginecologia. Acta Bio. - Clin. latin. 14: 217-226.
- 4.- Sabin A.B. 1942. Toxoplasmosis. A recently regognized disea of human beings. Adv. Pediat. 1: 1-60
- 5.- Sabin S.B., Feldman H.A..1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomene affecting a protozoan para site (Toxoplasma gondii). Sc. 108: 660
- 6.- Jacobs L., Lunde M.N. 1957. A Haemagglutination test for to plasme. J. Parasitol.. 43: 308
- 7.- Lunde M.N., Jacobs L. 1967. Differences in toxoplasma dye -

- test and haemagglutination antibodies show by antigen fractionation. Am. J. Trop. Med. Hyg. 16: 26
- 8.- Singh P., Chug T.D. 1978. Toxoplasma IHA antibodies in human sera. Ind. J. Pathol. Microbiol. 21: 125
- 9.- Thorburn H., Williams H. 1972. A stable haemagglutinating antigen for detecting toxoplasma antibodies. J. Clin. Pathol. 25: 762
10. Ambroise T.P., Simon J., Bayard M. 1978. Indirect Haemagglutination using whole mixed antigen for checking toxoplasmosis immunity and for serodiagnosis of human toxoplasmosis, compared with immunofluorescence. Biomed. 29: 245
- 11.- Suizer A. J., Hall E.C. 1967. Indirect fluorescent antibody test for parasitic disease. IV. Statistical study of variation in the indirect fluorescent antibody (IFA) test for toxoplasmosis. Am. J. Epidem. 86: 401
- 12.- Naot Y., Desmonts G., Remington J.S. 1981. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital toxoplasma infection. J. Pediatr. 98: 32-36
13. Camargo M.E., Leser P.G., et al. 1978/ Serology in early diagnosis of congenital toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 20: 152

- 14.- Camargo M.E., Leser P.G., Rocca A. 1972. Rheumatoid factors as cause for false positive IgM anti-toxoplasma fluorescent test. A technique for especific results..Rev.Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 12: 310
  
- 15.- Payne R.A., Isaac M., Francis J.M. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using antibody class capture for the detection of antitoxoplasma IgM. J. Clin. Pathol. 35: 892-896.
  
- 16.-Wielgaard F., Gruijthuijsen H. Van, Duermeyer W., et al. - 1983. Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for especific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981-987
  
- 17.-Calderón J.E., León D.G. 1985. Interpretación de las pruebas inmunoserológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis. Infec. Ano V. 10: 258-264
  
- 18.- Knapen E. van, Panggabean S.D. 1977. Detection of circulating antigen during acute infections with T. gondii by enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 16:545
  
- 19.- Raizman R.E., Neva F..A. 1975. Detection of circulating -

antigen in acute experimental infection with Toxoplasma gondii  
J. Infect. Dis. 132: 44-48

20.-Turunen H.J. 1983. Detection de soluble antigen of Toxoplasma gondii by a four modification of an enzyme immunoassay.-  
J. Clin. Microbiol. 17: 768-773

21.- Knapen F. van, et al. 1982 Detection of toxoplasma antigen  
in tissues by means of enzyme-linked immunosorbent assay .  
Am. J. Clin. Pathol. 77: 755

22.- Chalupsky J. 1984. Application of Staphylococcus aureus se  
rotype Cowan I (SA) in the serologic diagnosis of toxoplas  
mosis. J. Protozool. 31(4):A50

23.- Isita S.L. 1982. Toxoplasma gondii y la respuesta inmune.  
Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,  
I.P.N.

24.- Chinchilla M., Frenkel L.K. 1985. Specific mediator of ce  
lular immunity to Toxoplasma gondii in somatic cell or mi  
ce. Infect. Immun. 46:862-866

25.- Frenkel J.K., Jacobs L. 1958. Ocular toxoplasmosis. Opththal.

Rev. 59:260-279

- 26.- Thalhammer O. 1980. Infección toxoplasmosica prenatal. Acta Bioq. Clin. Latin. 14(2): 161-168
- 27.- Remington J.S., Araujo F.G., Desmonts G..1985. Recognition of different toxoplasma antigens by IgM and IgG antibodies in Mother and their congenitally infected newborns. J. Infect Dis.. 152(5): 1020-1023
- 28.-Jones T.C., Mirsch J.G. 1972. The interaction between T. gondii and mammalian cell. J. Exp. Med. 136: 1173
- 29.- Handman E., Goding J.W., Remington J.S..1980. Detection and characterization of membrane antigens of Toxoplasma gondii. Immunol 124: 2578-2583
- 30.- Hughes H.P.A. 1981. Characterization of the circulating antigen of Toxoplasma gondii. Immunol. Lett. 3: 99-102
- 31.- Hughes H.P.A., Knapen F. van. 1982. Characterization of a secretory antigen from Toxoplasma gondii and its role in circulating antigen production. Int. J. Parasitol. 12:433-437
- 32.- Erlich H.A., et al. 1983. Identification of an antigen; -

- specific immunoglobulin M antibody associated with acute to  
xoplasma infection. Infect and Immunol 41(2): 683
- 33.- Partanen P., Turunen H.J., et al. 1984. Immunoblot analysis  
of Toxoplasma gondii antigens by human immunoglobulin G, M,  
and A antibodies at different stages of infection. J. Clin.  
Microbiol. 20(1): 133-135
- 34.- Kessler S.W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells  
with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parame  
ters of the interaction of antibody-antigen complexes with  
protein A. J. Immunol 115(6): 1617-1624
- 35.- Kessler S.W. 1976. Cell membrane antigen isolation with -  
the staphylococcal protein A-antibody asorbent. J. Immunol.  
117(5): 1482-1489
- 36.- Goding J.W. 1978. Use of staphylococcal protein A as an -  
immunological reagent. J. Immunol. Meth. 20: 241-263
- 37.- Sethi, et al. 1980. J. Parasitol. 66: 192
- 38.- Jaudl J.H., Simmons R.L. 1957. The agglutination and sen  
sitization of red cells by metallic cations; interactions-  
between multivalent metals and the red cell membrane. Brit.

J. Haemat. 3:19

- 39.- Lowry D.H., et al, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent J. Biol. Chem. 193: 265-275
- 40.- Campbell D.H., Garvey J.S., Cremer N.E. y Sussdorf D.H. 1970. Methods in Immunology: 2a. Edición. W.A. Benjamin Inc. N.Y. 242-267.
- 41.- Cawley L.P. 1969. Electrophoresis and Immunelectrophoresis. Little. Brown and Co. Boston.