

ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UNA TECNICA DE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA DETECCION DE
IgG ANTI- *Toxoplasma* BASADA EN EL PRINCIPIO DE AVIDEZ.

MARTHA ROCIO JAIME SAAVEDRA

MONICA PAOLA LEON PLAZAS

TRABAJO DE GRADO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL

TITULO DE

BACTERIOLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

Santa Fe De Bogotá D.C.

29 de Agosto de 2000

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946: " La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".

**ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UNA TECNICA DE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA DETECCION DE IgG
ANTI-*Toxoplasma* BASADA EN EL PRINCIPIO DE AVIDEZ.**

MARTHA ROCIO JAIME SAAVEDRA

MONICA PAOLA LEON PLAZAS

Dr. JORGE ENRIQUE GOMEZ-MARIN
DIRECTOR

Dra. CARMEN INES MORA
ASESORA

Con formato: Francés
(Francia)

Dra: MARCELA GOMEZ
JURADO

Dra: CONSUELO LOPEZ
JURADO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
SANTA FE DE BOGOTA D.C.

29 de Agosto de 2000

**ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UNA TECNICA DE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA DETECCION DE IgG
ANTI-*Toxoplasma* BASADA EN EL PRINCIPIO DE AVIDEZ.**

MARTHA ROCIO JAIME SAAVEDRA

MONICA PAOLA LEON PLAZAS

Dr. CARLOS CORREDOR
DECANO ACADEMICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Dra. AURA ROSA MANASCERO GOMEZ
DIRECTORA

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
SANTA FE DE BOGOTA D.C.

29 de Agosto de 2000

A nuestros padres por otorgarnos la vida
y la esencia de lo que somos,
por sus continuos consejos, comprensión y paciencia.

A nuestros hermanos por su inmenso estímulo,
Por su confianza e incondicional apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera muy especial a nuestro director de trabajo de grado y amigo Dr. Jorge Enrique Gómez Marin por permitirnos la realización de este proyecto, por sus enseñanzas, meticulosa dedicación y generosidad quien sirvió como estímulo y fuente de inspiración, e hizo que nuestras ideas pasaran de la teoría a una loable realidad y le quedamos en deuda profunda ya que sus brillantes esfuerzos hicieron que esta investigación culminara con éxito.

También queremos expresar nuestra enorme gratitud al doctor John Carlos Castaño Osorio por su amistosa colaboración, valiosas sugerencias, paciencia y buen humor.

Agradecemos a los Doctores Carlos Agudelo, Augusto Corredor, Ligia Moncada, Consuelo López y Patricia Reyes miembros del Departamento de Salud Pública y Tropical, Instituto de Salud en el Trópico de la Universidad Nacional de Colombia por permitirnos disponer de los recursos del laboratorio de parasitología durante todo el proceso de investigación.

De igual manera manifestamos nuestro aprecio a los Médicos Veterinarios Doctores Jesús Cortes y Jimmy Vargas de la universidad Nacional de Colombia por proporcionar sugerencias para la manipulación de los animales de Laboratorio y al personal del Bioterio por suministrarnos sus instalaciones para el mantenimiento de los mismos.

Por ultimo agradecemos a la Dra. María Teresa Montoya de Londoño del laboratorio solidaridad, Armenia-Quindio por la donación de muchas de las muestras de los pacientes con toxoplasmosis incluidas en este estudio, así como a la Dra. Dora Fonseca de la fundación Artur Guillo, al Dr. Mauricio Ballona Director del Departamento de educación medica De la Clínica San Pedro Claver quienes hicieron valiosas sugerencias y a la Dra. Carmen Inés Mora profesora de la Pontificia Universidad Javeriana, por suministrarnos oportunos consejos y su incondicional asesoría en el transcurso de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

| | PAGINAS |
|---|---------|
| RESUMEN | 17 |
| 1 INTRODUCCION | 18 |
| 2 REVISION DE LITERATURA | 24 |
| 2.1 FISILOGIA Y ESTRUCTURA DEL <i>Toxoplasma gondii</i> | 24 |
| 2.2 CICLO BIOLÓGICO DEL PROTOZOO <i>Toxoplasma gondii</i> | 26 |
| 2.3 EPIDEMIOLOGIA | 30 |
| 2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS | 33 |
| 2.4.1 TOXOPLASMOSIS CONGENITA | 34 |
| 2.4.2 TOXOPLASMOSIS ADQUIRIDA EN PACIENTE INMUNOCOMPETENTE | 36 |
| 2.4.2.1 Forma Linfadenopática O Ganglionar | 36 |
| 2.4.2.2 Forma Ocular | 37 |
| 2.4.3 TOXOPLASMOSIS ADQUIRIDA O REACTIVADA EN PACIENTE INMUNODEFICIENTE | 38 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.1 | <i>INMUNOLOGIA</i> | 38 |
| 1.2 | <i>CINETICA DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A LA TOXOPLASMOSIS</i> | 42 |
| 1.3 | <i>DIAGNOSTICO DE LABORATORIO</i> | 44 |
| 1.3.1 | PRUEBAS INDIRECTAS O SEROLOGICAS | 45 |
| 1.3.1.1 | Prueba De Sabin Y Feldman (1948) | 45 |
| 1.3.1.2 | Inmunofluorescencia Indirecta | 45 |
| 1.3.1.3 | aglutinación Diferencial (Ac/Hs) | 46 |
| 1.3.1.4 | Elisa (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay) | 46 |
| 1.3.1.5 | Elisa IgG De Aidez | 47 |
| 1.3.1.6 | Técnica De Inmunocaptura (Ic) | 48 |
| 1.3.2 | PRUEBAS DIRECTAS (DETECCION DEL PARASITO) | 49 |
| 1.3.2.1 | Inoculación en ratón | 49 |
| 1.3.2.2 | Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR) | 50 |
| 1.4 | <i>PROFILAXIS</i> | 51 |

|

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | FORMULACION DEL PROBLEMA | 53 |
| 1.1 | JUSTIFICACION | 53 |
| 2 | OBJETIVOS | 54 |
| 2.1 | OBJETIVO ESPECIFICO | 54 |
| 2.2 | OBJETIVOS GENERALES | 54 |
| 3 | HIPOTESIS | 55 |
| 4 | MATERIALES Y METODOS | 56 |
| 4.1 | OBTENCION DEL ANTIGENO PARA PRUEBA DE IFI -I gG ANTI - <i>Toxoplasma</i> | 56 |
| 4.2 | VALIDACION DEL PRINCIPIO DE AVIDEZ | 57 |
| 4.2.1 | Inmunización de Ratón | 57 |
| 4.2.2 | Validación del Principio de Avidéz por IFI en Modelo Murino de Inmunización | 58 |
| 4.2.3 | Estandarización de la urea Como Agente Desnaturalizante por el Método de IFI en Sueros Humanos con Fecha de Infección Conocida | 59 |
| 4.3 | EVALUACION DE LA TECNICA DE IFI DE AVIDEZ EN 29 SUEROS DE GESTANTES | 60 |
| 5 | RESULTADOS | 64 |

|

| | | |
|-------|--|----|
| 1.1 | VALIDACION DEL PRINCIPIO DE AVIDEZ | 66 |
| 1.1.1 | Validación del Principio de Avidéz por IFI en Modelo Murino de Inmunización | 66 |
| 1.2 | ESTANDARIZACION DE LA UREA COMO AGENTE DESNATURALIZANTE POR EL METODO DE IFI EN SUEROS HUMANOS CON FECHA DE INFECCION CONOCIDA | 70 |
| 1.3 | <i>EVALUACION DE LA TECNICA DE IFI DE AVIDEZ EN 29 SUEROS DE GESTANTES</i> | 73 |
| 2 | DISCUSION | 78 |
| 3 | RECOMENDACIONES | 85 |
| 4 | CONCLUSIONES | 86 |
| 5 | ANEXOS | 87 |
| 6 | BIBLIOGRAFIA | 91 |

|

LISTA DE ANEXOS

| | PAGINAS |
|---|----------------|
| ANEXO N° 1: TITULACION DE CONJUGADOS | 87 |
| ANEXO N° 2: PREPARACION DEL FORMOL AL 2% | 88 |
| ANEXO N° 3: PREPARACION SOLUCION SALINA BUFFERADA PH: 7,2: 0,01M (PBS) | 88 |
| ANEXO N° 4: PREPARACION DE AZUL DE EVANS 1% | 89 |
| ANEXO N° 5: PREPARACION DE GLICERINA TAMPONADA PH: 9,0 | 89 |
| ANEXO N° 6: PREPARACION DE GLICERINA DE TRABAJO PH:9, | 89 |
| ANEXO N° 7: PREPARACION UREA 2M | 89 |
| ANEXO N° 8: PREPARACION | 89 |
| ANEXO N° 9: PREPARACION UREA 6M | 90 |
| ANEXO N° 10: PREPARACION UREA 8M | 90 |

|

LISTA DE TABLAS

| | PAGINAS |
|--|---------|
| TABLA 1: TITULOS IgG ANTI- <i>Toxoplasma</i> PO LA TECNICA DE IFI-A DE LOS DIFERENTES POOLES DE MODELO MURINO RECOLECTADOS ENTRE LOS DIAS 0 Y 45. | 67 |
| TABLA 2: RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA UREA EN SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION. | 71 |
| TABLA 3: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE IFI DE AVIDEZ EN 9 SUEROS DE GESTANTES CON IgM E IGA POSITIVA ANTI- <i>Toxoplasma</i> | 75 |
| TABLA 4: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE IFI DE AVIDEZ EN 20 SUEROS DE GESTANTES CON IgM E IGA NEGATIVA ANTI- <i>Toxoplasma</i> . | 76 |
| TABLA 5: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE AVIDEZ | 77 |

LISTA DE GRAFICAS

| | PAGINAS |
|---|----------------|
| GRAFICA 1: <u>ESTRUCTURA DEL TAQUIZOITO DE <i>Toxoplasma gondii</i></u> | <u>25</u> |
| GRAFICA 2: <u>CICLO VITAL DEL <i>Toxoplasma gondii</i></u> | <u>27</u> |
| GRAFICA 3: <u>EVOLUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE LOS ANTI CUERPOS ANTI -<i>Toxoplasma</i></u> | <u>43</u> |
| GRAFICA 4: <u>DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCEDIMIENTO DE LA TECNICA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE AVIDEZ</u> | <u>63</u> |
| GRAFICA 5: <u><i>Toxoplasma</i> CON FLUORESCENCIA PERIFÉRICA (POSITIVO)</u> | <u>64</u> |
| GRAFICA 6: <u><i>Toxoplasma</i> CON FLUORESCENCIA NEGATIVA.</u> | <u>65</u> |
| GRAFICA 7: <u><i>Toxoplasma</i> CON FLUORESCENCIA POLAR</u> | <u>65</u> |
| GRAFICA 8: <u>COMPARACION DE TITULOS SUERO DE RATON POOL VS PAPEL DE FILTRO</u> | <u>68</u> |

| | |
|--|-----------|
| <u>GRAFICA 9: ESTANDARIZACION DE UREA EN RATONES INMUNIZADOS CON COADYUVANTE.</u> | <u>68</u> |
| <u>GRAFICA 10 : TITULOS DE IgG ANTI-Toxoplasma POR IFI-A DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE RATONES INMUNIZADOS ENTRE LOS DIAS 0 -45.</u> | <u>69</u> |
| <u>GRAFICA 11: INDICE DE AVIDEZ OBTENIDOS POR IFI -A UTILIZANDO UREA 6M EN RATONES INMUNIZADOS CON COADYUVANTE</u> | <u>69</u> |
| <u>GRAFICA 12: EVOLUCIÓN DEL INDICE DE AVIDEZ EN SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 6M.</u> | <u>72</u> |
| <u>GRAFICA 13: EVOLUCIÓN DEL INDICE DE AVIDEZ EN SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 4M.</u> | <u>72</u> |
| <u>GRAFICA 14: EVOLUCIÓN DEL INDICE DE AVIDEZ EN SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 6M.</u> | <u>72</u> |
| <u>GRAFICA 15: EVOLUCIÓN DEL INDICE DE AVIDEZ EN SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 8M.</u> | <u>72</u> |

GRAFICA 16: DIAGRAMA DE DISPERSIÓN DEL ÍNDICE DE AVIDEZ POR LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE AVIDEZ DE PACIENTES CON INFECCIÓN AGUDA Y PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR TOXOPLASMOSIS.

74

RESUMEN

Con el fin de demostrar que la avidéz (medida de la intensidad de la unión antígeno-anticuerpo que aumenta con el tiempo de infección) puede ser medida por Inmunofluorescencia Indirecta para IgG anti-*Toxoplasma* utilizamos para su evaluación un modelo de inmunización murino inoculada con 40.000 taquizoítos de *Toxoplasma gondii* formolizados más adyuvante de Freund y se recolectaron sueros postinoculación durante 5 meses. Paralelamente se evaluaron 10 sueros humanos con toxoplasmosis y con fecha conocida de infección, la cual variaba entre 2 y 43 meses y sueros de 9 pacientes con marcadores de infección reciente y 20 pacientes con infección crónica toxoplásmica. Se compararon los títulos de IgG de todos los sueros por IFI en presencia de PBS y los de urea en diferentes concentraciones 2M, 4M, 6M, y 8M para determinar el índice de avidéz. Los resultados obtenidos en el modelo murino mostraron una avidéz por debajo del 50% en los primeros días postinoculación la cual fue incrementándose con el tiempo hasta obtener partir del tercer mes una alta avidéz. De los sueros humanos observamos en los primeros cuatro meses de infección, índices de avidéz menores de 25% y los sueros con infección mayor de 5 meses presentaron un índice de avidéz mayor al 50%. La técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de Avidéz es sencilla y permite discriminar las infecciones agudas de las crónicas y se presenta como un procedimiento novedoso de apoyo en el diagnóstico de enfermedades recientes.

Eliminado: 16

Eliminado: res

Eliminado: 6

1 INTRODUCCION

Eliminado: ¶

La toxoplasmosis es una infección producida por un protozoo intracelular obligado, el cual infecta al hombre y a la mayoría de animales de sangre caliente, tanto domésticos como salvajes, denominado *Toxoplasma gondii*, este microorganismo fue descubierto en células mononucleares de bazo e hígado en un roedor del norte de África (*Ctenodactylus gondii*) por Nicolle y Manceaux en 1908¹.

Con formato

La naturaleza de zoonosis que se le ha adjudicado a este parásito, ha hecho que adquiriera una vasta importancia en los últimos años y que se hayan cursado una serie de investigaciones para esclarecer dudas sobre su ciclo evolutivo, la epidemiología² y de la inmunología parasitaria. Los títulos serológicos positivos hallados hasta el momento, demuestran que aproximadamente la mitad de la población mundial en algún momento de su vida ha sido infectada por este esporozoo, lo cual ocurre generalmente de manera asintomática y autolimitada³, confirmándose que la toxoplasmosis esta más distribuida como infección que como enfermedad.

La importancia clínica de la toxoplasmosis se debe al daño severo que ocasiona el parásito en órganos y tejido que infecta, que varia de acuerdo al tipo de huésped afectado, el cual puede generar lesiones permanentes irreversibles por destrucción del parenquima cerebral y lesiones oculares

que pueden provocar ceguera, o formas menos severas como la fiebre ganglionar, neumonía toxoplásmica, alteraciones cardíacas, digestivas y hepáticas entre otras.

Sin embargo, las serias alteraciones en neonatos contempladas en casos de toxoplasmosis congénita han forzado a dar consideración especial a este protozoo. Estas infecciones son producidas generalmente a partir de una infección asintomática de la madre que adquiere el contagio por primera vez después de la concepción y luego la transmite al feto. Existe una relación inversamente proporcional entre la probabilidad de infección fetal y el momento de la gestación. Durante el primer trimestre el 10 al 15 % de los fetos resultan afectados los que puede llevar a muerte fetal in útero o parto pretermino. Aumentando estos valores a 30-54 % durante el segundo trimestre, y un 60 a 65 % en el tercero⁴. Durante el segundo y el tercer trimestre las infecciones dan lugar a casos subclínicos al nacimiento. Esto tiene como consecuencia que no sean detectados a menos que exista un programa de detección sistemático con pruebas de laboratorio. Estos casos asintomáticos desarrollan posteriormente signos de compromiso del sistema nervioso central como calcificaciones intracerebrales, coriorretinitis, hidrocefalia o microcefalia, así como convulsiones años o décadas después.

Por tal motivo, cuando una mujer embarazada adquiere Toxoplasmosis es considerada como riesgo para el feto de crítica importancia y se deben

encaminar todos los esfuerzos de diagnóstico en la determinación del momento exacto en el que la madre adquirió la infección.

En la actualidad se disponen de muchas técnicas para realizar un diagnóstico de la toxoplasmosis, sin embargo estas presentan limitaciones en el momento de diferenciar una infección toxoplásmica primaria de una infección crónica. El diagnóstico serológico de la primoinfección se ha basado tradicionalmente en la demostración de IgG e IgM específica anti-toxoplasma. En el primer caso es realmente difícil poner de manifiesto esta situación debido a la rápida aparición de anticuerpos del tipo IgG y al carácter asintomático de la mayoría de las infecciones toxoplásmicas primarias. En el caso de la IgM se presentan problemas de especificidad (falsos positivos), al encontrarse presente no solo en las primeras semanas de la infección, si no que también hasta en un 5 % de los pacientes en donde se ha observado que esta inmunoglobulina tiene la tendencia a persistir por largos periodos de tiempo (meses e incluso años)⁵⁶. Adicionalmente se debe tener en cuenta la presencia de inmunoglobulinas naturales en pacientes que nunca han tenido contacto con el *Toxoplasma gondii*, lo que dificulta su valoración como marcador de infección reciente, especialmente en mujeres embarazadas y ante la sospecha de infección congénita en el recién nacido. La solicitud y realización poco controlada de esta inmunoglobulina en el contexto de un embarazo, genera demandas de valoración serológica adicionales. Esto ha llevado a buscar procedimientos alternativos nuevos y sencillos que

Eliminado: o

Eliminado: o

pueden ayudar a dar un diagnóstico más certero y que simplifiquen su evaluación.

En 1964 EISEN y col⁷, realizan estudios sobre la maduración de los anticuerpos tipo IgG en ejemplares animales y concluyeron que en los primeros meses de una infección el huésped responde con la producción de anticuerpos de baja afinidad funcional. Esta afinidad tiene un incremento directamente proporcional al tiempo de infección. En 1984, INOUE demuestra que existe diferencias de las afinidades de los anticuerpos IgG específicos vírales en una infección primaria y durante la reinfección o la infección pasada. A partir de este momento esta particularidad se ha utilizado como diana demostrándose muy útil para la evaluación serológica en diferentes infecciones como Rubéola, virus de Epstein Barr y virus de la Hepatitis C⁸⁹¹⁰. En 1989 Hetman y col. desarrollan la técnica de avididad de IgG anti-Toxoplasma, la cual consiste en una adaptación de la prueba de ELISA IgG al incorporar un desnaturalizante de proteínas (urea 6M) a las diluciones del suero problema. Esto evita la unión de los anticuerpos de baja avididad con el antígeno en la fase sólida, siendo reconocidos solo los de alta avididad¹¹.

Desde entonces se han venido realizando estudios utilizando el principio de avididad para el diagnóstico de la toxoplasmosis en mujeres embarazadas. Otros investigadores han publicado sus observaciones como los ensayos realizados en Oslo Noruega en 1997 por Jemun et al, quienes evaluaron la precisión de una técnica de avididad de la IgG específica, y demostraron su capacidad para discriminar entre una infección primaria al

principio del embarazo y una infección anterior a este. Los resultados fueron comparados con los del método de Platelia TOXO IgM y el test de SCREENING. De un total de 92% de muestras positivas para la IgM específica antitoxoplásmica se reconocieron 72,8% de muestras con un índice bajo de avidéz, obteniéndose una avidéz de IgG anti-toxoplásmica mayor al 20% indicativo de infección con más de 20 semanas de haber comenzado¹². En 1998 Ashburny et al, compararon el valor de las pruebas de IgA, IgE y la avidéz de la IgG para el diagnóstico de la infección por *Toxoplasma* en el embarazo. Los resultados demostraron que una ISAGA IgE positiva con una baja avidéz confirman infección aguda, mientras que una IgE negativa correlacionada con una alta avidéz era diagnóstica de una infección pasada o crónica¹³.

El beneficio de esta técnica en un grupo de pacientes de alto riesgo, como en madres gestantes o adultos con sintomatología ganglionar, permite establecer el tiempo de la infección de manera precisa. Sin embargo los costos de esta prueba por el método de ELISA, pueden ser notablemente elevados. De esta manera una técnica sencilla, económica, rápida y asequible la cual combine un procedimiento básico inmunofluorescente y un agente elusor (urea) y que pueda diferenciar los índices de avidéz producidos en las diferentes fases de la infección y que pueda ser usado en los laboratorios de rutina, sería de gran ayuda en Colombia. Se espera que esta investigación aliente una mejor perspectiva, implementando el diagnóstico precoz e incitando al personal médico a realizar un

Eliminado:

seguimiento constante, para fortalecer y acrecentar la salud pública a nivel nacional.

2 REVISION DE LITERATURA

2.1 FISOLOGIA Y ESTRUCTURA DEL *Toxoplasma gondii*

El protozoo *Toxoplasma gondii* pertenece al Phylum *Apicomplexa*, clase *Coccidea* y al orden *Eimeriida*¹⁴ es un microorganismo unicelular que se halla recubierto por un sistema membranoso compuesto de una membrana externa trilaminar. Tal membrana condiciona al parásito y se ve interrumpida en la porción anterior por el complejo apical o conoide, estructura cilíndrica constituida por tres anillos polares¹⁵. Dicha membrana permite la adhesión del parásito a la célula huésped gracias a la presencia de proteínas de membrana (laminina e integrinas tales como $\alpha\beta 1$, SaG1 (p30)). Del interior de los anillos polares se desprenden 22 microtubulos que son los responsables del movimiento del organismos, esencialmente de su forma extracelular al penetrar la célula huésped. Se puede advertir junto al conoide en la región anterior una vesícula de actina-miosina y calmodulina sugiriendo una función de motor de penetración¹⁶.

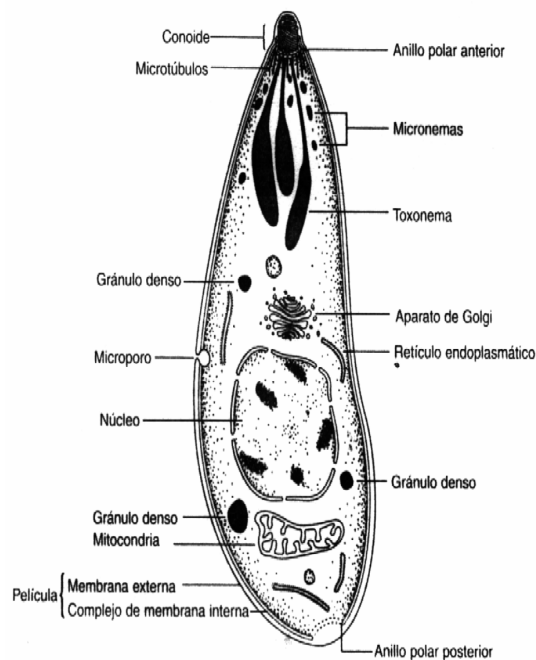
Las roptrias son estructuras de igual forma dispuestas en la región anterior que se originan en el conoide y que se extiende hasta la parte media del parásito. Su papel también esta relacionado con el proceso de

penetración a la célula huésped acumulando sustancias de secreción como son las enzimas proteicas (ROP1, PEF, ROP2 entre otras) y factores que disminuyen la viscosidad¹⁶. Asimismo, se ha encontrado en su interior mucopolisacaridos y fosfatasa ácida.

Como célula eucariotica, contiene un núcleo ubicado en la región central un poco posterior, con uno o dos nucléolos. Además se presentan las estructuras típicas de estas células como: centriolo, mitocontrias, aparato de Golgi, ect. Se puede observar una estructura lateral que corresponde aun microporo, visible con microscopio electrónico y por donde se asume el parásito realiza la toma del alimento ([Gráfica 1](#)).

Eliminado: GRAFICA

GRAFICA 1: Esquema de la estructura de un taquizoito de *T. gondii*. El conoide y el toxonema están involucrados en la penetración en células del huésped. (tomada de Remington J. s. 1995).



2.2 CICLO BIOLÓGICO DEL PROTOZOO *Toxoplasma gondii*

El ciclo vital del parásito (Gráfica 2) presenta cinco formas infectantes principales. Dos de ellas, los trofozoitos o taquizoítos (forma asexual invasora) y los quistes tisulares al interior del cual se encuentran los bradizoitos que se hallan en los hospedadores intermediarios (aves y diferentes mamíferos incluyendo al hombre). Las otras tres formas: esquizonte, gametocitos y ooquistes que son parte del ciclo sexuado solo se encuentran en células epiteliales del gato y otros felinos esto los hace sus hospedadores definitivos¹⁷.

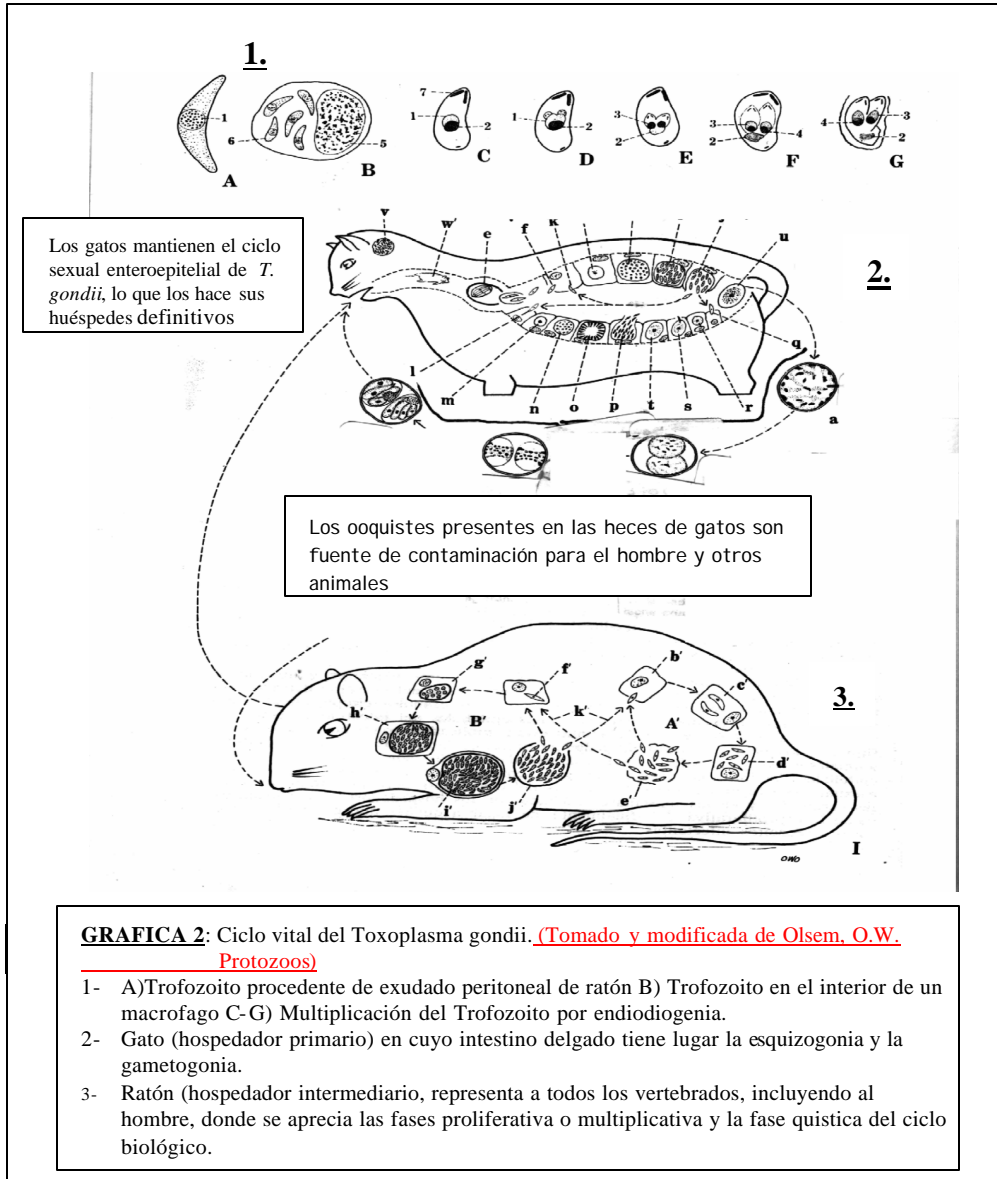
Eliminado: GRAFICA

Los taquizoítos, tienen forma de medialuna y miden alrededor de 7 micras de longitud por 2 a 4 μ de diámetro y se observan durante el estado agudo de la parasitosis donde abundan en el exudado peritoneal, libres.

Los quistes, poseen una membrana propia y miden entre 20 y 200 micras, de forma generalmente redondeada y ovalada, intracelulares, con gran cantidad de bradizoitos en su interior¹⁸.

Los ooquistes, con un promedio de 10 a 12 μ , es la etapa resistente del parásito que se forma como consecuencia de la gametogonia, en su interior se forman dos esporoquistes, cada una de los cuales en su interior contienen cuatro esporozoitos.

Los esquizontes, se desarrollan dentro de las células epiteliales del intestino delgado.



La fase sexual tiene lugar únicamente en las células epiteliales del intestino delgado del gato y otros felinos salvajes con la consecuente producción de ooquistes. Esto contrasta con el ciclo asexual el cual puede tener lugar en diferentes células del organismo, frecuentemente las cerebrales y en las musculares estriadas de los hospedadores intermediarios. Luego de la instauración de la respuesta inmune se realiza la conversión de taquizoítos a bradizoítos al interior de los quistes tisulares.

Los gatos infectados emiten en sus heces ooquistes los cuales en condiciones favorables (humedad, temperatura y aireación) pueden esporular y permanecer infectantes hasta por 12 meses en el suelo¹⁹. El gato se infecta al ingerir estos ooquistes maduros los que en el intestino delgado y bajo la acción de una solución de pepsina y de ácido clorhídrico se destruyen liberando esporozoítos. Algunos de ellos penetran en las células epiteliales del intestino del gato sobre todo en ganglios linfáticos mesentericos, donde sufren una esquizogonia o fase agomogonica multiplicándose por división en el citoplasma dentro de una vacuola parasitofora cada 4-6 horas. Finalmente lisan la célula huésped e invaden células adyacentes. Dando lugar a la proliferación de taquizoítos²⁰.

Eliminado: fase

En un periodo de tiempo que comprende entre 10 a 15 días, aparecen los taquizoítos con capacidad potencial para generar gametocitos, los cuales colonizan las células epiteliales del intestino donde aquellos con características masculinas se diferencian como microgametocitos que

fecundarán a las femeninas o macrogametocitos, con la posterior formación de ooquistes los que cuando alcanzan la madurez lisan la célula hospedadora quedando libres²¹.

En los animales que actúan como hospederos intermediarios en los que solo tiene lugar la fase asexual, los esporozoitos liberados de los ooquistes en el intestino pasan a la circulación y se diseminan por todo el organismo para colonizar diversos tipos de células como el cerebro, músculo estriado y cardíaco principalmente. Dentro de las células se lleva a cabo una multiplicación rápida o endodiogenia. Finalmente la célula se destruye liberando a los nuevos parásitos. En este periodo proliferativo agudo en donde los trofozoitos aparecen libres en exudado peritoneal y en distintos tipos de células, el huésped responde con la producción de anticuerpos específicos que restringen dicho proceso proliferativo en donde muchos de estos parásitos son destruidos. Como consecuencia de la respuesta inmune la infección pasa al estado crónico, el cual se caracteriza principalmente por la formación de quistes intracelulares con gran cantidad de bradizoitos que pueden alcanzar 200 μm de diámetro y contener hasta un millar de microorganismos.

Los quistes pueden permanecer intactos durante toda la vida del huésped. En general estos quistes provocan una reacción histica escasa o nula. La disminución de la inmunidad mediada por células que acompañan a los procesos graves, o a la administración de agentes inmunosupresores, pueden producir la ruptura del quiste y a la liberación de trofozoitos

originando una recrudescencia. Estos quistes tisulares son relativamente resistentes a los jugos digestivos, de ahí la posibilidad de transmitir la infección cuando son ingeridos en carne cruda o poco cocida.

De acuerdo a este planteamiento se puede establecer que los huéspedes se infectan de 3 formas:

- a. Forma directa: por la ingesta de ooquistes toxoplásmicos, presentes en los alimentos, aguas²²y/u objetos contaminados con heces de felinos²³
- b. Forma indirecta: por la ingesta de carne mal cocida o cruda que contengan quistes tisulares de *Toxoplasma*.
- c. Transferencia transplacentaria al feto de una madre infectada durante el embarazo (por contacto con gatos y/o ingesta de carne mal cocida)²⁴.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Para la infección por *Toxoplasma gondii* algunos autores establecen factores medioambientales (temperatura, humedad, oxigenación) que al lado de circunstancias inmunológicas individuales, permiten un mejor desarrollo del ciclo vital del parásito y por consiguiente la presentación de la infección escoltada por la consecuente enfermedad²⁵²⁶.

Particularmente de los factores medioambientales, la humedad y temperaturas entre 24 y 28°C favorecen la esporulación de los ooquistes eliminados de la materia fecal de los felinos, capacitados para provocar

infección a quienes los coman. En Colombia, Julio Oscar y cols²⁷, corroboran la participación de los factores medioambientales, al encontrar una mayor prevalencia de anticuerpos entre huéspedes que habitan en regiones de menor altura sobre el nivel del mar, acompañadas de climas cálidos y secos como el Atlántico y Oriental. Remington¹⁷ resume que la esporulación se lleva a cabo entre 2 a 3 días a una temperatura de 24°C, de 5 a 8 días a 15°C y de 14 a 21 días a 11°C. No es posible delimitar regionalmente los predios del *Toxoplasma gondii* y se considera como una infección cosmopolita, pero si es posible afirmar que las oportunidades de infectarse con *Toxoplasma gondii* sean más amplias a medida que el nivel de urbanización es menor, debido a las condiciones desfavorables en servicios básicos y saneamiento del medio.

En Colombia, se han realizado varios estudios de prevalencia serológica de la toxoplasmosis. El más importante de estos se realizó dentro del marco del Estudio Nacional de Salud, de 1977 a 1980, mediante una muestra probabilística representativa de la población Colombiana en sus 5 regiones, que comprendió a 9.139 personas de todos los grupos étnicos y de ambos sexos donde se encontró una tasa de seropositividad para IgG del 46.3%, en mujeres de todas las edades (46.2 % de 20-29 años y 53.8 % de 31-39 años) siendo mayor en los estratos socioeconómicos más bajos donde se presenta una seroconversión más temprana debido a las malas condiciones de vivienda (escasez de servicio de agua, mala eliminación de excretas y tipo de vivienda) y en las zonas de menor altura sobre el nivel del mar, (menos de 1000 metros 51.9 %, iguales a 1000 metros 43.3 % y

por encima de 2000 metros 43.8 %) ²⁷. En Armenia, en 1.617 pacientes se observó una seroconversión de 1.3 % y una relación entre infección toxoplásmica y hábitos de las pacientes (convivencia con gatos 73.6 %, consumo de carne cruda 75%) ²⁸.

Eliminado: o

Las dos vías de transmisión principales de *Toxoplasma gondii* a los seres humanos son oral y congénita. Hasta el 25 % de las muestras de cordero y el 25 % de las muestras de cerdo han mostrado que contienen quistes tisulares, aunque también se han aislado en otros animales de sangre caliente en menor porcentaje (ganado bovino, ovejas, cabras, caballos, osos, canguros, alces ciervos y venados) ²⁹³⁰³¹³², igualmente se ha comunicado la presunta transmisión por leche de cabra no pasteurizada e informado su aislamiento en huevos ³³. Dichos animales se infectan cuando ingieren ooquistes esporulados de *Toxoplasma gondii* excretados en la materia fecal de los gatos y en el caso de los animales carnívoros también por la ingesta de músculos, cerebros y vísceras de sus presas contaminadas con quistes tisulares. Es probable que la ingestión de verduras y otros productos alimenticios contaminados con ooquistes explique la infección en humanos vegetarianos seropositivos y animales herbívoros.

Eliminado:

Los trabajadores de laboratorio presentan infección adquirida por autoinoculación accidental de microorganismos. El *Toxoplasma gondii* puede subsistir en sangre citratada a 4°C por 6 semanas, y su transmisión puede relacionarse con transfusión de sangre entera o leucocitos.

Los estados de estrés e inmuno-supresión, favorecen la entrada y la proliferación del *Toxoplasma* dentro del organismo, y permiten por consiguiente la presentación de las alteraciones somáticas. Se ha demostrado la transmisión de la toxoplasmosis por transplante de órganos de un receptor seropositivo a uno seronegativo o reactivación de la enfermedad crónica en pacientes receptores de médula ósea³⁴. Hasta el 47% de los pacientes *Toxoplasma* seropositivos infectados con VIH presentan encefalitis toxoplásmica lo que ha sido una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad³⁵³⁶. El riesgo de encefalitis toxoplásmica en pacientes que tienen anticuerpos contra VIH y *Toxoplasma gondii* aumenta de manera evidente a medida que declina el recuento de células T CD4+, y la mayor incidencia se observa cuando el recuento de CD4+ cae por debajo de 100/mm³.

2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA TOXOPLASMOSIS

La toxoplasmosis se considera de manera conveniente en 3 categorías:

1. Toxoplasmosis congénita
2. Toxoplasmosis adquirida en paciente inmunocompetente
3. Toxoplasmosis adquirida o reactivada en paciente inmunodeficiente

2.4.1 TOXOPLASMOSIS CONGENITA

Es la forma de mayor importancia clínica, dadas las graves alteraciones que produce el *Toxoplasma* sobre los recién nacidos al presentarse como enfermedad. Aproximadamente 1 de cada 500 mujeres embarazadas en los EE.UU adquiere una toxoplasmosis aguda, y en la mitad de estos casos la infección conduce a transmisión en el feto. La toxoplasmosis en la mujer gestante transcurre generalmente en forma asintomática²⁴. El riesgo de transmisión transplacentaria es independiente de la gravedad clínica de la enfermedad materna, pero se correlaciona con el momento de la gestación en el que la madre ha sufrido la exposición. Si la infección materna ocurre al inicio del embarazo, parte de la enfermedad del feto ocurrirá en la vida intrauterina y el niño puede nacer con lesiones cicatrizantes, es decir el daño del feto es mayor durante el primer trimestre donde se puede producir hidrocefalia, ceguera, o diversos grados de daño neurológico. Cuando la infección sucede al final de la gestación, el recién nacido puede presentar un cuadro de toxoplasmosis de diferentes tipos, o nacer asintomático, lo cual ocurre en el 90 % de los casos. La mayor parte de los casos de infección fetal se presentan durante el tercer trimestre, lo que da como resultado coriorretinitis, estrabismo u otro daño oftálmico, reducción en la capacidad de aprendizaje u otra expresión de déficit del sistema nervioso central (epilepsia, retardo psicomotor, como también anemia, ictericia, rash, petequias secundarias a trombocitopenia, encefalitis, neumonitis, diarrea, hipotermia y enfermedad inespecífica¹⁷ o infección latente asintomática

Eliminado: a

Eliminado: a

que puede manifestarse años después. La toxoplasmosis congénita o adquirida in útero, es una forma del padecimiento debido a infección intrauterina o en el momento del parto. En la toxoplasmosis congénita los trofozoitos circulan en la sangre materna, se ubican en los espacios intervillosos de la placenta originando un foco infeccioso que se extiende a las vellosidades coriales, y de ahí pasan al feto³⁷.

Se estima que en Colombia entre los casos registrados, 2 a 10 de cada 1000 nacidos vivos presenta toxoplasmosis congénita, la cual suele ser subclínica, cifra que representa una pequeña fracción de los casos reales de la población en general, los cuales podrían ser 14 veces más, es decir que la cifra real estaría entre 20 a 130 con toxoplasmosis congénita por cada 1000 neonatos vivos³⁸. En alrededor del 45 % de los casos hay una infección fetal, pero solo el 8 al 11 % de los niños infectados muestran síntomas clínicos durante el periodo neonatal. El resto está sometido a un riesgo considerable y puede sufrir finalmente deterioro neurológico o coriorretinitis, que a menudo no se reconoce hasta después de los 5 años o más.

La toxoplasmosis congénita debe ser diferenciada de otros miembros del síndrome TORCH, sífilis, *Listeria* y otras infecciones bacterianas, otras encefalopatías infecciosas, eritroblastosis fetal y sepsis. La infección por herpes simple, CMV, rubéola y sífilis pueden causar coriorretinitis; tanto el CMV como la rubéola se han asociado con hidrocefalia, y calcificaciones

Eliminado: i

Eliminado: a

Eliminado: rubeloa

cerebrales. El marcado aumento de la proteínorraquia es el sello distintivo de la toxoplasmosis congénita.

2.4.2 TOXOPLASMOSIS ADQUIRIDA EN PACIENTE INMUNOCOMPETENTE

2.4.2.1 Forma Linfadenopática O Ganglionar

La manifestación clínica más frecuente es la linfadenopatía localizada asintomática acompañada de fatiga y sin episodio febril o en ocasiones una febrícula. Los nódulos generalmente afectan las cadenas ganglionares supraclaviculares, suboccipitales, axilares e inguinales; a veces aparecen en áreas menos comunes como el retroperitoneo y el mesenterio. Los nódulos son discretamente palpables siendo generalmente de consistencia dura y no tienden a supurar³⁹, y pueden permanecer presentes hasta 6 meses. La linfadenopatía a veces se acompaña de fiebre, dolor de garganta, malestar general, erupción cutánea, hepatoesplenomegalia y linfomonocitosis,

La principal confusión diagnóstica se produce entre linfadenopatía por toxoplasmosis y enfermedad de Hodgkin y linfomas. Las linfadenopatías por *Toxoplasma* frecuentemente son poco consideradas como posibilidad diagnóstica. Se ha estimado que el *Toxoplasma* causa 3-7 % de las linfadenopatías clínicamente significativas⁴¹. Los títulos de las pruebas

serológicas diagnósticas de infección aguda por *Toxoplasma* suelen obtenerse después de que la histología de un ganglio sometido a biopsia ha sugerido la posibilidad de toxoplasmosis

2.4.2.2 Forma Ocular

La infección por *Toxoplasma* es una causa importante de coriorretinitis que en el humano conlleva en el 28-55% de los casos a una posterior uveítis⁴⁰ y la gran mayoría de estos casos obedece a una infección congénita. Con frecuencia los pacientes son asintomáticos hasta etapas avanzadas de su vida, con un pico de incidencia de enfermedad sintomática en la segunda y la tercera década de la vida. La lesión característica es una retinitis necrozante focal que aparece inicialmente en el fondo de ojo como una placa de algodón sobreelevada, blanco-amarillenta con bordes indefinidos, en general en el polo posterior. Las lesiones a menudo están en pequeños grupos y cada lesión del grupo pueden tener una antigüedad distinta. Con la curación las lesiones empalidecen, se atrofian y presentan un pigmento negro. La panuveítis puede acompañar a la coriorretinitis. La coriorretinitis en los casos de infección por *Toxoplasma gondii* adquirida en la edad adulta es típicamente unilateral, mientras que es característico que sea bilateral en la coriorretinitis diagnosticada en el momento del nacimiento.

La coriorretinitis aguda puede provocar síntomas de visión borrosa, escotoma, dolor, fotofobia y epifora. En el caso de compromiso macular se produce alteración o pérdida de la visión central. A medida que la

inflamación se resuelve, mejora la visión, con frecuencia no se recupera la agudeza visual completamente.

2.4.3 TOXOPLASMOSIS ADQUIRIDA O REACTIVADA EN PACIENTE INMUNODEFICIENTE

En los pacientes con SIDA, la toxoplasmosis puede comprometer el encéfalo, el pulmón y el ojo. Se han reportado toxoplasmosis con compromiso multiorganico que se presenta con insuficiencia respiratorio aguda y anormalidades hemodinamicas similares al shock séptico, La encefalitis toxoplasmica provoca alteraciones del sensorio, convulsiones, debilidad, alteraciones de los pares craneanos, anormalidades sensoriales, signos serevelosos, meningismo, trastornos motores y manifestaciones neuropsiquiatricas. Generalmente el comienzo es subagudo con signos neurológicos focales hasta en el 89% de los casos⁴¹⁴². Aunque la presentación clínica puede ser mas fragosa con convulsiones o hemorragias cerebrales. Periódicamente se manifiesta la hemiparecia y/o anormalidades del habla.

2.5 INMUNOLOGIA

La fortaleza a la toxoplasmosis difiere de acuerdo a factores individuales de especie, edad, madurez inmunología, como también de la virulencia de

la cepa de *Toxoplasma* con la cual entra en contacto el huésped⁴³. Pero usualmente la primera defensa ante este agente son las barreras naturales (piel, mucosas, placenta)⁴⁴.

En el momento en que se produce alguna falla en la firmeza de estas barreras inmunológicas, bien por causa de heridas, traumatismos o a causa de la acción misma de los agentes, se origina la entrada del parásito hacia el interior del huésped. El *Toxoplasma gondii* está capacitado para evadir estas barreras a nivel enterico por medio de las enzimas liticas de localización conoidal^{45 46}.

El *Toxoplasma gondii* infecta e invade por un proceso activo todo tipo de células. Los taquizoítos son destruidos por intermediarios de oxigenos reactivos, acidificación, fluctuaciones osmóticas, intermediarios de nitrógenos reactivos, depleción del triptofano intracelular y anticuerpos específicos combinados con complemento. El taquizoito sobrevive gracias a la secreción de proteínas de las rotrias las cuales provocan una vacuolización de la membrana en torno del sitio de invasión formando una vacuola parasitofora que le proporciona un ambiente protector contra la ingestión y le favorece su replicaron. En esta vacuola se inhibe el proceso acidificador, La invasión activa de los macrofagos por los taquizoítos no desencadena los mecanismos de destrucción oxidativa. Estos parásitos unidos a los anticuerpos invaden la célula pasivamente a través de un proceso mediado por receptores fc, seguido de la formación de in fagosoma con función lisosomica y acidificación.

Estudios han permitido determinar que existe una variación considerable en la susceptibilidad a la infección por *Toxoplasma gondii* entre diferentes animales de laboratorio. Los ratones, los hamsters y los conejos son susceptibles a la infección, pero las ratas adultas son muy resistentes. Los linfocitos CD8+ son importantes en modelos murinos inmunocompetentes, su actividad implica citotoxicidad directa contra las células infectadas por *Toxoplasma gondii* y se requiere la secreción de citoquinas principalmente IFN- γ ⁴⁶. Las células T-CD4+ se requieren para el desarrollo de respuesta inmune mediadas por células en la toxoplasmosis murina aguda. Las células LAK humanas lisan células infectadas por el parásito y las células asesinas naturales humanas (NK) destruyen directamente al parásito.

La producción de citoquinas es fundamental en la defensa del huésped contra *Toxoplasma gondii*, donde el IFN- γ es el principal regulador de la respuesta inmune. El IFN- γ aumenta la supervivencia durante la infección in vivo de ratones y reduce la agudeza de la encefalitis toxoplásmica. Los linfocitos obtenidos de pacientes con SIDA muestran alteraciones y descenso en la producción de IFN- γ e IL-2 en respuesta a la estimulación con antígeno de *Toxoplasma*. No obstante el tratamiento de IFN- γ se ha demostrado útil para aumentar su actividad contra *Toxoplasma gondii* en estos pacientes

Eliminado: produccion

La interleuquina 6 (IL-6) e La interleuquina 10 (IL-10) pueden modificar la respuesta inmune del huésped, aumentando la replicación de los taquizoítos y anulando la capacidad del IFN- γ de activar a los macrófagos para que ejerzan su efecto lítico sobre el parásito. Se requiere también el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) para desencadenar la activación de los macrófagos⁴⁷ mediada por IFN- γ para que cumplan su actividad contra el *Toxoplasma*. Asimismo es necesario para la producción de óxido nítrico (NO) altamente antiparasitocida al interferir en el metabolismo intracelular del hierro. La interleuquina 2 (IL-2), aumenta la supervivencia de ratones deficientes en células T durante la infección por *Toxoplasma* posiblemente al incrementarse la producción de IFN- γ por las células NK.

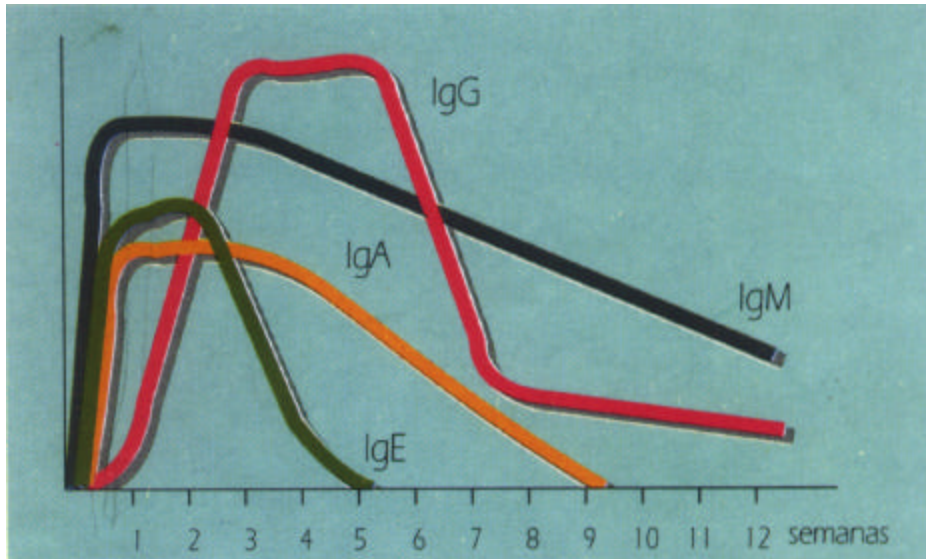
En pacientes con SIDA, la encefalitis toxoplásmica, por lo general se debe a la reactivación de una infección latente. La continua ruptura de quistes encefálicos sumada a la deficiencia en la respuesta inmune pueden provocar reactivación local y diseminación hematogena. La coinfección por otros patógenos oportunistas pueden predisponer a reactivación; el Citomegalovirus en un modelo murino induce la reactivación de *Toxoplasma gondii* en el pulmón. El huésped inmunocomprometido (linfoma o leucemia) y receptor de trasplante de órganos o médula ósea, la encefalitis toxoplásmica o la toxoplasmosis diseminada es causada por la reactivación de una infección latente.

Eliminado: encefálicos

2.6 CINÉTICA DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A LA TOXOPLASMOSIS

Se han diferenciado distintos antígenos parasitarios del *Toxoplasma gondii*: 20 antígenos de membrana, 6 citoplasmáticos, 4 mixtos y 2 metabólicos. En el curso de las infecciones las primeras inmunoglobulinas en aparecer oncogenicamente son las específicas contra la membrana, las IgM, IgE e IgA. Luego aparecen las inmunoglobulinas provocadas por los componentes citoplasmáticos del *Toxoplasma*, las IgG. El diagnóstico serológico de la infección aguda se basa en la detección de dichas inmunoglobulinas. La IgM tiene una vida media entre 5 días y 4 semanas, una IgM positiva indica que la infección ocurrió dentro de las dos semanas anteriores, sin embargo se confirma ante la evidencia de su posterior negativización, el problema surge con el hecho de que este anticuerpo puede persistir positivo por meses⁴⁸ e incluso por 3 años en el 5 % de los pacientes al parecer por un estímulo antigénico crónico, y en algunos casos se ha reportado positiva hasta 12 años después de la infección primaria⁴⁹. Esto hace que el diagnóstico de infección activa en mujeres embarazadas se torne difícil e inexacto. (GRAFICA 3). Adicionalmente la producción de falsos positivos en sueros son frecuentes ante la existencia del factor reumatoideo (proceso autoinmune donde se excede la producción de IgG y ataca a la IgM). La aparición de la IgA en respuesta a la infección usualmente es entre la primera y segunda semana del comienzo de la infección, su pico máximo y vida media son parecidos a la IgM. Otra inmunoglobulina de aparición es igual al de la IgA pero tal parece que su

vida media es mas corta, hallándose positiva hasta las cuatro semanas siguientes a la infección



GRAFICA 3: evolución de los títulos de anticuerpos anti-Toxoplasma

Eliminado: ¶

¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶

Los niveles de anticuerpos contra el componente citoplasmático, es decir de IgG específica, se elevan rápidamente una a dos semanas después de la iniciación de la infección mostrando títulos altos, casi siempre por encima de 1:1024, luego se estabilizan y alcanzan su pico máximo entre los 2 a 3 meses postinfección donde comienzan su declive que puede durar meses, años o desaparecer rápidamente⁵⁰, se debe tener en cuenta que un título elevado de IgG antitoxoplasmática no siempre indica el desarrollo de la enfermedad ya que el contacto con el parásito en nuestro medio es

habitual y puede encontrarse títulos altos indicativos de memoria inmunológica, dependiendo de la calidad de respuesta inmune del paciente a la infección.

2.7 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de la Toxoplasmosis puede establecerse mediante métodos directos e indirectos. Entre los primeros se encuentra el aislamiento del parásito de materiales como sangre o líquidos corporales por inoculación en ratón⁵¹ o en cultivo de tejidos, o por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas pruebas son indicativas más precisas en el caso de que la respuesta inmune del individuo sea anormal o deficiente, como en el caso de los pacientes inmunosuprimidos (SIDA o por terapia inmunosupresora). Igualmente se encuentra la demostración de quistes en la placenta o tejidos de fetos o recién nacidos. Los métodos indirectos involucran la medición de la inmunidad humoral por la producción de anticuerpos tipo IgM, IgE, IgA e IgG en cada individuo⁵². Las pruebas serológicas son importantes para definir la infección, en donde el estudio combinado de los diferentes isotipos de anticuerpos nos permiten establecer el momento aproximado del contagio en la mujer gestante⁵³. La seroconversión durante el embarazo nos alerta acerca de una infección adquirida en este tiempo; sin embargo, los títulos de anticuerpos varían según la técnica empleada.

Los procedimientos usados más regularmente en el diagnóstico de la toxoplasmosis en humanos son:

2.7.1 PRUEBAS INDIRECTAS O SEROLOGICAS

2.7.1.1 Prueba De Sabin Y Feldman (1948)

Denominada también prueba de colorante, Dye-test o test de lisis ; Consiste en una reacción citoplasmica en la que los anticuerpos de un suero en estudio, en presencia de un factor accesorio ejercen un efecto citotoxico sobre los parásitos, el efecto se demuestra con la adición de un colorante vital como lo es el azul de metileno alcalino. Los parásitos no modificados no se muestran teñidos o coloreados, mientras que los modificados adoptan una forma redondeada y se tiñen intensamente. Este procedimiento es muy sensible y puede detectar anticuerpos específicos. La prueba resulta positiva desde las fases iniciales de la infección y permanecen positivas durante toda la vida, lo cual favorece la detección de fases agudas⁵⁴. Pese a ser la prueba patrón tiene algunas complicaciones como la utilización de *Toxoplasma* vivo y la exigencia de un factor complementario (properdin + Mg) de difícil adquisición.

Eliminado: ¶
¶

2.7.1.2 Inmunofluorescencia Indirecta

Esta técnica es muy competente y tiene una alta sensibilidad además de ser muy rápida, para detectar e identificar anticuerpos tipo IgG. Este

método permite visualizar la fase primaria de la reacción antígeno-anticuerpo. La inmunofluorescencia indirecta tiene dos pasos: en el primero es necesario incubar el antígeno en substrato con anticuerpo contra el mismo y en el segundo se utiliza un anticuerpo secundario anti-IgG marcado con fluoresceína el cual reaccionara con los anticuerpos (presentes en el suero) que se adhieren al parásito. Se realizan diluciones seriadas del suero a partir de 1:2. Se consideran sugestivos de una infección reciente títulos positivos iguales o mayores de 1:1024⁵⁵⁵⁶.

2.7.1.3 Aglutinación Diferencial (Ac/Hs)

La técnica de AC/HS compara los títulos obtenidos con taquizoítos fijados en formalina (antígeno HS) con aquellos fijados en acetona o metanol (antígeno AC). La preparación AC contiene antígenos estadio-específicos del ciclo vital del parásito que son reconocidos por anticuerpos IgG en la fase precoz de la infección⁵², esta prueba ha demostrado ser muy útil en la diferenciación de las infecciones agudas y crónicas⁵⁷. Este método es utilizado sólo para adultos cuyos sueros contienen tanto IgG como IgM y en quienes es necesario definir si existe una infección reciente.

2.7.1.4 ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

Esta prueba la introdujeron Engvall y Perlmann en 1952. Su inmunoensayo revela anticuerpos mediante reacciones enzimáticas. Consta de un

conjugado anti-inmunoglobulinico marcado con una enzima, el cual se deja en contacto con un antígeno adherido a una placa de poli-propileno y este a su vez unido con el suero problema; posteriormente de producida la reacción se agrega un substrato enzimático que producirá una reacción de hidrólisis enzimática que aumenta o disminuye según la proporción de anticuerpos en el suero⁵⁸⁵⁹. Los títulos en las pruebas Elisa se expresan en diferentes términos de conformidad con diversos estuches comerciales, por su fácil acceso es la más usada hoy en día y da títulos similares a los obtenidos con Sabin y Feldman. Esta técnica permite demostrar la presencia de anticuerpos IgG, IgM e IgA.

2.7.1.5 ELISA IgG De Avidéz

En virtud de la necesidad de establecer con certeza el diagnostico de la toxoplasmosis en 1989 Hedman et al, realizan una modificación a la prueba de ELISA para medir la avidéz de la IgG antitoxoplasmica lo que permite distinguir una infección aguda o primaria de una crónica. La reacción antígeno-anticuerpo es tratada con un agente desnaturizante de proteínas (urea) siendo 6M la concentración que mejor puede diferenciar una mayor o menor afinidad de los anticuerpos tipo IgG, las lecturas se realizan regularmente por el método de enzimed Linked inmunoabsorbent assay (ELISA).

El índice de avidéz se determina como el cociente del valor de la absorbancia del suero problema después de ser tratado con urea y el título del suero problema sin tratamiento con urea multiplicado por cien.

$$IA = \frac{\text{Título de muestra lavada con urea}}{\text{Título de muestra no lavada con urea}} \times 100$$

Un índice de avidéz de IgG frente a la toxoplasmosis inferior al 45 % se ha considerado un resultado compatible con infección reciente, en el caso de toxoplasmosis crónica índices de avidéz mayores de 50 % han sido reportados.

2.7.1.6 Técnica De Inmunocaptura (Ic)

Se basa en una separación inicial del isotipo de anticuerpos del cual se quieren realizar la detección. Para ello un anticuerpo monoclonal anti-isotipo humano es fijado en una placa, el suero sometido a la prueba es añadido e incubado con la placa. Un lavado elimina todos los otros isotipos no fijados. La revelación se puede realizar tanto inmunoenzimáticamente (ELISA doble sandwich o reversa) o utilizando el principio de aglutinación añadiendo el parásito formolizado entero. Con este principio se pueden cuantificar anticuerpos de isotipos IgM, IgA e IgE. La suspensión de antígeno, se añade dentro de tres pozos, utilizando cantidades crecientes de este en cada uno de ellos. Cuando hay presencia

de anticuerpos anti-*Toxoplasma* los parásitos son adheridos a la pared del pozo y forman un velo; cuando no hay anticuerpos los parásitos se depositan formando un botón en el fondo del pozo. La lectura se expresa en cruces que van de 0 a 4 en cada pozo según el grado de aglutinación. Así, el puntaje máximo que se puede obtener es 12. Se considera positivo para IGM un puntaje > de 9, para IgA un puntaje > de 5 para IgE un puntaje > de 1. En recién nacidos se consideran positivos puntajes > de 3 para IgM o IgA y mayor de 1 para IgE ⁵².

Eliminado: anticuepos

Eliminado: boton

2.7.2 PRUEBAS DIRECTAS (DETECCION DEL PARASITO)

2.7.2.1 Inoculación En Ratón

El aislamiento de *Toxoplasma* de la sangre o líquidos corporales establece que la infección es aguda. En el recién nacido, el aislamiento del *Toxoplasma* en la placenta siempre es diagnóstico de infección congénita. El microorganismo puede ser aislado por inoculación de especímenes (líquidos corporales, capa leucocitaria de sangre centrifugada, heparinizada o tejido procesado) en la cavidad peritoneal de ratones. Las muestras tisulares deben ser trituradas en solución fisiológica y posteriormente filtrados para eliminar los fragmentos tisulares grandes. El líquido peritoneal de los ratones se debe examinar después de 6-10 días de la inoculación o antes si mueren. Se deben investigar anticuerpos anti-*Toxoplasma* en los ratones. Si hay anticuerpos, el diagnóstico definitivo exige la demostración del microorganismo, por lo general en

quistes cerebrales, de hígado o bazo de los ratones seropositivos. Si no se observan los quistes, se hace necesaria la subinoculación de una suspensión de tejido cerebral, hepático y esplénico en nuevos ratones. El *Toxoplasma* también puede ser aislado de coágulos sanguíneos almacenados durante la noche. Del mismo modo se puede recurrir al cultivo de células tisulares para aislar el parásito, se forman placas que facilitan el reconocimiento de este, es un método muy difundido y arroja resultados en poco tiempo (3-6 días), sin embargo su principal problema es el presentar una menor sensibilidad que la inoculación en ratón. .

Eliminado: coagulos

2.7.2.2 Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR)

Por técnica de PCR se puede detectar ADN toxoplásmico a partir de muestras de humor acuoso, tejidos, sangre, líquido amniótico e incluso orina⁶⁰ de pacientes con sospecha de enfermedad activa. La PCR es una técnica que fue descrita por primera vez por Mullis y Cols en 1986⁶¹. La técnica es una de las más versátiles de la biología molecular y hace posible la detección de virus y microorganismos en fluidos orgánicos. Se ha adaptado para la detección de *Toxoplasma gondii* la cual busca amplificar rápida y fácilmente un gen o fragmento de este o de cualquier segmento de DNA⁶². Para poder ponerla en práctica se requiere que se conozca la secuencia a ambos lados de la región de DNA de interés y permite que la región entre ellas defina el sitio de amplificación. El DNA extraído se desnatura por calentamiento, se alinean a las bandas sencillas dos cortas secuencias denominadas "primers" o iniciadores, los cuales son

complementarios a las bandas opuestas en ambos lados de la región blanco. La DNA polimerasa sintetiza una banda sencilla desde el extremo 3' de cada "primer". El número de copias de la secuencia crece exponencialmente⁶³.

2.8 PROFILAXIS

Las medidas de prevención se aplican a todas las personas, sin embargo merecen una atención especial las embarazadas seronegativas y los pacientes inmunodeficientes. El objetivo es evitar la ingestión y el contacto con quistes y ooquistes. Para ello se precisa una divulgación de un programa educativo preferiblemente por parte del médico tratante de las precauciones que se deben tener en cuenta de higiene y dieta.

Los ooquistes fecales del gato y los quistes tisulares en la carne insuficientemente cocida constituyen la principal fuente de infección, por consiguiente para prevenir la infección materno fetal y de pacientes inmunodeprimidos, se debe evitar el consumo de carne mal cocida, los quistes de la carne pierden su infecciosidad al ser calentados a 66°C o congelados a -20°C. Deben lavarse las manos después de manipular heces de gato, carne o verduras crudas, procurando siempre la utilización de guantes. Se debe evitar al máximo comer huevos crudos y la leche no pasteurizada. Se deben controlar las moscas y cucarachas como posibles vectores del transporte de los ooquistes fecales del gato. Otra medida

de prevención consiste en no alimentar los gatos con carne que no se hayan sometido antes a la congelación o a la cocción. Los gatos pueden ser suprimidos si conviven con una mujer gestante seronegativa o con un inmunosuprimido o impedir también que los gatos salgan de la casa para cazar roedores o pájaros. De manera experimental se ha demostrado que la incorporación de monensina (un ionoforo carboxilínico de *Streptomyces cinnamonensis*) a un alimento seco del gato puede detener la eliminación de oocistos por las heces.

Paralelamente con los esquemas educativos, se deben realizar programas serológicos que nos permita controlar la presencia de anticuerpos específicos contra la toxoplasmosis en pacientes de alto riesgo. Las mujeres gestantes seronegativas deberían ser sometidas a continuos chequeos durante todo el embarazo para determinar el momento exacto de una posible infección por toxoplasmosis. Esto daría suficiente tiempo para decidir entre un tratamiento materno o un aborto terapéutico. Las mujeres con resultados positivos en la prueba inicial deben ser sometidas a pruebas confirmatorias (detección de anticuerpos IgA, IgE y AC/AH) y descartar o corroborar de esta manera una infección reciente adquirida después de la concepción. En los pacientes inmunosuprimidos la detección serológica de anticuerpos anti-*Toxoplasma* de donantes de órganos está bien justificada, de esta manera son excluidos los donantes seropositivos para posibles receptores inmunodeficientes.

3 FORMULACION DEL PROBLEMA

El propósito de este estudio es evaluar y desarrollar una técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección y diferenciación entre anticuerpos del tipo IgG anti-*Toxoplasma* de alta afinidad y anticuerpos anti-*Toxoplasma* de baja afinidad funcional para su correspondiente epitope.

3.1 JUSTIFICACION

La diversidad de las pruebas de rutina que evalúan la presencia o ausencia de uno o varios anticuerpos en el suero y su desventaja a la hora de interpretar sus resultados en el diagnóstico de la toxoplasmosis, hacen necesario el desarrollo de una técnica sencilla, económica y rápida que pueda darnos datos más precisos para diferenciar una infección reciente de una crónica y establezca un tiempo más acertado de infección.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI-IgG) basada en el principio de avidéz para el diagnóstico de Toxoplasmosis reciente.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI-IgG) de avidéz para anticuerpos IgG anti-Toxoplasma para la concentración de urea que mejor discrimine entre sueros de ratón y humanos de alta avidéz y baja avidéz.

Determinar las condiciones óptimas de procedimiento que permitan evaluar la avidéz por técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.

Evaluar el valor diagnóstico de la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de Avidéz (IFI -A) para la detección de Toxoplasmosis reciente o clínica en pacientes gestantes.

Eliminado: mejores

Eliminado: ¶

¶
¶
Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI -IgG) de avidéz para anticuerpos IgG anti-Toxoplasma para la concentración de urea que mejor discrimine entre sueros de ratón y humanos de alta avidéz y baja avidéz.

Eliminado: ¶

Con formato: Numeración y viñetas

| 5 HIPOTESIS

H_0 : Es posible medir la avidéz de los anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

H_A : No es posible medir la avidéz de los anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 OBTENCIÓN DEL ANTIGENO PARA PRUEBA DE IFI -IgG ANTI-TOXOPLASMI CA

Se utilizaron ratones (hembras) blancos ICR procedentes del Bioterio de la Universidad Nacional de Colombia, entre 4 y 5 semanas de edad con un peso aproximado de 20 gramos, los cuales fueron inoculados por vía intraperitoneal con el antígeno *Toxoplasma gondii* cepa RH. Pasados 48 a 72 horas se obtuvo el exudado peritoneal, el cual fue filtrado utilizando un poro de 3 μm . El resultado de esta filtración fue lavado con una solución de Penicilina 1000 $\mu\text{g/ml}$ y Estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$. Los siguientes 3 lavados se realizaron con PBS [\(ver anexo N° 3\)](#). El sedimento final se resuspendió en una solución de PBS que contenía formol 2% [\(ver anexo N°2\)](#), se dejaron a temperatura ambiente por una hora al cabo de la cual se recuperaron los taquizoítos por centrifugación (1500 r.p.m. durante 10 minutos), Por último se almacenó el botón de sedimentación a una temperatura de -4°C .

Eliminado:

Eliminado:

Se resuspendió el antígeno almacenado en PBS y formol al 2% para realizar un conteo de los parásitos presentes en cámara de Neubauer a un promedio de 1×10^6 parásitos/ μl . Luego se procedió a sembrar en placas para IFI. Las placas se guardaron en nevera a una temperatura

entre -8°C y -20°C hasta su uso (protocolo: Departamento de Parasitología, Universidad Nacional de Colombia).

Eliminado: .

6.2 VALIDACION DEL PRINCIPIO DE AVIDEZ

Debido a la dificultad de obtener sueros humanos de seroconversión en gran número, se hizo necesario plantear un modelo animal para la validación del principio de avidéz para IFI, permitiendo determinar si la técnica IFI logra discriminar entre sueros con IgG de alta y baja avidéz.

Para ello se inocularon ratones blancos con una dosis no letal de taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* y se realizó una sangría periódica postinoculación para hacer un seguimiento de la evolución del índice de avidéz en el modelo murino

6.2.1 Inmunización De Ratón

Se infectaron 50 ratones (hembras) exocriados, por vía intraperitoneal cada uno con una suspensión de Solución Salina mas antibiótico (Penicilina/Gentamicina), con la cepa RH de *Toxoplasma gondii* en las siguientes concentraciones:

- 10 ratones con una suspensión total de 40.000 taquizoítos formolizados combinado con adyuvante de Freund completo.
- 10 ratones con una suspensión total de 40.000 taquizoítos formolizados.
- 10 ratones con una suspensión total de 4.000 taquizoítos formolizados

- 10 ratones con una suspensión total de 400 taquizoítos formolizados
- 10 ratones con una suspensión total de 40 taquizoítos formolizados

A partir de estas inoculaciones se colectaron quincenalmente suero durante cinco meses. La sangría se realizó a partir de la cola. los sueros de cada agrupación se colectaron en alicuotas como pool. Se almacenaron en congelador a -20°C hasta el momento de su uso.

6.2.2 Validación Del Principio De Aidez Por IFI En Modelo Murino De Infección

Se realizaron diluciones seriadas de los sueros recogidos (Pool) en el paso 10.3. (inmunización de ratón) para IFI , en las siguientes concentraciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024. Las placas preparadas con antígeno fueron cubiertas con cada una de las diluciones realizadas, marcadas previamente por duplicado. Se dejaron las placas incubando en cámara húmeda a 37°C por treinta minutos. Luego se lavaron todas las placas con PBS (pH 7,2). De las placas montadas por duplicado se lavaron las primeras con urea (2M, 4M, 6M y 8M ver anexos N°7-10) por 15' y las placas restantes con PBS 15'. Al cabo de este tiempo todas las placas se lavaron con agua destilada. Se cubrió con conjugado 1/128 (antigammaglobulina de ratón marcado con isotiocianato previamente titulado, ver anexo N°1.1) y se dejó en cámara húmeda 37°C por 30'. Se lavaron todas las placas dos veces con PBS y se enjuagaron con agua

Eliminado: titulado

destilada. Por último se adicionó glicerol -fosfato ([ver anexos N° 4-6](#)) y se leyó en microscopio de fluorescencia.

Para Calcular el índice de avidéz (IA) de cada uno de los sueros se utilizó la fluorescencia de las placas lavadas con el agente desnaturizante y las lavadas con PBS de la siguiente manera:

$$IA = \frac{\text{Titulo de muestra lavada con urea}}{\text{Titulo de muestra no lavada con urea}} \times 100$$

6.2.3 Estandarización De La Urea Como Agente Desnaturizante Por El Método De IFI En Sueros Humanos Con Fecha Conocida De Infección

Se evaluaron 10 sueros de pacientes discriminados de la siguiente manera: 1 con Toxoplasmosis ganglionar, 8 madres que tuvieron hijos con toxoplasmosis congénita y 1 paciente con seroconversion para toxoplasmosis luego de una infección accidental en el laboratorio. La fecha de infección se determinó de acuerdo a los datos de inicio de la sintomatología (aparición de adenopatias o fiebre).

Las placas preparadas con antígeno fueron cubiertas con cada una de las diluciones del suero realizadas, marcadas previamente por duplicado. Se dejaron las placas incubando en cámara húmeda a 37°C por treinta minutos. Luego se lavaron todas las placas con PBS (pH 7,2). De las placas montadas por duplicado se lavaron las primeras con urea (2M, 4M, 6M y

8M) por 15' y las placas restantes con PBS 15'. Al cabo de este tiempo todas las placas se lavaron con agua destilada. Se cubrió con conjugado 1/256 (Antigammaglobulina humana marcado con Isotiocianato previamente titulado, **ver Anexo N° 1.2**) y se dejó en cámara húmeda 37°C por 30'. Se Lavaron todas las placas dos veces con PBS y se enjuagaron con agua destilada. Por ultimo se adiciono glicerol-fosfato y se leyó en microscopio de fluorescencia.

Eliminado:

El índice de avidéz de anticuerpos IgG frente a la toxoplasmosis se definió como el cociente del valor del titulo del suero problema después de ser tratado con urea y el titulo del suero sin tratamiento con urea multiplicado por cien.

$$IA = \frac{\text{Título de muestra lavada con urea}}{\text{Título de muestra no lavada con urea}} \times 100$$

6.3 EVALUACION DE LA TECNICA DE IFI DE AVIDEZ EN 29 SUEROS DE GESTANTES

Eliminado: 36

Se evaluaron un grupo de 29 muestra de sueros procedentes del Banco de sueros del Instituto Materno Infantil, Santa Fe de Bogotá, con determinación previa por la técnica de ISAGA de la IgA, considerado positivo un puntaje \geq de 5 y de la IgM considerado positivo un puntaje \geq a 9. Todos los sueros se procesaron por la técnica de inmunofluorescencia

Eliminado: 36

Eliminado: s: 29

Eliminado: , y 7 sueros donados por la doctora María Teresa Montoya de Londoño del Laboratorio Solidaridad, Armenia-Quindío. la IgA e IgM por las técnicas de Platelia Toxo y Quimioluminiscencia fue evaluada previamente.

indirecta (IFI) para detección de IgG anti-Toxoplasma basada en el principio de avidéz de los cuales se distinguieron dos grupos:

Eliminado: antitoxoplasma

A) 9 sueros de pacientes con infección reciente (menor de un año) los cuales presentaban títulos de IgG positivos e IgM e IgA positivos frente a la Toxoplasmosis.

Eliminado: 16

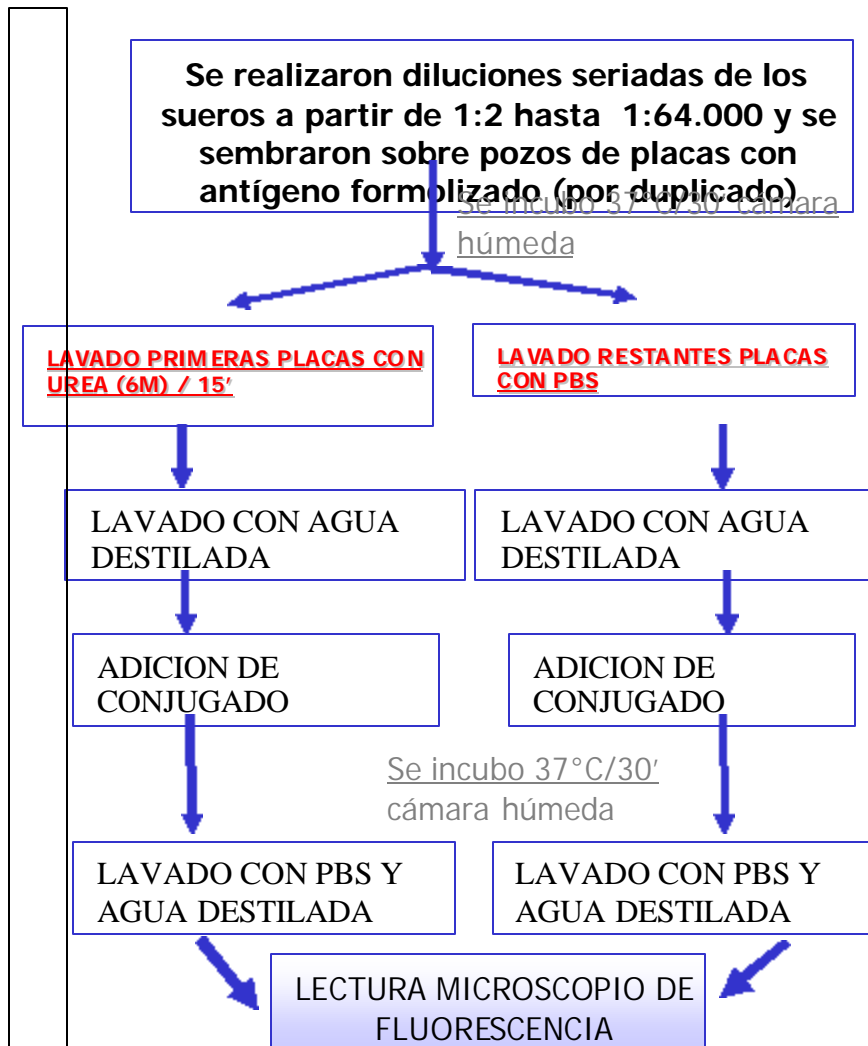
B) 20 sueros de pacientes con infección crónica los cuales presentaban títulos de anticuerpos IgG positivos e IgM e IgA negativos frente a la Toxoplasmosis.

Se realizaron diluciones seriadas de los sueros. Las placas preparadas con antígeno fueron cubiertas con cada una de las diluciones realizadas, marcadas previamente por duplicado. Se dejaron las placas incubando en cámara húmeda a 37°C por treinta minutos. Luego se lavaron todas las placas con PBS (pH 7,2). De las placas montadas por duplicado se lavaron las primeras con urea 6M por 15' y las placas restantes con PBS 15'. Al cabo de este tiempo todas las placas se lavaron con agua destilada. Se cubrió con conjugado 1/256 (Antigammaglobulina humana marcado con I sotiocianato previamente titulado) y se dejó en cámara húmeda 37°C por 30'. Se lavaron todas las placas dos veces con PBS y se enjuagaron con agua destilada. Por último se adicionó glicerol-fosfato y se leyó en microscopio de fluorescencia.

El índice de avidéz de anticuerpos IgG frente a la toxoplasmosis se definió como el cociente del valor del título del suero problema después de ser tratado con urea y el título del suero sin tratamiento con urea multiplicado por cien.

$$IA = \frac{\text{Título de muestra lavada con urea}}{\text{Título de muestra no lavada con urea}} \times 100$$

|



GRAFICA 4: DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCEDIMIENTO DE LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE AVIDEZ

7 RESULTADOS

La lectura de las láminas se realizó en microscopio de fluorescencia y se determinó el título en la última dilución tanto del suero de los ratones como de humanos en el cual se apreciaba fluorescencia en toda la periferia de los *Toxoplasma* (GRAFICA 5), y se consideró no reactiva cuando el parásito se observó completamente rojo (GRAFICA 6) o sí se veía la fluorescencia localizada en uno de los extremos de los parásitos fluorescencia polar (GRAFICA 7).

Eliminado: GRAFICA

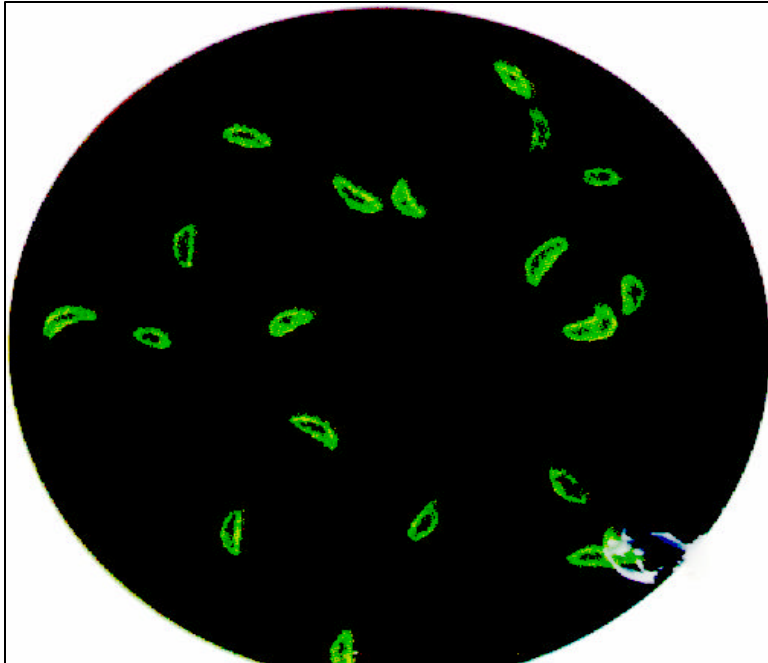
Eliminado: 4

Eliminado: 5

Eliminado: 6

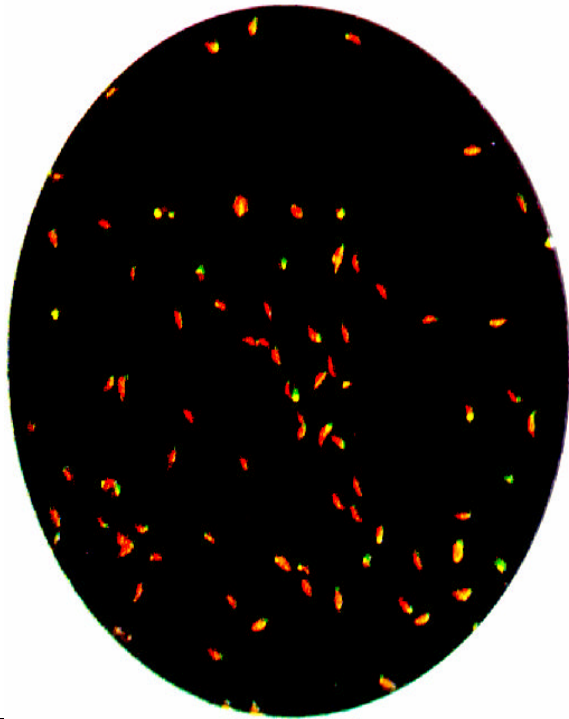
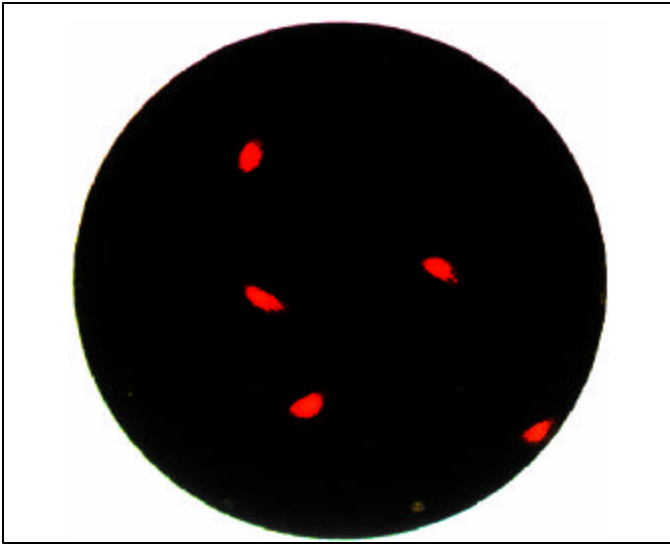
GRAFICA 5: *Toxoplasma* con fluorescencia periférica

Con formato



GRAFICA 6: *Toxoplasma* con fluorescencia negativa

Con formato



GRAFICA 7:
toxoplasma con
fluorescencia
polar

Con formato

Con formato

7.1 Validación DEL PRINCIPIO DE AVIDEZ

Eliminado: --Salto de página--
VALIDACION

7.1.1 Validación Del Principio De Avidéz Por IFI En Modelo Murino De Infección

Para la infección de una buena cantidad de antígeno soluble, se emplearon ratones hembras ICR, dando buenas concentraciones de taquizoítos en su cavidad peritoneal en un tiempo corto: dos a tres días postinoculación. Las dosis de taquizoítos formalizados, aplicadas a los diferentes grupos de ratones, pretendían crear una inmunización frente al *T. gondii* y una producción de títulos de IgG anti-*Toxoplasma*. Sin embargo a bajas o altas concentraciones del inoculo creó una respuesta significativa frente a él. Solo aquel grupo con alta concentración de taquizoítos formalizados, acompañado de coadyuvante completo de Freund, demostró una evolución directamente proporcional entre el tiempo de inmunización frente a la avidéz y los títulos de IgG anti-Toxoplasma (TABLA N°1). De la misma forma, aquellas muestras recolectadas en papel de filtro y pool del grupo preseleccionado mostró dicho comportamiento (GRAFICA 8,9,10).

Eliminado: pretendian

Eliminado: i

Eliminado: titulos

Eliminado: antitoxoplasma

Se ha reportado que la concentración del agente elusor empleado en técnicas de ELISA, que logra diferenciar un estado crónica de uno agudo puede ser 6M y 8M⁶⁵. La estandarización del agente elusor en el modelo murino infirió que la 6 M, es la concentración óptima para discriminar una inmunización reciente de una pasada. El coeficiente de correlación entre

Eliminado: (65,10).

Eliminado: seis

tiempo de infección e índice de avidéz fue muy bueno (0,85) como lo muestra la gráfica 11.

Eliminado: ¶
¶

**TITULOS DE IgG ANTI-TOXOPLASMA POR LA TECNICA DE IFI-A
DE LOS DIFERENTES POOLES RECOLECTADOS ENTRE LOS DIAS
0 Y 45**

Eliminado: LOS

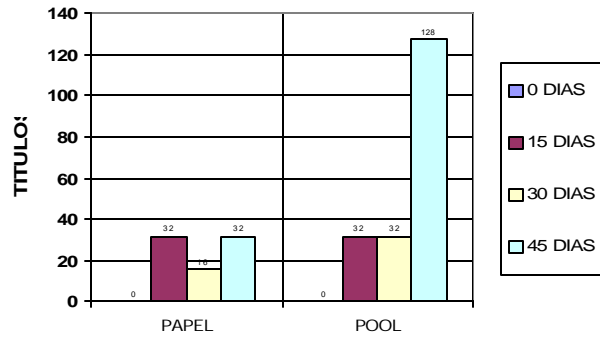
Eliminado: ¶

Tabla N°1

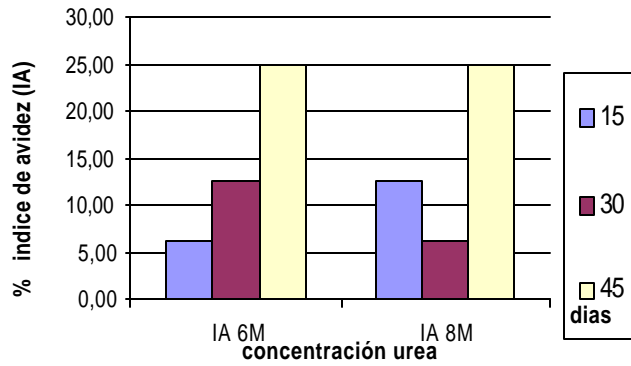
| DIAS | 40 | 400 | 4_000 | 40_000 | 40_000** |
|------|----|-----|-------|--------|----------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 4 | 8 | 4 | 32 | 32 |
| 30 | 0 | 4 | 64 | 32 | 32 |
| 45 | 4 | 4 | 4 | 32 | 128 |

** Grupo inoculado con 40.000 taquizoitos formalizados más coadyuvante completo de Freund

GRAFICA 8: COMPARACION TITULOS SUEROS DE RATON POOL Vs PAPEL DE FILTRO

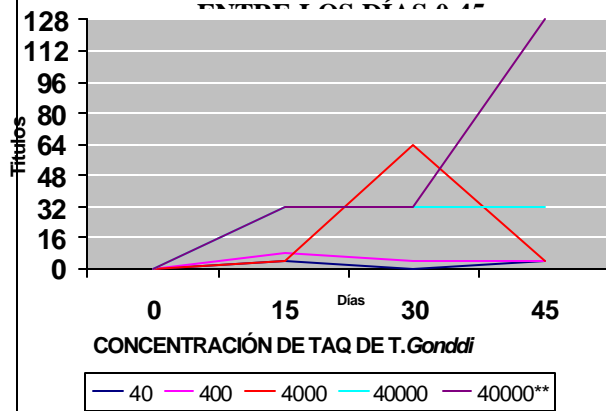


GRAFICA 9: ESTANDARIZACION DE LA UREA EN RATONES INMUNIZADOS CON COADYUVANTE

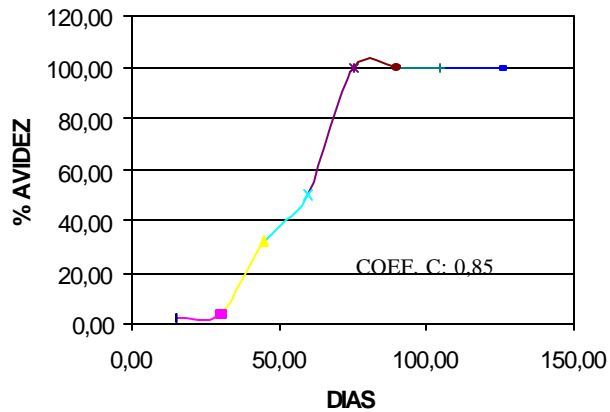


Eliminado: —Salto de página—
 —Salto de página—

**GRAFICA 10: TITULOS DE IgG ANTITOXOPLASMA
 POR
 IFI-A DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE RATONES**



**GRAFICA 11: INDICE DE AVIDEZ OBTENIDOS POR IFI-A
 UTILIZANDO UREA 6M EN RATONES INMUNIZADOS
 CON COADYUVANTE**



7.2 ESTANDARIZACION DE LA UREA COMO AGENTE DESNATURALIZANTE POR EL METODO DE IFI EN SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION

En un grupo constituido por 10 de pacientes con fecha conocida de infección la cual variaba entre 2 y 43 meses se determinaron los títulos de anticuerpos tipo IgG anti-*Toxoplasma* mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de Aidez con lavados en PBS y la resistencia a la elusión del anticuerpo a lavados con diferentes concentraciones de urea 2M,4M,6M, y 8M (TABLA N°2) Se observa la reacción de la urea en índice de avidéz comparándola con cada una de las curvas producidas por las diferentes concentraciones de acuerdo al tiempo de infección, con la fase aguda considerada hasta los 4 meses y la fase crónica de 5 meses en adelante (GRAFICA 12,13,14,15). Se determinó que la concentración de urea 6M por esta técnica es la que expone una mejor correlación entre el aumento en el Indice de Aidez (IA) y el tiempo de haber adquirido la infección, así observamos que en los sueros de pacientes en momentos tempranos de infección o sea en los primeros cuatro meses (pacientes 1-4), los índices de avidéz son menores de 25% y los sueros con infección mayores de 6 meses (pacientes 5-10) presentaron un índice de avidéz mayor al 50%, reflejando la maduración de la avidéz de los anticuerpos.

Con formato

Eliminado: D

Eliminado: 6

Eliminado: .

Eliminado: 1

Eliminado: í

Eliminado: donde

Eliminado: ,

Eliminado: (GRAF. 12).

Eliminado: ¶]

_____ Salto de página _____
 _____ Salto de página _____

TABLA 2 Resultados de estandarización de la urea en sueros humanos con fecha conocida de infección.

Comparación de los títulos de IgG específica obtenidos por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de los sueros lavados con PBS y los sueros tratados con diferentes concentraciones de urea 2M, 4M, 6M y 8M y su respectivo Índice de Avidéz .

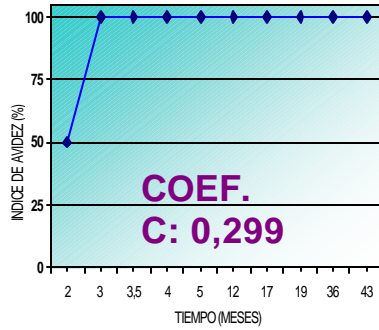
| PACIENTE | TIEMPO DE ADQUIRIDA LA INFECCION (MESES) ^a | TITULO | TITULO | AVIDEZ | TITULO | AVIDEZ | TITULO | AVIDEZ | TITULO | AVIDEZ |
|-----------------------------|---|------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| | | EN EN PBS ^b | EN UREA 2M ^c | IgG (%) CON UREA 2M | EN UREA 4M ^c | IgG (%) CON UREA 4M | EN UREA 6M ^c | IgG (%) CON UREA 6M | EN UREA 8M ^c | IgG (%) CON UREA 8M |
| 1 | 2 | 1:8.000 | 1:4.096 | 50,0 | 1:8.000 | 100,0 | 1:1.024 | 12,0 | 1:4.096 | 50,0 |
| 2 | 3 | 1:4.096 | 1:4.096 | 100,0 | 1:4.096 | 100,0 | 1:1.024 | 25,0 | 1:1.024 | 25,0 |
| 3 | 3,5 | 1:16.000 | 1:16.000 | 100,0 | 1:16.000 | 100,0 | 1:4.096 | 25,6 | 1:2.048 | 12,8 |
| 4 | 4 | 1:16.000 | 1:16.000 | 100,0 | 1:8.000 | 50,0 | 1:4.096 | 25,6 | 1:2.048 | 12,8 |
| 5 | 5 | 1:32.000 | 1:32.000 | 100,0 | 1:32.000 | 100,0 | 1:16.000 | 50,0 | 1:16.000 | 50,0 |
| 6 | 12 | 1:2.048 | 1:2.048 | 100,0 | 1:1.024 | 50,0 | 1:1.024 | 50,0 | 1:512 | 25,0 |
| 7 | 17 | 1:32.000 | 1:32.000 | 100,0 | 1:32.000 | 100,0 | 1:32.000 | 100,0 | 1:32.000 | 100,0 |
| 8 | 19 | 1:32.000 | 1:32.000 | 100,0 | 1:32.000 | 100,0 | 1:32.000 | 100,0 | 1:32.000 | 100,0 |
| 9 | 36 | 1:8.000 | 1:8.000 | 100,0 | 1:8.000 | 100,0 | 1:8.000 | 100,0 | 1:8.000 | 100,0 |
| 10 | 43 | 1:8.000 | 1:8.000 | 100,0 | 1:8.000 | 100,0 | 1:8.000 | 100,0 | 1:2.048 | 25,0 |
| COEFICIENTE DE CORRELACION: | | | | 0,299 | | 0,232 | | 0,846 | | 0,397 |

a. Respecto a los datos de inicio de la sintomatología (adenopatías o fiebre)

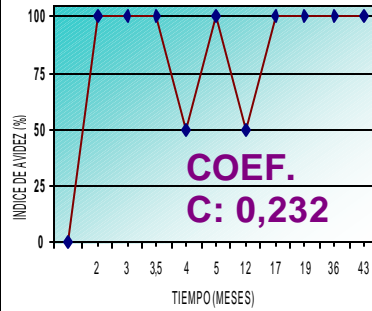
b. Resultado del título de la IgG en presencia con PBS

c. Reducción del título de la IgG después del tratamiento con urea

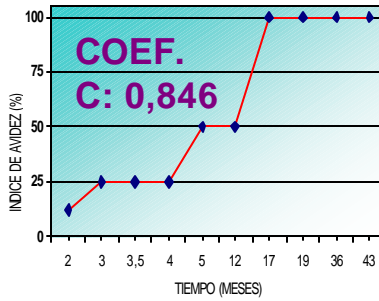
GRAFICA 12: EVOLUCION DE INDICE DE AVIDEZ DE SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 2M



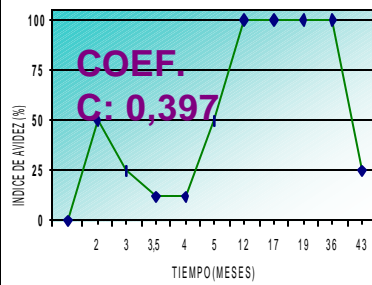
GRAFICA 13: EVOLUCION DE INDICE DE AVIDEZ DE SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 4M



GRAFICA 14: EVOLUCION DE INDICE DE AVIDEZ DE SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 6M



GRAFICA 15: EVOLUCION DE INDICE DE AVIDEZ DE SUEROS HUMANOS CON FECHA CONOCIDA DE INFECCION CON UREA 8M



7.3 EVALUACION DE LA TECNICA DE IFI DE AVIDEZ EN 29 SUEROS DE GESTANTES

A 29 sueros se les determinó la presencia y el título de anticuerpos tipo IgG por la técnica de inmunofluorescencia indirecta con lavados en PBS y el título de IgG residual después de ser tratado con urea 6M para establecer el índice de avidéz (IA).

Los 29 pacientes evaluados se clasificaron en dos grupos:

GRUPO A: Constituido por 9 pacientes con infección aguda, los cuales presentaban IgA e IgM positiva frente a la toxoplasmosis como marcadores indicativos de infección reciente. De los 9 pacientes 8 (88.8%) presentaron un índice de avidéz (IA) \leq al 50%. Se observó que en este grupo 5 casos (55,5%) presentaron un IA \leq 25 % lo que indica un tiempo de infección menor a los 4 meses, 3 casos (33,3%) presentaron un IA = 50%. En el caso restante (11.1%) encontramos que los anticuerpos tipo IgG presentaron alta avidéz (IA del 100%) presumible de infección crónica (TABLA N°3, GRAFICA 16).

Grupo B: conformado por 20 pacientes con infección crónica por *Toxoplasma* los cuales presentaba IgG positiva e IgM e IgA negativa anti-*Toxoplasma*. En 18 casos (90%) se encontró un IA \geq al 50% (11 ptes con IA del 100% y 7 ptes con IA de 50%) y los restantes 2 casos (10%) presentaron un IA del 25%. (TABLA N°4, GRAFICA 16). La técnica de

Eliminado: 3

Eliminado: 6

Eliminado: 36

Eliminado: los

Eliminado: o

Eliminado: (TABLA N°3).

Eliminado: l

Eliminado: 36

Eliminado: 16

Eliminado: 16

Eliminado: 13

Eliminado: 81,3

Eliminado:

Eliminado: (6 ptes con IA del 25% y 7 ptes con IA 50%)

Eliminado: en los restantes 3 casos (18,7%) encontramos que los anticuerpos tipo IgG presentaron alta avidéz (IA del 100%). En este grupo de pacientes (n= 16), la media del IA de los IgG fue del 50% Con una desviación estándar del 27,4(GRAF. 13). ¶¶

————Salto de página————

De los 16 pacientes un subgrupo A de 9 casos (56,2%) se evaluó por la técnica de ISAGA para determinar la IgA e IgM (pacientes 1-9,TABLA N°3). Se observó que en 5 casos (55,5%) presentaron un IA \leq 25 % lo que indica un tiempo de infección menor a los 4 meses, 3 casos (33,3%) presentaron un IA = 50%

Eliminado: Se obtuvo una desviación estándar ent

Eliminado: ¶¶
En un subgrupo B integr

Con formato

Eliminado: ¶¶

Eliminado: antitoxoplasma

Eliminado: . En este grupo (n=20), la media del IA

Inmunofluorescencia Indirecta de Aidez presenta una sensibilidad del 55% para detectar casos agudos con un valor predictivo positivo del 71%, especificidad del 90% en sueros de pacientes con infección crónica y un valor predictivo negativo del 82% (TABLA N°5).

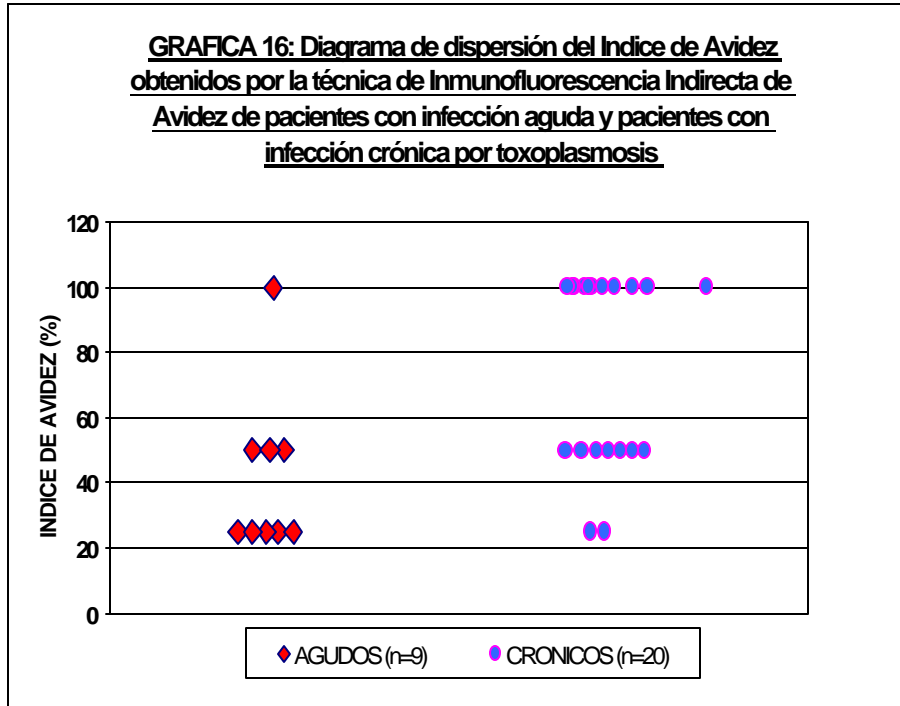


TABLA 3 Resultados de la evaluación de la Técnica del InmunoFluorescencia Indirecta de Avidez en 9 sueros de gestantes con IgM e IgA positiva anti Toxoplasma

| PACIENTE | IgM (POSITIVO > 9 FOR ISAGA) | IgA (POSITIVO > 5 FOR ISAGA) | TITULO EN FBS ^a | TITULO EN UREA 6M ^b | AVIDEZ IgG (%) |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| 1 | 120 | 7.0 | 12048 | 1512 | 25.0 |
| 2 | 120 | 7.0 | 14086 | 11.024 | 25.0 |
| 3 | 120 | 120 | 14086 | 11.024 | 25.0 |
| 4 | 120 | 120 | 11.024 | 1512 | 50.0 |
| 5 | 120 | 9.0 | 14086 | 11.024 | 25.0 |
| 6 | 11.0 | 100 | 11.024 | 1512 | 50.0 |
| 7 | 120 | 120 | 12048 | 12048 | 100.0 |
| 8 | 120 | 120 | 18000 | 12048 | 25.0 |
| 9 | 120 | 120 | 11.024 | 1512 | 50.0 |

a Resultados del túb de IgG en presencia de FBS

b Reducción del túb de la IgG después del tratamiento con urea

Eliminado: --Salto de página--
¶

TABLA 4: Resultados de la evaluación de la técnica de IFI de avidéz en 20 sueros de gestantes con IgM e IgA negativa anti-Toxoplasma

| PACIENTE | IgM (EVALUADO POR ISAGA) | IgA (EVALUADO POR ISAGA) | TITULO EN PBS ^a | TITULO EN UREA 6M ^b | AVIDEZ IgG (%) |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 1 | - | - | 1:1.024 | 1:512 | 50.0 |
| 2 | - | - | 1:4.096 | 1:4.096 | 100.0 |
| 3 | - | - | 1:2.048 | 1:2.048 | 100.0 |
| 4 | - | - | 1:2.048 | 1:2.048 | 100.0 |
| 5 | - | - | 1:1.024 | 1:1.024 | 100.0 |
| 6 | - | - | 1:1.024 | 1:512 | 50.0 |
| 7 | - | - | 1:1.024 | 1:512 | 50.0 |
| 8 | - | - | 1:512 | 1:512 | 100.0 |
| 9 | - | - | 1:2.048 | 1:2.048 | 100.0 |
| 10 | - | - | 1:4.096 | 1:4.096 | 100.0 |
| 11 | - | - | 1:1.024 | 1:512 | 50.0 |
| 12 | - | - | 1:1.024 | 1:256 | 25.0 |
| 13 | - | - | 1:1.024 | 1:1.024 | 100.0 |
| 14 | - | - | 1:1.024 | 1:512 | 50.0 |
| 15 | - | - | 1:4.096 | 1:4.096 | 100.0 |
| 16 | - | - | 1:1.024 | 1:512 | 50.0 |
| 17 | - | - | 1:2.048 | 1:512 | 25.0 |
| 18 | - | - | 1:2.048 | 1:2.048 | 100.0 |
| 19 | - | - | 1:1.024 | 1:512 | 50.0 |
| 20 | - | - | 1:1.024 | 1:1.024 | 100.0 |

a Resultados del título de IgG en presencia de PBS

b Reducción del título de la IgG después del tratamiento con urea

Eliminado: PRUEBA

Con formato: Español
(Colombia)Eliminado: –Salto de página–
——Salto de página——
——Salto de página——Eliminado: Salto de página
¶**TABLA N° 5: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE AVIDEZ**

| <u>I SAGA</u> | | | | <u>TOTAL</u> |
|---------------|----------------|----------|-----------|--------------|
| | | | | |
| <u>IFI -A</u> | <u>AGUDOS</u> | <u>5</u> | <u>2</u> | <u>7</u> |
| | <u>CRONICO</u> | <u>4</u> | <u>18</u> | <u>22</u> |
| | <u>TOTAL</u> | <u>9</u> | <u>20</u> | <u>29</u> |

Sensibilidad : $5/9 * 100 = 55\%$ Especificidad: $18/20 * 100 = 90\%$ Valor predictivo positivo: $5/7 * 100 = 71\%$ Valor predictivo negativo: $18/22 * 100 = 82\%$

7 DISCUSIÓN

En las enfermedades infecciosas y en particular en las parasitarias lo primordial es establecer el agente etiológico y ello se logra mediante su identificación. En la toxoplasmosis puede detectarse el parásito por inoculación en ratones⁵¹ o en cultivos celulares⁶⁴ a partir de muestras biológicas como: líquido amniótico, sangre fetal, placenta o sangre de cordón umbilical, líquido cefalorraquídeo etc. Sin embargo estas solo son útiles en casos donde hay alteraciones inmunitarias o inmaduras y existe una producción baja de anticuerpos. Generalmente se desarrollan metodologías que detectan el agente infeccioso por datos serológicos, pero estas no logran dilucidar si el huésped estuvo o se encuentra en contacto con el agente infeccioso⁴⁸. Ante dicha dificultad, se ha introducido el principio de avididad a técnicas como la ELISA⁶⁵. La detección de la avididad de anticuerpos tipo IgG específicos se ha demostrado muy útil en el diagnóstico de infección reciente por *Toxoplasma gondii*⁶⁵ y otros agentes infecciosos⁶⁶, especialmente cuando se trata de establecer un diagnóstico diferencial⁶⁷, y para excluir casos en los que la IgM se mantiene presente por mucho tiempo después de la fase aguda⁶⁸.

En este estudio se evaluó el comportamiento de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta con una modificación, al agregar en uno de sus lavados un desnaturizante de proteínas como lo es la urea, en

diferentes concentraciones para eliminar los anticuerpos específicos tipo IgG que se unen débilmente al antígeno (baja avidéz), quedando sólo los de alta avidéz para ser cuantificados. Para validar su aplicabilidad se realizó un estudio en un modelo murino de infección. Los ratones, han sido uno de los animales predilectos para el estudio de la respuesta inmune, debido a su similitud en humanos⁶⁹.

In vivo se han establecido que factores como: la vía de entrada, dosis, sexo y linaje, son importantes para comprender la invasión y diseminación de *Toxoplasma gondii* y la respuesta inmune frente a este⁷⁰. Estudios anteriores de la respuesta inmune frente al sexo, han establecido que los ratones hembras suelen ser más susceptibles en la infección aguda caracterizada por una alta mortalidad y alta concentración de parásitos en sus cerebros. Los ratones hembras utilizadas para la obtención y mantenimiento de la cepa, apoyaron estos estudios, dando buenas concentraciones de taquizoítos en su cavidad peritoneal aproximadamente entre 2 a 3 días. En machos logró observarse cantidades similares de las obtenidas en las hembras en un periodo de tiempo mayor de 4 a 5 días postinoculación.

En estudios previos, donde se emplean parásitos vivos variaban los factores que podían influir en dicha respuesta⁷¹. En esta ocasión, el uso de dosis variadas de parásitos muertos resultaron ser poco inmunogénicas, reflejándose en una producción baja de anticuerpos. Empíricamente creemos que estos inducían a las linfocinas para crear

Eliminado: Además el antígeno requerido para el montaje de láminas requería un periodo no mayor de 52 horas, puesto que un periodo de tiempo superior creaba adhesión de anticuerpos inespecíficos al parásito evidenciando falsos positivos en la lectura de la inmunofluorescencia. ¶

Eliminado:

una respuesta inflamatoria poco significativa y por ende una baja producción de anticuerpos IgG anti-Toxoplasma al comparar los títulos obtenidos entre los días 0 y 45 postinoculación en los diferentes grupos inmunizados, se encontró que sólo aquel grupo que poseía un número significativo de parásitos, acompañado de un adyuvante mostraba ser un inóculo complejo, reflejándose en los títulos obtenidos. Sólo el uso de un adyuvante (coadyuvante completo de Freund) mostró aumento en la producción.

Eliminado: antitoxoplasma

Eliminado: o

Eliminado: o

Los adyuvantes generalmente están constituidos por dos elementos. Uno de ellos se encarga de proteger al antígeno de un rápido catabolismo y el otro tiene la capacidad de estimular el sistema inmune en forma inespecífica⁷², creando así una mejor presentación del antígeno muerto de *T. gondii*, y mejorando los títulos de anticuerpos anti-Toxoplasma IgG.

Eliminado: antitoxoplasma

El uso de muestras recolectadas en papel o pool no había sido objeto de comparación en estudios previos y nosotros encontramos que las muestras recolectadas en papel no son lo suficientemente confiables, pues están sujetas a errores tanto en la toma de la muestra como en su manipulación. El papel de filtro utilizado sugería una recolección no mayor a 30 λ para partir de una dilución de 1:16. Los resultados sugieren que factores en el sangrado tales como: insuficiencia en la cantidad de muestra, no permitían reflejar valores reales existentes de anticuerpos anti-toxoplasma IgG en los ratones, puesto que los títulos más altos se observaron hasta 1:32, contrario a lo observado en las muestras

recolectadas en pool donde los títulos alcanzados entre los días 0 y 45 fue de 1:128.

El uso de agentes denaturalizantes, empleados hasta el momento emplean dos concentraciones consideradas óptimas para diferenciar un estado agudo de uno crónico⁶⁵ (10). La seis molar (6M) resultó ser la más indicada para evidenciar que el índice de avidéz es proporcional al tiempo de infección, diferenciando una inmunización reciente de una pasada y que a medida que transcurre la infección el índice de avidéz aumenta hasta alcanzar el 100%. Este seguimiento fue realizado en el grupo preseleccionado por un periodo de 5 meses hasta observar el pico máximo de anticuerpos y su correspondiente estabilización en el porcentaje de avidéz, confirmándonos así que el principio de avidéz es posible medirlo por IFI.

En la utilización del IFI de avidéz para sueros humanos, igualmente se puso de manifiesto que la correlación entre tiempo de infección y el índice de avidéz fue mejor discriminada cuando utilizamos una concentración de urea 6M. Se encontró que los sueros tomados entre los primeros 4 meses post-infección presentaban una baja avidéz ($\leq 25\%$) y aquellos tomados después de los 6 meses o más presentaron alta avidéz ($\geq 50\%$), reflejando así la maduración de los anticuerpos. Resultados similares obtuvieron Lappalainen et al, por la técnica de ELISA de avidéz al estudiar 13 casos de seroconversión, en los que en 11 (85%) se presentó una baja avidéz en el primer suero que contenía IgG, tomado en los primeros 3 meses de

haber adquirido la infección. Al cabo de 6 meses, 10 de estos casos (91%) presentaron IgG de alta avidez⁷³. Joynton et al⁷⁴ en 7 sueros de pacientes con linfadenopatía por *Toxoplasma* encontraron en los primeros 3 meses de la infección un índice de avidez bajo o reacción límite mientras que en 10 sueros tomados al cabo de 6 meses o más dieron resultados de alta avidez.

En los 9 casos con el contexto de pacientes con marcadores de infección reciente como IgA (>5) e IgM (>9) positiva anti-*Toxoplasma* detectadas por la técnica de I SAGA se encontró que el 55,5% coincidían con la presencia de anticuerpos con baja avidez (IA ≤ 25%) lo que corroboró una infección aguda. Sin embargo también observamos en 1 paciente un IA de alto aún con presencia de IgM e IgA, lo que probablemente expresa títulos de estas inmunoglobulinas residuales de una infección antigua. Francis et al. al estudiar casos de infección aguda por *T. gondii* obtienen que la presencia de IgA se mantiene durante 6 o 7 meses después de la infección⁷⁵. Brooks en un estudio de pacientes con linfadenopatía por *Toxoplasma*, observó que el 50% de los pacientes presentó IgM detectable por la prueba de DS-IgM-ELISA durante 7-12 meses después de extraída la primera muestra de suero⁷⁶. No obstante esta persistencia de IgM también podría deberse a la presencia de factor reumatoide⁷⁷, o de anticuerpos "naturales" tipo IgM⁷⁸.

El 90% de los casos con toxoplasmosis crónica que mostraron IgM e IgA con resultado negativo evaluadas por la misma técnica, presentaron

Eliminado: 16

Eliminado: pacientes

Eliminado:

Eliminado: s

Eliminado: s

Eliminado: ELISA e

Eliminado: 81,3%

Eliminado: una

Eliminado: 3

Eliminado: s

Eliminado: a

Eliminado: a avidez

Eliminado: infección

Eliminado: infección

Eliminado: En los casos que mostraron presencia de IgM ≥ 9 (resultado positivo) evaluadas por la técnica I SAGA el 55,5%, se presentaron anticuerpos del tipo IgG de baja avidez (IA ≤ 25%).

Eliminado: una

anticuerpos del tipo IgG de alta avidéz ($IA \geq 50\%$), el restante 10% de los pacientes crónicos exhibió un índice de avidéz del 25% probablemente debido a una lenta maduración inmunológica ca la cual ha sido previamente reportada⁵⁰. Se consiguió con la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de Avidéz una sensibilidad del 55% como probabilidad de obtener un índice de avidéz bajo si el paciente tiene una infección aguda, con una proporción de falsos negativos del 44%, su especificidad fue del 90% de probabilidades que el resultado del índice de avidéz sea alto si el paciente se encuentra con una infección crónica. Además de estos 29 pacientes gestantes evaluados con toxoplasmosis, se obtuvo un valor predictivo positivo del 71%, un valor predictivo negativo del 82%, la capacidad de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de Avidéz de identificar un índice de avidéz bajo ($< 25\%$) si el paciente tiene una infección no mayor a 4 meses de adquirida y un índice de avidéz alto ($>50\%$) si el paciente tiene una infección mayor de 5 meses de adquirida (después del primer contacto con el parásito) nos muestra una exactitud del 79%. Con todo esto se evidencia la alta correlación entre los niveles de IgM e IgA con el índice de avidéz, asumiendo que a mayor puntaje de ISAGA IgM e IgA hay un mayor nivel de estas inmunoglobulinas específicas contra el *Toxoplasma*, lo que coincide con un índice de avidéz de la IgG bajo en infección aguda, y que a menor nivel de estas inmunoglobulinas específicas contra *Toxoplasma*, mayor tiempo de infección y mayor índice de avidéz indicativo de infección crónica. Nuestros resultados al estudiar la maduración de la avidéz de la IgG coinciden con los de otros autores^{65 73 7479} y se presenta la técnica de

Eliminado: a

Eliminado:

Eliminado: C

Eliminado:

Eliminado: IgM

Eliminado: IgM

inmunofluorescencia indirecta de aivez como una herramienta útil en el diagnostico de la infección por toxoplasmosis.

8 RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos que requieran recolectar muestras de modelos animales tales como los ratones, es aconsejable tomar la muestra a partir de corte de cola, ya que permite obtener buenas cantidades de cada animal. El papel de filtro, en pruebas que requieran diluciones a partir de él, no permite un grado de confiabilidad para un resultado final. Este está diseñado para abarcar una cantidad no superior a 30 λ . Errores tales como exceso o falta de la muestra pueden ser indicadores de ello. Esto se observó en los títulos obtenidos del grupo preseleccionado, donde al parecer los títulos 1:32 no fueron superados. De igual forma, este método utilizado en la inmunofluorescencia indirecta de avidéz no permite observar títulos inferiores a 1:16, requisito primordial para determinar el porcentaje de avidéz. Finalmente observaciones por periodos de tiempo mayor al realizado en este trabajo, podrían confirmar el comportamiento de la avidéz en inmunoglobulinas IgG anti-Toxoplasma creadas en ratón a través del tiempo.

Eliminado: .

Eliminado: antitoxoplasma

9 CONCLUSIONES

- Dosificaciones de 40.000 taquizoítos acompañadas de adyuvante completo de Freund logran estimular una buena respuesta inmune en el modelo murino.
- La urea 6M diferencia una inmunización reciente de una pasada.
- Existe una correlación entre el tiempo de infección y el aumento de la avidéz por la técnica de inmunofluorescencia indirecta de avidéz.
- Se determino una sensibilidad del 55%, una especificidad del 90% y una exactitud del 79% en la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de Avidéz.

Eliminado: ¶

<#>¶

¶

<#> Dosificaciones entre 40 y 40.000 taquizoítos no son lo suficientemente inmunogénicos para los ratones. ¶

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: Se requiere el uso de alta dosis de taquizoítos acompañadas de adyuvante, para obtener una respuesta inmune en el modelo murino.

Eliminado: La urea 6M diferencia una inmunización reciente de una pasada. ¶

¶

<#> Es posible medir la avidéz por IFI en un modelo murino de inmunización ¶

<#>¶

Eliminado: positiva

Eliminado: ¶

ANEXOS

1. TITULACION DE CONJUGADOS

1.1 TITULACION DEL CONJUGADO ANIMAL (RATON)

Se preparo diferentes diluciones del conjugado en una solución de PBS con azul de Evans de la siguiente manera:

Dilución 1:32, 484.4 λ de solución de azul de Evans mas 15.6 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG de ratón marcado con fluoresceína.

Dilución 1:64, 492.2 λ de solución de azul de Evans mas 7.8 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG de ratón marcado con fluoresceína.

Dilución 1:128, 496.1 λ de solución de azul de Evans mas 3.9 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG de ratón marcado con fluoresceína.

Dilución 1:256, 498.1 λ de solución de azul de Evans mas 1.9 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG de ratón marcado con fluoresceína.

Para la titulación del conjugado se utilizaron sueros controles de ratón positivos, alto, medio, bajo y negativo.

1.2 TITULACION DEL CONJUGADO HUMANO

A partir del titulo que presentaba el conjugado se realizaron dos diluciones menores y una mayor.

Título del conjugado 1:256

Dilución 1:64, 492.2 λ de solución de azul de Evans mas 7.8 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG humano marcado con fluoresceína.

Dilución 1:128, 496.1 λ de solución de azul de Evans mas 3.9 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG humano marcado con fluoresceína.

Dilución 1:256, 498.1 λ de solución de azul de Evans mas 1.9 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG humano marcado con fluoresceína.

Dilución 1:512, 499.03 λ de solución de azul de Evans mas 0.97 λ de conjugado antigammaglobulina ANTI-IgG humano marcado con fluoresceína.

Se utilizaron sueros controles positivos de títulos 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024 y un suero control negativo.

2. PREPARACION FORMOL AL 2%

El formol al 2% se prepara en PBS pH: 7,2, teniendo en cuenta que el formol comercial es del 37%.

3. PREPARACION SOLUCION SALINA BUFFERADA pH: 7,2: 0,01M (PBS)

Formula para un litro

| | |
|---------------------------------|--------|
| NaCl ₄ | 7,65g |
| Na ₂ PO ₄ | 0,724g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,21g |

4. PREPARACION DE AZUL DE EVANS 1%

Se toma un gramo de polvo de azul de Evans y se disuelve hasta 100 ml en solución salina bufferada pH:7,2.

5. PREPARACION DE GLICERINA TAMPONADA pH: 9,0

Na₂HPO₄ anhidro 2,84g

H₂O destilada c.s.p. 100ml de solución

6. PREPARACION DE GLICERINA DE TRABAJO pH:9,0

Glicerina 9,0ml

solución stock 1,0ml

Chequear el pH y ajustarlo con 0,1 de NaOH si es necesario

7. UREA 2M

UREA 120,10g

Disuelta en un litro de agua destilada.

Con formato: Español
(Colombia)

8. UREA 4M

UREA 240,20g

Con formato: Español
(Colombia)

Disuelta en un litro de agua destilada.

9. UREA 6M

Con formato: Español
(Colombia)

UREA 360,36g

Disuelta en un litro de agua destilada.

10. UREA 8M

Con formato: Español
(Colombia)

UREA 480,48g

Disuelta en un litro de agua destilada.

BIBLIOGRAFIA

1. NICOLE, C. And MANCEAUX, L. 1909. Sur un protozoaire nouveau de Gondi, Toxoplasma. Archives Institut Pasteur (Tunis). 2: 97-103. Con formato: Francés (Francia)

2. CORREDOR, A. 1981. Toxoplasmosis. Revision del Tema. Ministerio de Salud. 43 pag.

3. SHERRIS, J.C. 1993. Esporozoos. Microbiologia Medica. Editorial Doyma. España. Cap 52: 783-815. Con formato: Inglés (Estados Unidos)

4. PRADA, G. 1998. Toxoplasma y embarazo. ¿Tamizaje universal?. Acta Medica Colombiana. 23: 271-274.

5. DUFFY, K. WHARTHO, P.J. JOHNSON, J. NEW, L. and HOLLIMAN, R.E. 1989. Assessment of immunoglobulin M. Immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting Toxoplasma specific IgM. Journal Clinical pathology. 42: 1291-1295 Con formato: Inglés (Estados Unidos)

6. ROOS, T. MARTIUS, J. GROSS, U. And SHORD, L. 1993. Systematic serology scening for toxoplasmosis in pregnancy. Gynecology and Obstetric Investigations. 81: 243-250. Con formato: Inglés (Estados Unidos)

7. EISEN, H.N. SISKIND, G.W. 1964. Variations of affinities of antibodies during the immune response. Biochemistry. 3:994-1008. Con formato: Inglés (Estados Unidos)

8. INOUYE, S. HASEGAWA, A. MATSUNO, S. And KATOW, S. 1984. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. Journal of Clinical Microbiology. 20: 525-529. Con formato: Inglés (Estados Unidos)

9. THOMAS, H.I.J. AND CAPNER, M. 1988. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between Con formato: Inglés (Estados Unidos)

primary rubella and rubella reinfection. *Epidemiology and Infection*. 101: 591-598.

10. **LEON, P. LOPEZ, J.A. ORY, F. ELOLA, C. Y ECHEVARRIA, J.M.** 1997. Deteccion de anticuerpos IgG de baja avididad en el diagnostico de la infeccion primaria aguda por virus de la hepatitis C. *Emferm Infecc Microbiol Clin*. 15: 14-18.
11. **HEDMAN, K. LAPPALAINEN, M. SEPPÄIÄ, I. AND MÄKELÄ, O.** 1989. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific Ig G. *The Journal of Infectious Diseases*. 159: 736-740. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
12. **JENUM, P. AND. STRAY-PEDERSEN, B.** 1998. Development of especific immunoglobulins G, M and A following primari *Toxoplasma gondii* infection in pregnan women. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2907-2913. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
13. **ASHBURN, D. JOSS, A.W. PENNINGTON, H.T.** 1998. Do IgA, IgE and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy?. *Journal of Clinical Pathology*. 51(4): 312-315. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
14. **ELLIS, J.T. MORRISON, D.A. AND JEFFRIES, A.C.** 1998. The phylum apicomplexa: an update on the molecular phylogeny. *Evolutionary Relationships Among Protozoa*. Pag: 255-274 Con formato: Inglés (Estados Unidos)
15. **MCLEOD, D. AND BROWN, C.** 1991. *Toxoplasma gondii*- New advances in cellular and molecular biology. *Experimental Parasitology*. 72:109-121. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
16. **BONHOMME, A. BOUCHOT, A. PEZZELLA, N. LEMOAL, H. GOMEZ-MARIN, J.E. And PINON, J.M.** 1998. Mecanismos de señalizacion intracelular durante el proceso invasivo de *Toxoplasma gondii*. *Segundo Congreso Internacional De Toxoplasmosis. Memorias*. pag:137-143.

17. REMINGTON, J.S. MCLEOD, R. DESMONTS, G. 1995. Toxoplasmosis. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. W.B. Saunders: Philadelphia. 4th edition. Pag: 140-267. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
18. OLSEM, O.W. 1977. Protozoos. El Parasitismo y Los Protozoos. Editorial Aedos. España. Pag: 244-251.
19. FRENKEL, J.K. RUIZ, A. And CHINCHILLA, M. 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in kansas and Costa Rica. *American Journal of Tropical medicine Hygenc.* 24(3): 439-443. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
20. DUBEY, J.P. and FRENKEL, J.K.1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *Journal of protozool.* 19: 155-177. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
21. FRENKEL, J.K. DUBEY, J.P and MILLER, N.L. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocyst. *Science.* 167: 893-896. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
22. BOWIE, W.R. KING, A.S.WELKER, D.H. ISAAC-RENTON, J.L. BELL, A. ENG, S.B. and MARION, S.A.1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *The Lancet.* 350:173-177. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
23. FRENKEL, J.K.1998 . Epidemiologia de la infeccion por *Toxoplasma* en humanos. *Segundo Congreso Internacional De Toxoplasmosis. Memorias.* Pag: 81-97.
24. THULLIEZ, P. 1998. Diagnostico y manejo prenatal de la toxoplasmosis congenita. *Segundo Congreso Internacional De Toxoplasmosis. Memorias.* Pag: 26-32.
25. DUBEY, J.P. MILLER, N.L. AND FRENKEL, J.K. 1970. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii.* *journal of parasitology.* 56: 447-456. Con formato: Inglés (Estados Unidos)

26. DUBEY, J.P. MILLER, N.L. AND FRENKEL, J.K. 1970. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *Journal Of Experimental Medical*. 132: 636-662. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
27. JULIAO, O. CORREDOR, A. MORENO, G. 1988. Toxoplasmosis en Colombia. Bogotá: Estudio nacional de salud. 2ª Ed *Imprenta Instituto Nacional de Salud*.
28. GOMEZ, J. E. LONDOÑO, M.T. CASTAÑO, J.C. PEREZ, J.C. RIOS, M. DEL P. 1993. Epidemiología de la infección por *Toxoplasma Gondii* en gestantes de Armenia, Quindío. *Colombia Medica*. 24:14-18.
29. DUBEY, J.P. 1998. Toxoplasmosis en animales para carne y de zoológico. *Segundo Congreso Internacional De Toxoplasmosis. Memorias*. Pag: 51-56.
30. FAULL, W.B. CLARKSON, M.J. and WINTER, A.C. 1996. Toxoplasmosis in a flock of sheep: some investigations into its source and control. *Veterinary Record*. 119: 491-493. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
31. DUBEY, J.P. LUNNEY, J.K. SHEN, S.K. KWOK, O.C.H. ASHFORD, D.A. and THULLIEZ, P. 1996. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *Journal of parasitology*. 82: 438-443. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
32. COLLINS, G.H. 1981. Studies in sarcocystis species. VII. Sarcocystis and *Toxoplasma* in red deer (*cervus elaphus*). *New Zealand Veterinary Journal*. 29: 121-127. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
33. SWARTZBERG, J.E. and REMINGTON, J.S. 1975. Transmission of *Toxoplasma*. *American Journal Diseases Childrens*. 129: 777-779. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
34. BRITT, R.H. ENZMANN, D.R. and REMINGTON, J.S. 1981. Intracranial infection in cardiac transplant recipients. *Annals Neurology*. 9: 107-119. Con formato: Inglés (Estados Unidos)

35. SUZUKI, Y. REMINGTON, J.S. 1994. Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. *Forum in Immunology*. 48th: 66-67. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
36. ZANGERLE, R. ALLERBERGER, F. and POHL, P.1991. High risk of developing toxoplasmic encephalitis in AIDS patients seropositive to *Toxoplasma gondii*. *Medical Microbiology Immunol*. 180: 59-66. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
37. TAY, J. GUTIERREZ, O. 1997. Infection by *Toxoplasma gondii* in children with cerebral infantile palsy. *Parasitology*. 52: 17 -21. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
38. GOMEZ, J. E. CASTAÑO, J.C. LONDOÑO, M.T. 1995. Toxoplasmosis congénita en Colombia: un problema subestimado de salud publica. *Colombia Medica*. 26:66-70.
39. McCABE, R.E. BROOKS, R.G. DORFMAN, R.F. 1987. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev. Infect dis*. 9: 754 -774. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
40. VINHAL, F.A. PENA,D.O. KATINA, J.H. BRANDAO, E.O. SILVA, D.A.O. OREFICE, F. And MINEO. 1994. Analysis of aqueous humos in ocular toxoplasmosis detection of low avidity IgG specific to *Toxoplasma gondii*. *Applied Parasitology*. 35: 1-7.
41. RENOL, C. SUGAR, A. CHAVE, J.P. 1992. *Toxoplasma* encephalitis in patiens with the acquired immunodeficiency syndrome. *Medicine*. 71: 224-239. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
42. LAZO, J. 1998. Encefalitis en pacientes con sida: diagnostico diferencial de toxoplasmosis y enfermedad de chagas. *Segundo Congreso Internacional De Toxoplasmosis. Memorias*. Pag: 118 -136.
43. MARGNI, R.A. 1977. Inmunologia e inmunoquimica. *Panamericana*. 2ed 592p.

44. INNES, E.A. 1997. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Compendio Immunology Microbiology Infections Disease*. 20(2):131-8.
45. CESBREA, M.F. DUBREMETZ, J.F. SHER, A. 1993. The immunology of toxoplasmosis. *Forum in Immunology*. 144:7 -8. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
46. GOMEZ-MARIN, J.E. BONHOMME, A. GUENOUNOU, M. AUBERT, D. VALERE, A. BELLONI, A. PINON, J.M. 1998. Citoquinas y quinasas de proteínas durante el proceso infeccioso de *Toxoplasma gondii*. *Segundo Congreso Internacional De Toxoplasmosis. Memorias*. Pag: 61-65. Con formato: Francés (Francia)
47. SIBLEY, D. ADAMS, L.B. KRAHENBUHL. 1993. Macrophage interactions in toxoplasmosis. *Forum in Immunology*. 144:38 -40. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
48. LIESENFELD, O. PRESS, C. MONTOYA, J. 1997. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the platelia toxo Ig M test. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 174-178. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
49. BOBIC, B. SIBALIC, B. AND DJURKOVIC-DJAKOVIC. 1991. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary *Toxoplasma* infection. *Gynecology and Obstetric Investigations*. 13: 182-184. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
50. JENUM, P. AND. STRAY-PEDERSEN, B. 1998. Development of specific immunoglobulins G, M and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2907-2913. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
51. DIEGO, J.A. VAZQUES, J.J. PENIN, P. FERNANDEZ, J. SANCHEZ, S. GAMALLO, C. 1993. Uso de murine subinoculation for the diagnosis and isolation of toxoplasmosis in HIV-infected Con formato: Inglés (Estados Unidos)

patiens with persistent lymphadenopathy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 87: 179-184.

52. MONTOYA, M. GOMEZ, J.E. CASTAÑO, J.C. MARK, C. AUBERT, D. BONHOMME, A. And PINON, J.M. 1996. Avances diagnosticos en Toxoplasma. PCR, nuevos marcadores de infeccion evolutiva y otras tecnicas. *Acta Medica Colombiana*. 21(3): 127 -138. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
53. RODRIGUEZ, J.C. ALCANTARA, M.J. y ROYO, G. 1995. Toxoplasmosis en el embarazo: nuevas tecnicas diagnosticas. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 14: 145-149.
54. SABIN, A.B. FELDMAN, H.A. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*toxoplasma*). *Science*. 108. 660-663. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
55. BARNETT, E.U. 1977. Immunofluorescence test in immune technics and applications. *American Journal of Clinical Pathology*. 68(5): 662-663. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
56. PANIGRAHI, H. 1978. Indirect haemagglutination test and indirect fluorescent antibody test in suspected cases of toxoplasmosis. *ind journal med res*. 67: 918 -923. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
57. DANNEMAN, B.R. VAUGHAN, W.C. THUILLIEZ, P. 1990. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal Clinical Of Microbiology*. 28: 1928-1933.
58. VOLLER, A. 1978. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Microbiology Association*. 2(1) Con formato: Inglés (Estados Unidos)
59. ROSSI, C.L. 1998. A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin G antibody avidity in toxoplasma. *Diagnosis Microbiology Infections Disease*. 30(1):25 -30. Con formato: Inglés (Estados Unidos)

60. FUENTES, I. RODRIGUEZ, M. DOMINGO, C.J. CASTILLO, F. JUNCOSA, T. AND. ALVAR, J. 1996. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2368-2371. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
61. MULLIS, K.B. FALOONA, F.A. SAIKI, R.K. HORN, G.T. ERLICH, H.A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerasa chain reaction. *Cold Sping Harbor Symp Quant Biol*. 51: 263-273. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
62. GROVER, C.M. THULLIEZ, P. REMINGTON, J.S. AND BOTHROYD, J.C. 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital Toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2297-2301. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
63. LEWIN, B. 1994. "Genes V". *Oxford University Press*. NY. 645-647. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
64. WALLON, M. SUN, X. GANDILHON, F. MOJON, M. PEYROA, F. COZON, G. 1994. Toxoplasma gondii dans liquide amniotique comparasion de 2 lignes cellulaires puut l'isolement en culture. *La Presse Medicale*. 23:1312. Con formato: Francés (Francia)
65. HOLLIMAN, R.E. RAIMOND, R. RENTON, N. JOHNSON, J.D. 1994. The diagnostis of toxoplasmosis using IgG avidity. *Epidemiology and Infection*. 112:399-408. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
66. HERNER, V. HEDMAN, K. REEDIK, P. 1997. Immunoglobulin G avidity in the serodiagnosis of congenital rubella syndrome. *Eur. Journal Of Clinic Microbiology Infections Dis*. 16: 763-766. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
67. KANGRO, H.O. MANZOOR, S. HARPER, D.R. 1991. Antibody avidity following varicela-zoster virus infections. *Journal Medical of Virology*. 33: 100-105. Con formato: Inglés (Estados Unidos)
68. DEL BONO, V. CANESSA, A. BRUZZI, P. FIORELLI, M.A. TERRAGNA, A. 1989. significane of specific immunoglobulin M in Con formato: Inglés (Estados Unidos)

the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Journal Clinical of Microbiology*. 27: 133-135.

69. **FAUBERT, B.M. BELOSEVIC, M.** 1990. Animals models for *Giardia duodenalis* type organisms. In: Ruitenberg EJ. MacInnis AJ. Editors. *Human Parasitic Diseases*. Volomen III Ansterdam:EA MEYER; pag. 77-90.
70. **ROVERTS, C. CRUICKSHNK, M. ALEXANDER, J.** 1995. Sexdetermined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infection and Immunity*. July: 2549- 2555.
71. **WALTER, W. ROVERTS, C. FERGUSON, D. JEBBARI, H. CRUICKSHNK, M. ALEXANDER, J.** 1997. Innate inmunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with diferrences in interleukyn-12 an Gamma interferon production. *Infection and Immunity*. Mar:1119 -1121.
72. **GOMEZ, F.S. GUTIERREZ, M.F. RUEDA, N.S. RODRIGUEZ, T.A.** 1994. La inmunologia en el diagnostico clinico, 1° Edicion, Santa Fe de Bogotá.
73. **LAPPALAINEN, M. KOSKELA, P. MAJALEENA, K.** 1993. *Toxoplasmosis acquired during pregnancy. Improved serodiagnosis based on avidity of IgG. Journal of Infectious Diseases*. 167: 691-697.
74. **JOYNSON, D.H. PAYNE, R.A. RAWAL, B.K.** 1990. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology*. 43: 1032-1033.
75. **FRANCYS, J.M. JOYSON, D.H.M.** 1993. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Francés (Francia)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

assay. *European Journal Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases*. 12: 556-559.

76. **BROOKS, R.G. McCABE, R.E. REMINGTON, J.S.** 1987. Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev. Infections Dis*. 9: 1055-1062.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

77. **NOAT, Y. BARNETT, E.V. REMINGTON, J.S.** 1981. Method for avoiding false positive results occurring in immunoglobulin M enzimelinked immunosorbent assays due to presence of both rheumatic factor and antinuclear antibody. *Journal Clinical of Microbiology*. 14: 73-79.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

78. **DESMONT, G. REMINGTON, J.S.** 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infections: Method for increasing sensitivity and specificity. *Journal Clinical of Microbiology*. 11: 562-570.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

79. **COZON, G.J.N. FERRANDIZ, J. NEBHI, H. WALLON, M. PEYRON, F.**1998. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. . *European Journal Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases*. 17: 32-36.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

| ▲

Con formato

en los restantes 3 casos (18,7%) encontramos que los anticuerpos tipo IgG presentaron alta avidéz (IA del 100%). En este grupo de pacientes (n= 16), la media del IA de los IgG fue del 50% Con una desviación estándar del 27,4 (GRAF. 13).

Salto de página

De los 16 pacientes un subgrupo A de 9 casos (56,2%) se evaluó por la técnica de ISAGA para determinar la IgA e IgM (pacientes 1-9, TABLA N°3). Se observó que en 5 casos (55,5%) presentaron un IA \leq 25 % lo que indica un tiempo de infección menor a los 4 meses, 3 casos (33,3%) presentaron un IA = 50% y un solo caso (11,1%) con un IA de 100%,

Se obtuvo una desviación estándar entre IA y determinación de la IgM por la técnica de ISAGA de 0,249, (GRAF. 14). La desviación estándar entre IA y determinación de la IgA por la técnica de ISAGA fue de 0,19 (GRAF. 15)

En un subgrupo B integrado por 7 pacientes a los que se les determinó la IgA e IgM por la técnica de ELISA (pacientes 10-16. TABLA N°4). Se observó que tan solo un caso (14,2%) presentó un IA \leq 25 %, 4 casos (57,1%) presentaron un IA = 50% y 2 casos (28,5%) con un IA de 100%. Se obtuvo una desviación estándar entre IA y determinación de la IgM por la técnica de ELISA de 0,258 (GRAF. 16). La desviación estándar entre IA y determinación de la IgA por la técnica de ELISA fue de 0,0014 (GRAF. 17).

. En este grupo (n=20), la media del IA fue del 75% con una desviación estándar del 29,2 % (GRAF 14, TABLA N°5).