



Ximena Regalado León

MVZ. Sergio Chong Velázquez

Avance de tesis

Taller de elaboración de tesis

9no cuatrimestre

MVZ

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis constituye una de las enfermedades zoonóticas de amplia distribución mundial: causada por un protozoo del Phylum Apicomplexa intracelular obligatorio y cuyo descubrimiento se remonta a la primera década del siglo XX.

Este protozoo se encuentra en todas las latitudes afectando a humanos y a diversas especies de mamíferos domésticos silvestres y aves en el ámbito mundial, sin embargo, en la mayoría de las infecciones agudas pasa desapercibida por el paciente y por el médico. Cerca de la tercera parte de la humanidad ha sido expuesta a este parásito. En la mayoría de los adultos no causa alteraciones serias; sin embargo puede causar ceguera y retardo mental en niños por una infección congénita y una devastadora enfermedad en individuos inmunocomprometidos (Hill y Dubey, 2002).

Son numerosos los estudios realizados con el objetivo de revelar las características de su ciclo biológico, las posibles pruebas de diagnóstico y las medidas de control y prevención. Es importante destacar que las primeras descripciones de toxoplasmosis humana fueron realizadas por Castellani, en 1913; pero se toma conciencia de su existencia gracias a los estudios del oftalmólogo checo Janku, en 1923, cuando describió la presencia de toxoplasma en la retina de un niño que había fallecido con un cuadro de coriorretinitis acompañada con microftalmia (Pantoja y Pérez, 2001)

Toxoplasma gondii es un organismo unicelular que se reproduce solamente dentro de células nucleadas, por lo que es un parásito intracelular obligado de animales de sangre caliente (homeotermos), ya sean acuáticos, terrestres o aéreos. El nombre de esta especie hace referencia a su parecido con un arco (o toxon, en griego) y a su vez, que fue descubierta en un roedor pequeño de África, llamado *gondii*.

La enfermedad puede presentarse como: aguda sintomática, aguda asintomática, crónica y congénita. El huésped definitivo son los felinos y el huésped intermediario es el ser humano dentro de la cadena biológica del parásito; en el gato incluye un ciclo enteroepitelial con una división sexuada y otra asexuada intracelular. La fase esquizogónica y gametogónica se desarrollan en el intestino delgado, concentrándose en la extremidad de las vellosidades del íleo. (López, 2005)

El período prepatente en los gatos, comprende entre la ingesta y la formación de ooquistes. Si comienza con la ingestión de un quiste tisular, el período es de 3 a 10 días; si son taquizoítos de 19 a 48 días y si ingirió ooquistes de 21 a 48 días. Los gametocitos aparecen en el intestino delgado de 3 a 15 días después de la infección (Díaz, 2001)

Toxoplasma gondii tiene afinidad selectiva por el tejido muscular y cerebral. Hay que diferenciar en los tejidos la presencia de quistes, granulomas y necrosis tisular; aparenta ser inofensivo en su forma de quistes y pseudos-quistes, los cuales mediante la ruptura liberan 3.000 esporozoítos aproximadamente llegando a invadirlos tejidos y generar focos de infección activa. Los quistes pueden estar en estado silente durante años (Botero, 2003).

En animales inmunodeprimidos la ruptura de quistes reactiva la enfermedad, incluyendo encefalitis o toxoplasmosis diseminada. *Toxoplasma gondii* causa abortos y mortandad perinatal, puede cruzar la placenta e infectar el feto. Se localiza también en fibras miocárdicas en forma de quistes tisulares, cuando éstos se rompen origina una miocarditis focalizada y hemorragia (Morales, 2007).

Las alteraciones en el SNC tienen diferente gravedad según la localización y la extensión del área infectada, las células gliales, especialmente los astrocitos, son selectivamente afectados. Los quistes parasitarios están inmersos en el tejido

nervioso o en cuadros no purulentos en las meninges, y con exudado seroso hasta el hemorrágico. Predomina la necrosis focalizada o diseminada (Kirk, 1997).

Los gatos juegan un papel importante en el mantenimiento del ciclo evolutivo de *T. gondii* en la naturaleza, ya que son uno de los hospederos definitivos que se encuentran comúnmente cerca de los humanos y pocas veces presentan manifestaciones clínicas consecuentes por la infección del parásito.

T. gondii realiza una replicación sexual y asexual en sus hospederos. La reproducción sexual del ciclo se lleva a cabo únicamente en el intestino de los felinos y resulta en la formación de ooquistes que llegan a ser eliminados en las heces y estos son resistentes a las condiciones ambientales.

La toxoplasmosis clínica en gatos reportada presenta fiebre persistente, ictericia terminal, leucopenia, desórdenes oculares, pulmonares, hepáticos, neurológicos, gastrointestinales y musculares. Los gatos jóvenes son más susceptibles a la forma aguda de la enfermedad, y observan períodos extendidos de elevadas temperaturas refractarias a la medicación, acompañadas de letargia, anorexia y disnea. Los síntomas pueden semejar, un distress respiratorio (sin tos) por la progresiva bronconeumonía, una severa enteritis, u ocasionalmente, una miocarditis, pancreatitis, hepatitis o linfadenitis abdominal (Leblebicioglu, 2006).

La manifestación clínica más común es la linfo-adenopatía, la cual comúnmente involucra los nódulos linfáticos cervicales posteriores.

Sin embargo, los nódulos linfáticos de cualquier sitio del cuerpo pueden estar involucrados.

El diagnóstico definitivo en los animales vivos se logra por biopsia, aislamiento del organismo, o con títulos crecientes o altos de anticuerpos específicos. El diagnóstico clínico de rutina se apoya en los síntomas compatibles confirmados con las pruebas serológicas. Los gatos adultos raramente presentan síntomas clínicos de toxoplasmosis durante la primoinfección y la fase de eliminación de ooquistes (Barragán, 2002).

Las pruebas coprológicas, son de poca importancia debido a la corta patencia (15 días). En gatos sanos, durante el examen de heces los ooquistes pasan fácilmente desapercibidos por su pequeño tamaño. Una pequeña proporción de gatos seropositivos podría estar eliminando ooquistes; por otro lado un gato seronegativo podría estar sano, o recientemente infectado y también eliminar ooquistes (Blood, 1992).

El contacto directo con los gatos raramente puede resultar en la transmisión de la infección, porque la mayoría de los gatos no dejan materia fecal en el pelo por las costumbres de acicalamiento (Flores, 1991).

Debe impedirse que los gatos cacen y coman carne cruda o mal cocida, defequen en los jardines ya que los ooquistes sobreviven durante meses a años bajo condiciones apropiadas (Blood, 1992).

Adicionalmente, otros hospedadores intermediarios pueden transmitir la enfermedad por ingestión de su carne. La eliminación de ooquistes al medio ambiente ocurre una vez en la vida del animal y por varias semanas. El tiempo de incubación de los ooquistes lleva de 1 a 5 días. Las principales vías de contagio para el hombre son las carnes mal cocidas, las verduras mal lavadas y el agua contaminada (Martin, 2003).

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante la punción directa de la vena yugular de los gatos, usando vacutainers y agujas de 23x1 pulgadas. Las muestras fueron centrifugadas y los sueros resultantes se conservaron en congelación a -20 °C hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*

Realizada mediante las siguientes técnicas:

Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos (Ig G) contra *Toxoplasma gondii*

1. Las policubetas fueron pasadas con un paño húmedo por la base para eliminar cargas electrostáticas.
2. Se coloca 25 µl de diluyente de sueros HAI en todos los pocillos de la policubeta.
3. Enseguida se coloca 25 µl de sueros controles y de las muestras a ensayar en los pocillos de la fila 1 donde se utilizaron tantas columnas horizontales como sueros se procesaron.
4. Se realizan diluciones a partir de la fila 1 (dilución 1/2) pasando los microdilutores hacia la fila 2 (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la fila 6.

5. Luego se colocó en las filas 1 y 2 (diluciones 1/2 y 1/4) 25 µl de GR no sensibilizado para el control de la heterofilia.

6. En el resto de los pocillos, se agregó 25 µl del antígeno HAI.

7. Se agitó la policubeta durante 30 segundos.

8. Luego se dejó en reposo al resguardo de vibraciones durante 90 minutos.

9. Se realizó la lectura a partir de los noventa minutos

10. Lectura:

-No reactivo: Presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares

-Reactivo: Formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos

Se tomó la lectura como positivos valores \geq a 1/16 (punto de corte) de acuerdo al kit comercial Toxotest-HAI.

La prueba de hemaglutinación se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-T.gondii de producir aglutinación en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito (Wiener lab, 2000).

Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), para la detección de anticuerpos (Ig G) contra *Toxoplasma gondii*:

1. Para el inicio a la prueba, las muestras y los reactivos debieron estar a medio ambiente.

2. Se colocó en una policubeta 187.5 µl de buffer y 12.5 µl de cada suero problema (dilución 1:16), luego se repitió el procedimiento con cada suero problema, se homogenizó aproximadamente 2 seg en el agitador. Luego se procedió a colocar

10 µl de cada suero diluido en cada pozo de la lámina de inmunofluorescencia la cual contenía taquizoítos fijados de *Toxoplasma gondii*. Previamente en los dos primeros pozos se colocaron controles positivos y negativos.

3. Enseguida las láminas fueron puestas en una cámara húmeda y llevadas a la estufa a 37° C x 30 min.

4. Se retiraron de la estufa y el exceso de líquido de cada lámina se desechó y se colocaron las láminas en un vaso Coplin con buffer de lavado, luego se procedió a secar cada lámina x 5´.

5. Se dispensó 10 µl del conjugado anti-gato dentro de cada pozo de la lámina, se colocó la lámina dentro de la cámara húmeda y se llevó a estufa nuevamente a 37° C x 30 min.

6. Una vez retirada de la estufa se desechó el líquido sobrante y nuevamente se sometió a la acción del buffer de lavado.

7. Se procedió a colocar 10 µl de glicerina buferada en cada pozo, se colocó la lámina cubreobjeto.

8. Luego se llevó al microscopio de fluorescencia (Leica) para su evaluación, usando aceite de inmersión.

9. Lectura: La fluorescencia completa del taquizoíto, se interpretó como un resultado positivo, mientras que la fluorescencia parcial o ausente del taquizoíto, nos indicó un resultado negativo.