

## INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL DIAGNOSTICO DE TOXOPLASMOSIS EN CONEJOS DE BIOTERIO.

LUIS FERNANDO VALENCIA,\* JUAN CARLOS RODRIGUEZ.\*\*

Fue posible adaptar y utilizar la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en el diagnóstico de toxoplasmosis cunícula. Se estudiaron 72 sueros de conejos de Bioterio de la Universidad de Caldas y 62 sueros de conejos de Bioterio del INAS, encontrándose títulos de prevalencia de ACS que fluctuaron entre 1:16 y 1:1024 en el 70,87% de las poblaciones examinadas.

Se concluye que un alto porcentaje de los conejos estudiados ha estado en contacto con el *Toxoplasma gondii* y que dicha infección presumiblemente ocurrió al consumir alimentos (verduras, forrajes, pastos y concentrados) contaminados con ooquistes de *Toxoplasma* y/o por infección congénita.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados arrojados por la prueba de IFI en las poblaciones estudiadas, a un nivel de significancia 0,01.

### INTRODUCCION

Los conejos de Bioterio constituyen una de las bases para el ensayo de productos biológicos, pruebas diagnósticas e investigaciones biomédicas; la calidad de estas actividades y los avances que se consigan en las áreas de la salud dependen considerablemente de los animales empleados y de las condiciones sanitarias que se les pro-  
guyen (1).

La toxoplasmosis es una infección parasitaria, reconocida también dentro de la especie cunícula (12), capaz de causar grandes pérdidas en las explotaciones y de constituir a éstas como fuente de infección para las personas que consuman su carne impropriadamente preparada.

Con el fin de detectar, la infección toxoplásmica en conejos de los Boterios de la Universidad de Caldas e Instituto Nacional de Salud (INAS) se adoptó y utilizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para medir los niveles de anticuerpos (ACS).

### MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 72 conejos del bioterio de la Universidad de Caldas, nacidos y levantados allí, y 62 del bioterio del INAS, a donde llegan procedentes de plantas de producción cunícula.

Las muestras séricas se obtuvieron mediante punción cardiaca, extrayendo 10 ml de sangre a cada uno de los conejos en

---

\* Estudiantes de Post-Grado en entrenamiento. Grupo de Microbiología e Inmunología, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud.

estudio. Luego de la retracción de los coágulos se separaron los sueros asépticamente, se les adicionó azida de sodio (Merck) en una proporción de 1 mg/ml y se procedió a conservarlos en congelación (-70°C) hasta el momento de efectuar la prueba.

Se utilizó un conjugado fluorescente anti-inmunoglobulina G (aIgG) de conejo; para su elaboración se hizo necesario extraer la fracción IgG del suero de conejo por el método del ácido octanoico (3) y purificarla por cromatografía en columna con resina aniónica DEAE-Sepharosa GLGB (Pharmacia Fine Chemicals). El antisuero correspondiente (aIgG) se obtuvo realizando inoculaciones seriadas de IgG por vía intra-dérmica a un caprino; se efectuaron evaluaciones periódicas de la respuesta inmunológica mediante pruebas de doble inmuno-difusión (DID) (Figura 1) y cuando se alcanzó un título de 1:32 se procedió a fraccionar y purificar la aIgG (Figura 2). Posteriormente, se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (ITCF Isómero I BBL), se tituló el conjugado elaborado y se efectuaron pruebas de especificidad.

Para la preparación del antígeno (Ag) se empleó la cepa de *Toxoplasma gondii* del

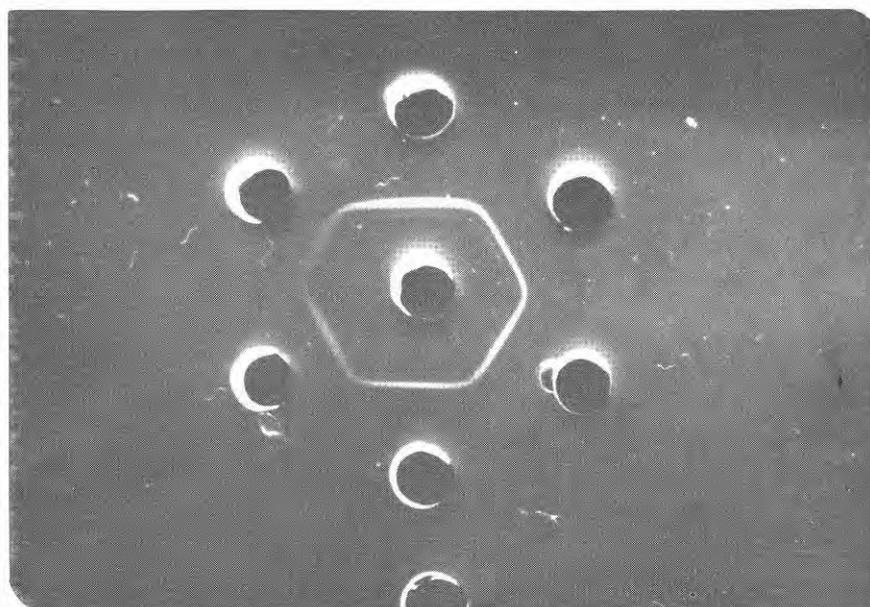
INAS pero modificando la metodología habitualmente utilizada en su elaboración (4), puesto que, en lugar de efectuar inoculaciones seriadas de exudado peritoneal con *Toxoplasma* en ratones, se procedió a inocular un conejo adulto, del cual, transcurridos siete días, se extrajo el bazo y luego de macerarlo en solución salina estéril, se inoculó intra-peritonealmente a un grupo de ratones blancos-suizos con el fin de extraer el exudado peritoneal dos días más tarde.

Los sueros control positivos se obtuvieron inoculando conejos por vía intradérmica e intraperitoneal con *Toxoplasma* vivo e inactivado (5).

El montaje, lectura e interpretación de la prueba de IFI se efectuó según lo descrito por el Departamento de Educación y Salud de los Estados Unidos (4); la lectura se realizó en un microscopio de campo oscuro Leitz Wetzlar Orthoplan, modelo 6829, objetivo 40X y 100X.

Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó la prueba normal para la diferencia de proporciones, teniendo en cuenta el tamaño de la muestra de las poblaciones en estudio (6).

Figura 1. Doble difusión en Gel de Agarosa (Ouchterlony). Al confrontar suero normal de conejo a diluciones dobles de aIgG de conejo en cabra, se observa monoespecificidad y el título final de trabajo (1:32).



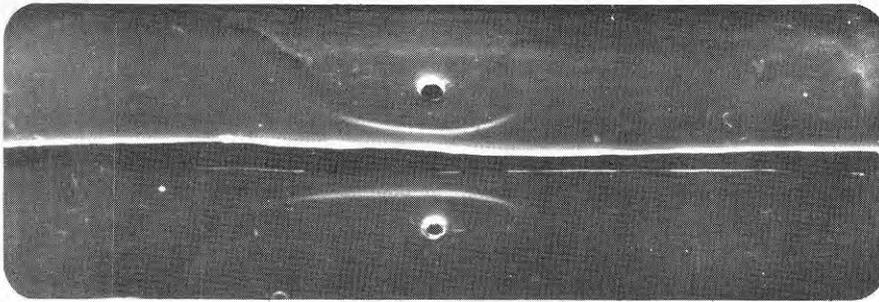


Figura 2. Estudio Inmunolectroforético de algG luego de la repurificación cromatográfica. Se observa una banda de precipitación nítida.

RESULTADOS

Los conejos inoculados con toxoplasma, para conseguir sueros control positivo, dieron títulos serológicos altos (1:16.264), medios (1:1024 a 1:4096) y bajos (1:64 a 1:256), (Figuras 3, 4 y 5, respectivamente).

Los resultados arrojados por la prueba de IFI en las poblaciones estudiadas se encuentran en la Tabla 1 y Figura 6.

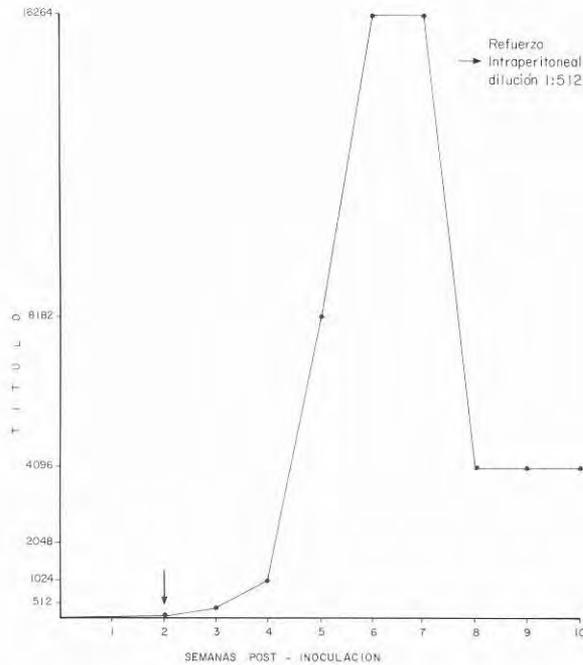


Figura 3

COMPORTAMIENTO SEROLOGICO DE CONEJO (E) INOCULADO INTRA-DEMICAMENTE CON TOXOPLASMA INACTIVADO TOXOPLASMOISIS EXPERIMENTAL

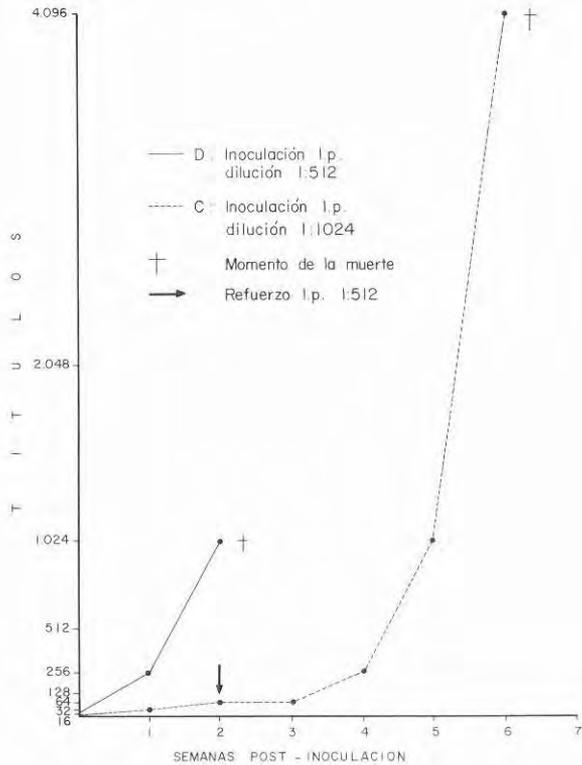


Figura 4

COMPORTAMIENTO SEROLOGICO DE CONEJOS INOCULADOS INTRAPERITONEALMENTE CON DILUCIONES DE TOXOPLASMA TOXOPLASMOISIS EXPERIMENTAL

La modificación efectuada a la técnica de obtención de Ag (4), dio como resultado exudados peritoneal de ratón con un mayor número de trofozoitos por campo y libres de células (Figura 7).

El conjugado fluorescente aIgG de conejo presentó un título de 1:320 y mostró una

INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA....

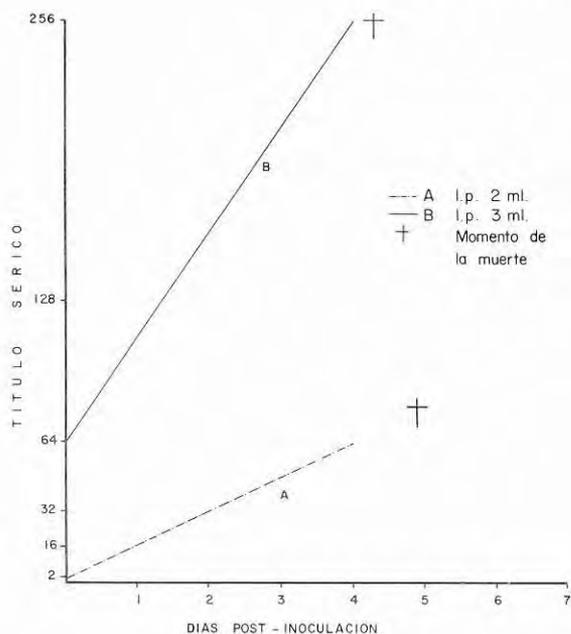


Figura 5

COMPORTAMIENTO SEROLOGICO DE CONEJOS INOCULADOS INTRA-PERITONEALMENTE CON TOXOPLASMA PURO. TOXOPLASMOSIS EXPERIMENTAL

buena especificidad para detectar ACS anti-toxoplasma, observándose una fluorescencia nítida al confrontarlos con los sueros control positivo (Figura 8) y la no fluorescencia a sueros control negativos.

DISCUSION

Al realizar pases de exudado peritoneal con *Toxoplasma* entre ratones, son altas las probabilidades de aislar trofozoitos del protozoarios acompañados de células de naturaleza inflamatoria (7). Este fenómeno se obvió mediante la inoculación de ratones con macerado de bazo de conejo infectado previamente con *Toxoplasma gondii* por vía intra peritoneal.

Paralelamente al logro de títulos serológicos positivos en conejos inoculados con *Toxoplasma*, se pudo reproducir experimentalmente la fase aguda de la toxoplasmosis, con algunas de las lesiones descritas por Manfredini (2) a nivel de peritoneo, bazo, intestino, hígado, ganglios y cerebro. (Figuras 9 a 14).

T A B L A 1

Resultados de la Evaluación Serológica por IFI para Toxoplasmosis de Conejos de Bioterio en Universidad de Caldas e Instituto Nacional de Salud,

Título	Universidad de Caldas		Instituto Nacional de Salud		T o t a l	
	Número de Sueros	%	Número de Sueros	%	Número de Sueros	%
NR*	27	37.5	12	19.35	39	29.10
1: 16	32	44.44	39	62.90	71	52.98
1: 64	11	15.27	11	17.74	22	16.41
1: 256	1	1.38	-	-	1	0.74
1:1024	1	1.38	-	-	1	0.74
T O T A L	72	100.00	62	100.00	134	100.00

\* No Reactivo.

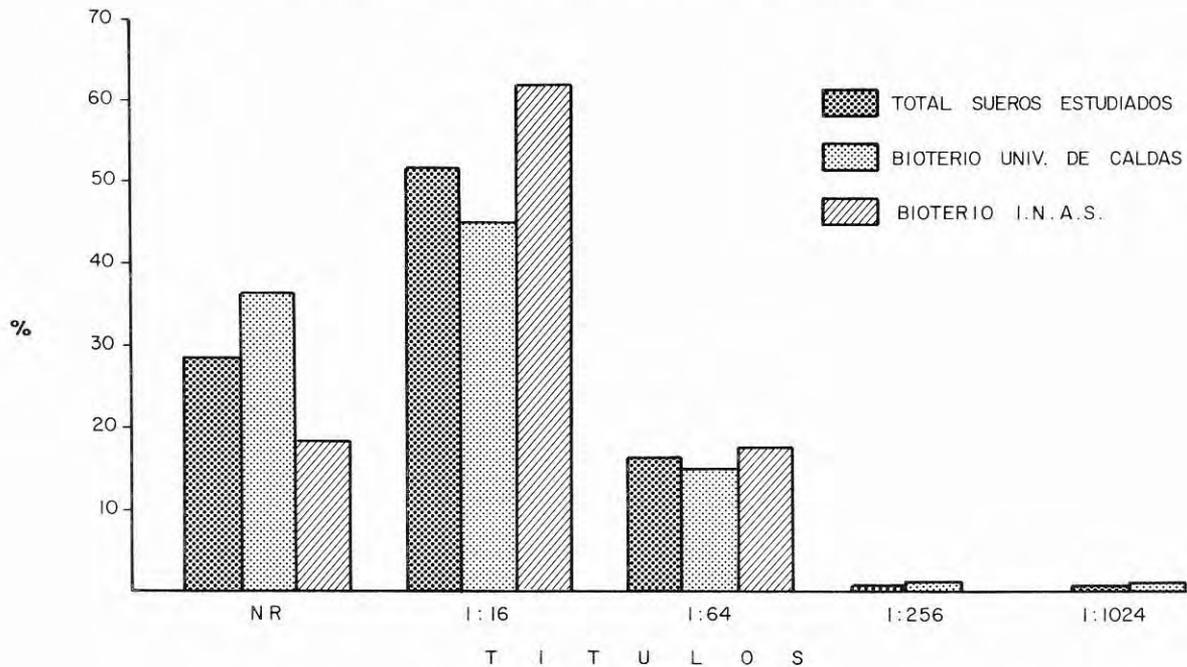


Figura 6

EVALUACION SEROLOGICA POR IFI PARA TOXOPLASMOSIS DE CONEJOS DE BIOTERIO EN U. DE CALDAS E I.N.A.S.

La interpretación de los títulos de prevalencia encontrados en el 70,87% de los sueros estudiados, que fluctuaron entre 1:16 y 1:1024, nos permite afirmar que los conejos de los Bioterios de la Universidad de Caldas e INAS, han estado en contacto con *Toxoplasma gondii*.

Aunque se notó un 18,17% de mayor prevalencia de ACS anti-toxoplasma en los conejos del Bioterio del INAS sobre los Bioterios de la Universidad de Caldas, esta diferencia no fue significativa estadísticamente a nivel del 1% según la prueba normal para diferencia de proporciones.

Sin embargo, se trató de establecer la razón de esta diferencia, mediante una evaluación serológica adicional a la explota-

ción cunícula que abastece al Bioterio del INAS. Se analizaron 20 sueros pertenecientes a conejos que se encontraban en la explotación y 42 sueros de conejos salidos de la explotación y que llevaban solo 15 días de permanencia en el Bioterio del INAS.

Los resultados como se observa en la Figura 15, permiten deducir que los conejos, en su gran mayoría, ingresan sin título serológico al Bioterio y lo adquieren dentro del mismo al contaminarse con *Toxoplasma*.

La existencia de títulos de prevalencia de ACS en los Bioterios estudiados, se debe muy probablemente al consumo de alimentos (verduras, forrajes, pastos, concentrados) contaminados con oquistes de *Toxoplasma gondii*.



Figura 11. Dilatación muy marcada de las asas del intestino grueso y delgado. Toxoplasmosis experimental.

Figura 12. Lesiones granulomatosas de color blanquecino, puntiformes, sobre la convexidad del hígado. Toxoplasmosis experimental.

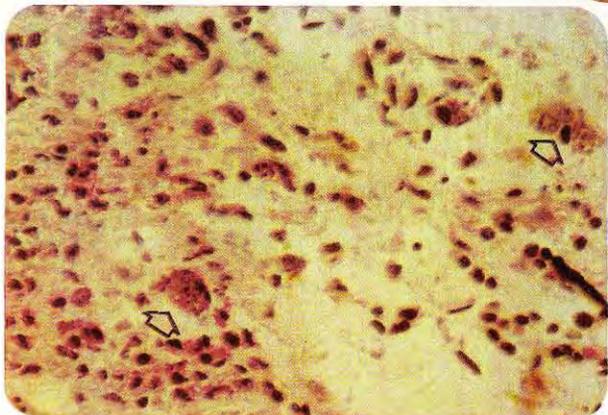
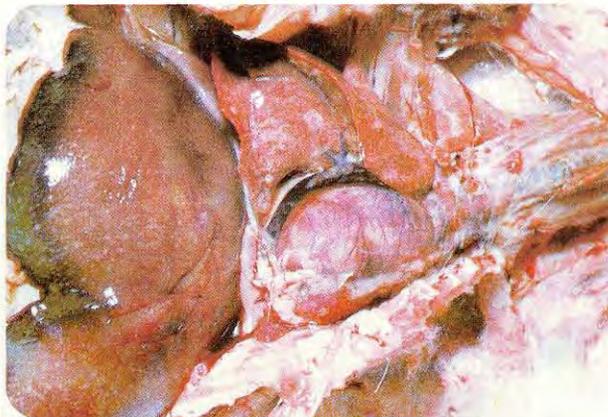


Figura 13. Quistes toxoplásmicos en ganglio linfático 100X. Toxoplasmosis experimental.

Figura 14. Quiste toxoplásmico en cerebro, 300X. Toxoplasmosis experimental.





Figura 7. *Toxoplasma gondii* en exudado peritoneal de ratón. Nótese la abundante cantidad de trofozoitos.

Figura 8. Suero control positivo. Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta Positiva para Toxoplasmosis.

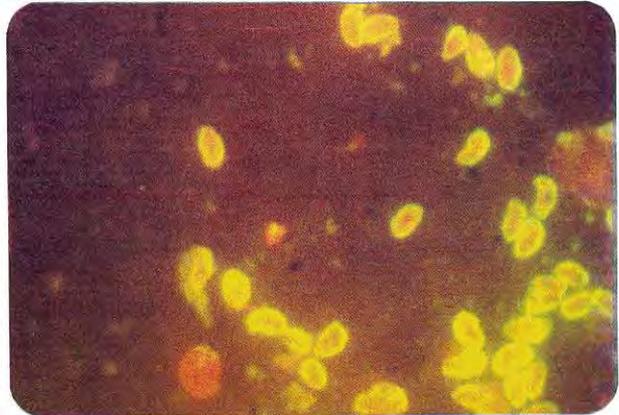
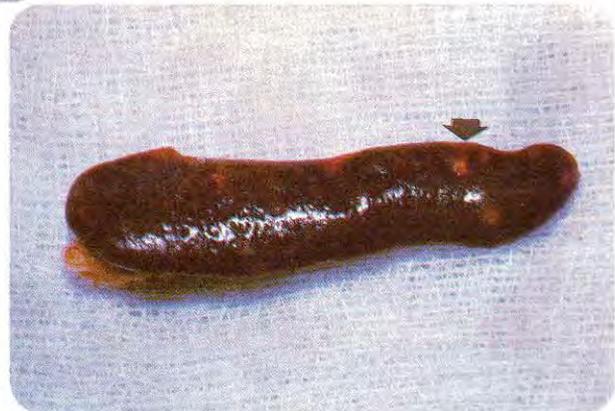
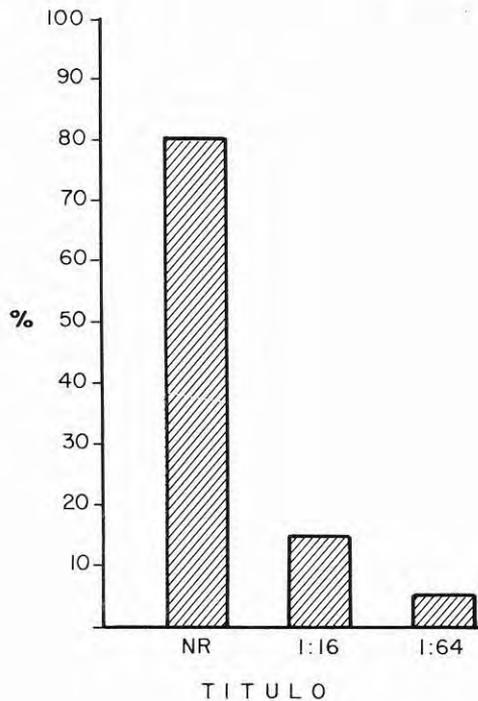


Figura 9. Absceso de peritoneo parietal en pared posterior del abdomen. Toxoplasmosis experimental.

Figura 10. Lesiones granulomatosas de color blanco-amarillento en la cara externa del bazo. Toxoplasmosis experimental.

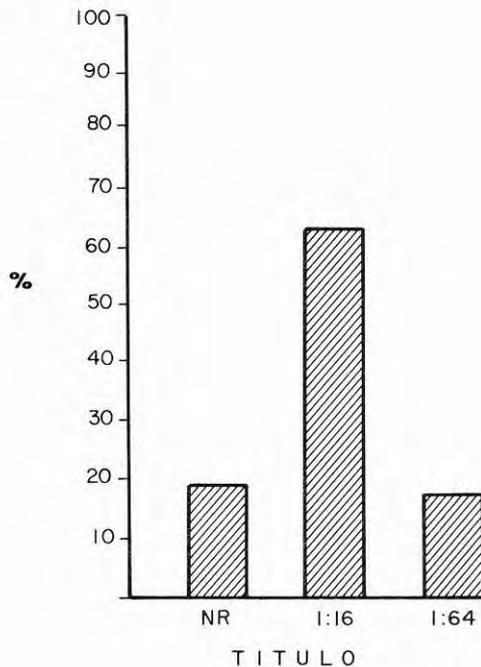


INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA....



- Figura 15 A -

**TITULO SEROLOGICO DE CONEJOS DE ABASTO EN LA EXPLOTACION (20)**



- Figura 15 B -

**TITULO SEROLOGICO DE CONEJOS DE ABASTO CON 15 DIAS DE PERMANENCIA EN I.N.A.S. (42)**

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye:

1. Se logró elaborar un conjugado fluorescente aIgG de conejo de título 1:320, con buena especificidad para detectar anticuerpos anti-*Toxoplasma* por medio de la prueba de IFI.
2. Se obtuvo un alto número de trofozoitos de *Toxoplasma* libres de células, inoculando ratones con macerado de bazo de conejo previamente infectado con *Toxoplasma*.
3. Se logró estimular la respuesta humoral en conejos inoculados intraperitoneal e intradérmicamente con *Toxoplasma* vivo e inactivado.
4. Experimentalmente se reprodujo la fase aguda de la toxoplasmosis en conejos.
5. Los conejos de Bioterios de la Universidad de Caldas e INAS han estado en contacto con el *Toxoplasma gondii* según lo revela la prevalencia de anticuerpos en un 70,87% de los conejos examinados, con títulos que en su gran mayoría fluctúan entre 1:16 y 1:64.
6. La prevalencia de anticuerpos anti-toxoplasma en estas dos poblaciones, presumiblemente se debe al consumo de alimentos (verduras, forrajes, pastos, concentrados) contaminados con oocistos de *Toxoplasma* y/o a infección congénita.
7. Las diferencias de títulos de prevalencia entre las dos poblaciones, no son estadísticamente significativas a un nivel del 1%.

### SUMMARY

It was possible to adopt and establish the indirect immunofluorescence technique in the diagnosis of rabbit-kind toxoplasmosis. Seventy two (72) rabbit's sera from the University of Caldas Biotery and sixty two (62) rabbit's sera from the INAS Biotery were studied. The findings showed prevalence titers of antibodies ranging between 1:16 and 1:1024 for the 70.87% of the population examined, which demonstrated that a high percentage of rabbits under study were in contact with *Toxoplasma gondii* and that such infection occurred through congenital infection.

No significant statistical differences were found among the results obtained from the IFI test in the populations studied to a significant level of 0.01.

### BIBLIOGRAFIA

1. Held J, Whitney R. Medicina y ciencia de los animales de laboratorio. Zoonosis. 1973; 15 (4) : 261.
2. Mandredini L. Ricerche istologiche e sierologiche su 5 focali di toxoplasmosi del coniglio. Clin. Vet. 1978; 101 (6) : 295.
3. Steinbuch M, Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. Arch. Biochem. Biophys. 1969; 134 : 279.
4. US Department of Health Education and Welfare. Serology of Toxoplasmosis. 1976; 11: 5.
5. Strannegard O. The formation of toxoplasma antibodies in rabbits. Act. Pathol. Microb. Scand. 1967; 71: 439.
6. Murray S. Estadística. McGraw-Hill Edt., 1970; pp 167-171.
7. Parra J, Verano L. Elaboración de un antígeno hemoaglutinante para toxoplasmosis y aplicación en un estudio serológico en conejos. Tesis. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional. 1978; 82 p.