

**Prevalencia de toxoplasmosis en embarazadas mediante la técnica de Elisa
Hospital “Eduardo Eguía”, Tupiza – Potosí 2007**

Esther Pacheco.

E. Pacheco.

Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca; Facultad de Ciencias Químico Farmacéuticas y Bioquímicas, Calle Dalence N° 51. Sucre- Bolivia.

M. Ramos, J. Serrudo (eds.) Ciencias de la Salud, Handbooks -©ECORFAN- Sucre, Bolivia, 2014.

Abstract

Toxoplasmosis is an infectious disease of humans and animals. It has universal distribution, whose etiologic agent is an intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. The aim of this study was to determine the prevalence of toxoplasmosis in pregnant women between 15-45 years of age attending the second half of 2007 stood at Edward Hospital. The results showed a 18.03% prevalence of toxoplasmosis in pregnant both urban and rural areas and it is a warning as there is a high risk of infection to the fetus.

11 Introducción

La Toxoplasmosis es una enfermedad infecciosa del hombre y de los animales, de distribución universal, cuyo agente etiológico es un parásito intracelular obligado, el *Toxoplasma gondii*; protozoo de la subclase Coccidia.

Fue descubierto en 1908 por Nicolle y Manceaux, en Túnez, en el roedor africano *Ctenodactylus gundi*; simultáneamente Splendore en Brasil lo encontró en un conejo de laboratorio.

La Toxoplasmosis se puede contagiar a través de varias formas:

- A través de las heces de un gato infectado, por ejemplo cuando se limpia la bandeja y se manipulan las heces con las manos directamente y sin lavarlas se llevan a la boca.
- A través de utensilios de cocina que hayan estado en contacto con carnes crudas o verduras contaminadas con ooquistes.
- Bebiendo agua contaminada con *Toxoplasma*.
- Comiendo carnes crudas, embutidos poco curados, verduras, huevos, leche, etc. Contaminados por ooquistes.
- En forma vertical de madre a hijo, es recomendable en mujeres embarazadas no cambiar la bandeja de su mascota y que otra persona se encargue de ello.
- Vía sanguínea y por transplante de órganos.

La Toxoplasmosis cuando se adquiere durante la gestación existe un alto riesgo de infección al feto, pudiendo provocar abortos o lesiones graves en el mismo como coriorretinitis, hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones cerebrales o retardos psicomotrices.

11.1 Métodos y materiales

El presente trabajo se realizó en el Hospital “Eduardo Eguía” bajo la supervisión del Doctor Luis Herman Rodríguez y la guía Metodológica de la Doctora Jenny Durán Pérez.

El tiempo de procesamiento de las muestras fue de seis meses durante las cuales se aplicaron las técnicas propuestas.

El universo que se tomó fue de doscientas treinta y tres embarazadas del municipio de Tupiza, Provincia Sud Chichas, Potosí.

Para la determinación de Toxoplasmosis se busco anticuerpo Ig G antitoxoplasma gondii para tal efecto se empleo la técnica de ELISA utilizando reactivos de la Línea Teco Diagnostic.

Pero a la vez se realizó la técnica de HAI (Hemoaglutinación indirecta) realizando diluciones hasta 1/64 con los reactivos de HAI TOXO polychaco.

Gráfico 11



11.1.1 Recolección de muestra

El procedimiento de recolección de muestra en el laboratorio del Hospital “Eduardo Eguía”.

Registro del paciente y numeración de la muestra

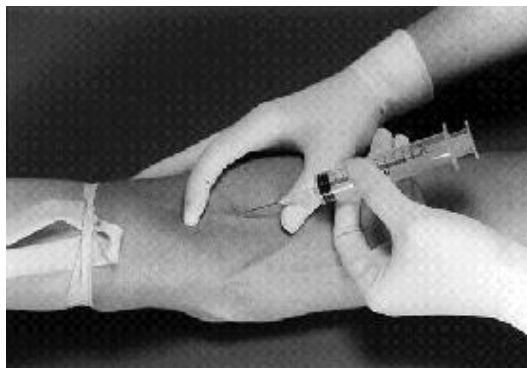
Toda embarazada fue registrada de manera inmediata en el cuaderno de toma de muestra y asignándole en ese momento el número que le corresponde.

Preparación del material de la toma de muestra

Antes de iniciar la toma de muestra se preparo el material (identificar el tubo con el numero respectivo, torunda de algodón con alcohol, torunda de algodón seco, jeringa de 3 ml (o vacutainer), torniquete, marcadores, lapicero).

Toma de muestras

Gráfico 11.1 Se obtuvo sangre por punción venosa



- Se depositó la sangre en tubo de centrifuga para que retraiga el coagulo.
- Se procedió al centrifugado de la muestra de donde se obtuvo el suero.
- El suero fue separado en otro tubo para su posterior refrigeración.

11.1.2 Prueba inmunoenzimática “ELISA”

Fundamento

Se basa en la capacidad de los materiales biológicos para fijarse a superficies de plástico como el poliestireno (fase sólida). Cuando los Antígenos unidos a la fase sólida entran en contacto con el suero del paciente, el anticuerpo específico del antígeno, si esta presente en el suero, se une al Antígeno de la fase sólida formando complejos Antígeno-Anticuerpo. El exceso de Anticuerpos se elimina mediante lavado. A continuación se añade Ig G antihumana Conjugado con peroxidasa, la cual se une a los complejos Antígeno-Anticuerpo. El exceso de conjugado se elimina mediante lavado y a continuación se añade el sustrato del suero del tetrametil bencidina (TMB). Si en el suero del paciente se encuentra presente el Anticuerpo Ig G específico del Antígeno *Toxoplasma gondii*. Cuando se detiene la reacción enzimática con HCl 1 N, en contenido de los pocillos vira a color amarillo. El color que indica la presencia de anticuerpos en el suero.

Preparación del ensayo

- Antes de su uso se extrae los reactivos del congelador y se esperó que alcancen la temperatura ambiente (21-28 °C).
- Antes de ser utilizados las muestras y controles se agitaron en vortex.
- Se realizó una dilución de 1 volumen del Buffer (20x) en 19 volúmenes de agua destilada.

Procedimiento

Antes de proceder a realizar ELISA se registro a todas las embarazadas en un cuaderno exclusivo para Elisa Toxo.

1. Se colocó al soporte el número deseado de tiras de pocillos de micro titulación. Se volvió a introducir las tiras no utilizadas en la bolsa con cierre que contiene desecante.
2. Se realizó una dilución de los sueros problemas, sueros control negativo y positivo, y calibradores 1:40(ej. 5 ul de suero en 200 ul de diluyente) en el diluyente de suero.
3. Se agregó a cada pocillo 100 ul del control negativo, control positivo, calibradores y de los sueros problema diluido. Se añadió 100 ul del diluyente para suero al pocillo del blanco de reactivo.
4. Se incubó a 37 °C por 30 minutos.
5. Se expulsó el líquido de todos los pocillos, se añadió a cada pocillo el tampón de lavado diluido, se eliminó todo el líquido y se invirtió la placa para secarla sobre papel absorbente, se repitió el procedimiento de lavado 5 veces. Tras el lavado final se secó la placa sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido de los pocillos.
6. Se agregó 100 ul de conjugado a cada pocillo incluido el pocillo del blanco de reactivo. Evitando la formación de burbujas durante la adición dado que pudo dar resultados erróneos.
7. Se incubó a 37 °C por 30 minutos.
8. Se repite el lavado como se ha descrito en el paso 5.
9. Se añadió 100 ul de solución cromógeno/sustrato a cada pocillo, incluido al pocillo del blanco de reactivo.
10. Se incubó a 37 °C por 15 minutos.
11. Se detuvo la reacción añadiendo 100 ul de solución de parada (HCl 1N) a todos los pocillos incluido al blanco de reactivo.
12. El color desarrollado se leyó en un lector de placas de ELISA equipado con un filtro de 450 nm.

Gráfico 11.2



11.1.3 Cálculo de resultados

1. Sacar una media de las lecturas de los calibradores el cual sirve como cut off.
2. Calcular una media del control positivo, control negativo.
3. Para calcular la Ig G Toxoplasma gondii se divide la lectura del suero del paciente entre el cut off.

11.1.4 Interpretación

Negativo

Menor a 0,90 indicativo que no hubo exposición con el Toxoplasma gondii (<32 UI/ml)

Intermedio

0,91 – 0,99

Positivo

Mayor a 1,00 o igual valor igual a 32 UI/ml. Indicativo que hubo exposición con el Toxoplasma gondii.

11.1.5 Prueba de hemaglutinacion indirecta

Fundamento

Los anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii*, presumiblemente presentes en el suero o de animales en estudio, aglutinan al antígeno fijado sobre la superficie de los hematíes de carnero estabilizado, los cuales sedimentan formando un manto en el fondo del pocillo de la policubeta.

En los sueros de muchas personas no parasitadas se encuentran globulinas capaces de aglutinar inespecíficamente particulares antigénicas de diferente origen, incluyendo hematíes sensibilizados o no. Estas globulinas, a las que pertenecen entre otras, los anticuerpos inespecíficos o heterófilos, la Proteína C Reactiva, etc., están presentes en una proporción significativa de la población, pudiendo aumentar durante el embarazo y en numerosos procesos infecciosos o inflamatorios.

La heterofilia es detectada estudiando cada suero en la dilución $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$ con hematíes no sensibilizados.

Con el uso de adsorbentes especiales en el diluyente de muestras, la heterofilia es poco frecuente, pero en caso de observarse puede repetirse el suero tratándolo con 2 mercaptoetanol, este agente reductor elimina la capacidad aglutinante de los anticuerpos heterófilos.

Reactivos y materiales provistos

Frasco 1

Antígeno 12 ml de suspensión estabilizada de hematíes de carnero sensibilizadas con antígenos de *Toxoplasma gondii*.

Agitar intensamente antes de usar.

Frasco 2

Diluyente de Muestras 30 ml de solución salina isotónica con adsorbentes y conservadores.

Frasco 3

Solución Proteica 1.5 ml de solución proteica estabilizada, con conservadores.

Frasco 4

Hematíes No Sensibilizados 5 ml de suspensión estabilizada de hematíes de carnero no sensibilizados, para control de heterofilia.

Agitar intensamente antes de usar.

Frasco 5

Control Positivo 0.5 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra *T. gondii*, titulado, inactivado, con conservadores, material potencialmente infectivo, listo para usar.

Frasco 6

Control Negativo 0.5 ml de una dilución de suero no reactivo para anticuerpos contra *T. gondii*, titulado, inactivado, con conservadores, material potencialmente infeccioso, listo para usar.

Cinco policubetas descartables, cada una con 96 pocillos con fondo en "U".

Estabilidad y almacenamiento

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y frascos.

Guardar los componentes del equipo preferentemente entre 2 y 8 °C, siempre en posición vertical, no congelar.

Advertencias y precauciones

- Solamente para uso diagnóstico "in vitro".
- Las muestras de sueros humanos y controles deben ser considerados como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad en su manipulación.
- Todo material utilizado en la reacción debe ser considerado contaminado debiendo ser inactivado, con NaClO al 5 % durante 30 minutos, o autoclavado durante 1 hora a 121,5°C.
- Defectos en el volumen de dispensado del control positivo ocasionados por su viscosidad, puede dar títulos diferentes al declarado, por eso es necesario extremar las precauciones en su manipulación.
- No utilizar el equipo después de la fecha de vencimiento.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Verificar que el volumen de la micropipetas o microdiluidores sea el correcto.
- No congelar el equipo, pues los hematíes se autoaglutinan (formación de partículas sólidas macroscópicas). Si esto ocurre debe descartarlo.
- Si el suero fue tratado con 2 – Mercaptoetanol verificar que el mismo no se encuentre gelificado, finalizada la incubación post tratamiento. Si melifica, tratarlo nuevamente realizando una dilución previa 1/2 con solución fisiológica.
- Sueros hiperlipémicos melifican con mas facilidad en el tratamiento con 2 – ME.

Procedimiento

1. Se colocó 25 ul del diluyente de la muestra utilizando un microgotero o una micropipeta calibrada, a partir de primer pocillo de una policubeta descartable. Se utilizo la cantidad de pocillos necesarios hasta la dilución (titulo) de las muestras y controles que desea investigar.
2. Se tomó un microdiluidor de 25 ul y se sumergió en un recipiente con agua destilada, se seco con papel de filtro por rotación y seguidamente se coloco en el suero a analizar, al retirarlo controlar que la muestra cubra la totalidad de los espacios libres.
3. Se sumergió el microdiluidor cargado en el primer pocillo y el mismo entre ambas manos no menos de 10 veces, esta operación asegurará una perfecta homogenización de la muestra.
4. Se transfirió los microdiluidores a la fila siguiente y se repite la misma operación hasta la dilución deseada.
5. Se retiró los microdiluidores y se seco con papel de filtro, sumergiendo sucesivamente en dos recipientes con agua destilada y secando con papel de filtro para usarlos nuevamente.
6. Se repite los pasos 2 a 5 con el Control Positivo y Control Negativo provistos en el equipo.

Se utilizo una micropipeta automática de 25 ul para la toma y dilución de la muestra y los controles, homogeneizando por carga y descarga, transfiriendo 25 ul de pocillo en pocillo hasta la dilución deseada, descartando los últimos 25 ul.

7. Se deposito 25 ul de hematíes no sensibilizados en los pocillos 1,2 y 3 solamente del suero, no colocando en las diluciones de los controles positivo y negativo.
8. Se deposito 25 ul del antígeno en los restantes pocillos.
9. Se agita las policubetas golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales durante no menos de 30 segundos.
10. Se dejo la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante un mínimo de dos horas y leer.

Lectura

Luego de transcurridas dos horas, proceder a la lectura en espejo para policubetas o sobre un fondo blanco. (Anexo N° 1)

Reactivo

Formación de un manto en el fondo del pocillo por aglutinación del antígeno, que debe ocupar más del 50% del mismo.

No reactivo

Formación de un botón nítido o botón con centro de luz, de bordes regulares, por sedimentación del antígeno.

Interpretación de los resultados

El título del suero será la inversa de la dilución que da lugar a un manto que ocupe 50% o más de un pocillo.

Muestras cuyos títulos sean iguales o mayores que 16, serian reactivas para anticuerpos contra el *Toxoplasma gondii* y por lo tanto presumiblemente perteneciente a pacientes parasitados.

Aproximadamente 40 – 50% de la población adulta normal presenta anticuerpos contra *T. gondii*.

Muestras cuyos títulos son menores que 16 serian no reactivas para anticuerpos contra el *T. gondii* y por lo tanto presumiblemente a pacientes no parasitados.

11.2 Resultados y discusión

Tabla 10 Número de embarazadas del área urbana y área rural laboratorio del Hospital “Eduardo Eguía”, segundo semestre del 2007

Área	Nº de embarazadas	Porcentaje
Urbana	194	83,26
Rural	39	16,74
Total	233	100,00

Gráfico 11.3

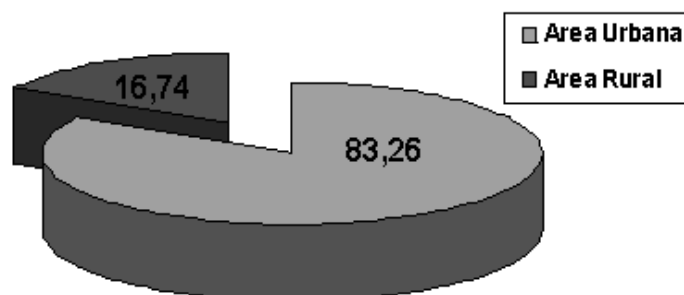


Tabla 11.1 Prevalencia de Toxoplasmosis en embarazadas Hospital "Eduardo Eguía", segundo semestre del año 2007

Casos	Nº de embarazadas	Porcentaje
Negativo	191	81,97
Positivo	42	18,03
Total	233	100,00

Gráfico 11.4 Prevalencia de toxoplasmosis en embarazadas. Hospital “Eduardo Eguia”, segundo semestre del 2007

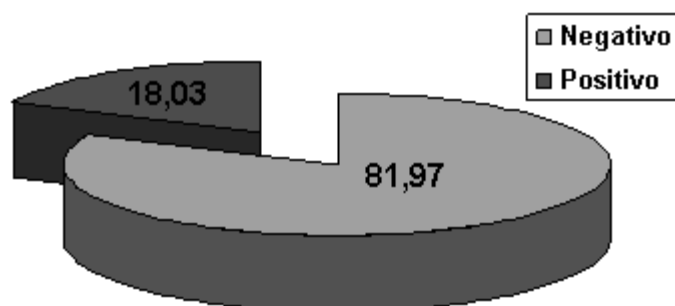


Tabla 11.2 Prevalencia de Toxoplasmosis en embarazadas del área urbana y rural Hospital "Eduardo Eguia", segundo semestre del 2007

Area	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Urbana	29	14,95	165	85,05	194
Rural	13	33,33	26	66,67	39
Total	42		191		233

Gráfico 11.4 Prevalencia de toxoplasmosis en embarazadas del área urbana y rural

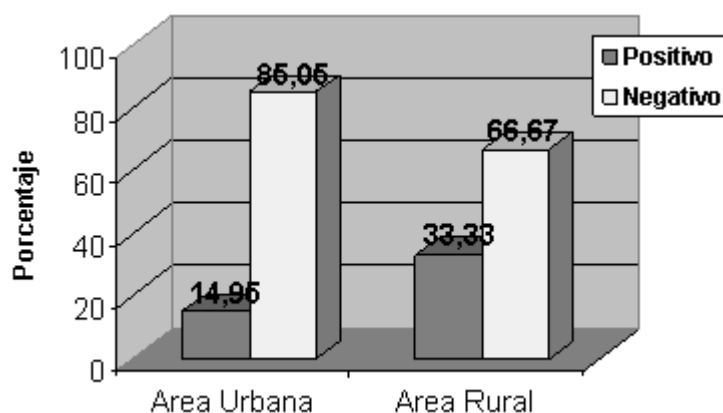


Tabla 11.3 Número de embarazadas según grupos etáreos laboratorio del Hospital “Eduardo Eguia” segundo semestre del año 2007

Grupos etareos	N° de embarazadas	Porcentaje
15 a 25 años	151	64,81
26 a 35 años	59	25,32
36 a 45 años	22	9,44
más de 46 años	1	0,43
Total	233	100,00

Gráfico 11.5 Número de embarazadas según grupos etáreos que asisten al laboratorio

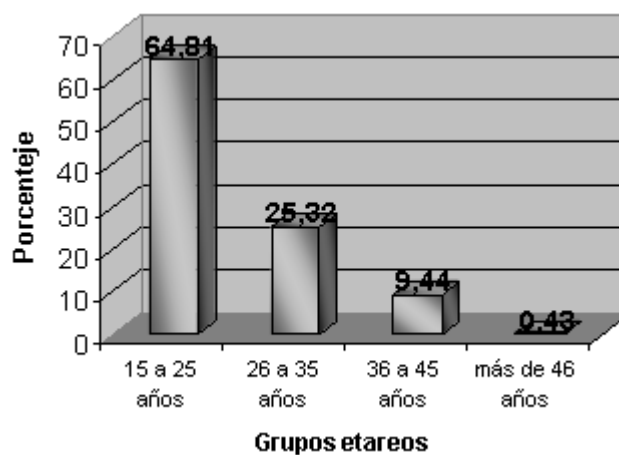
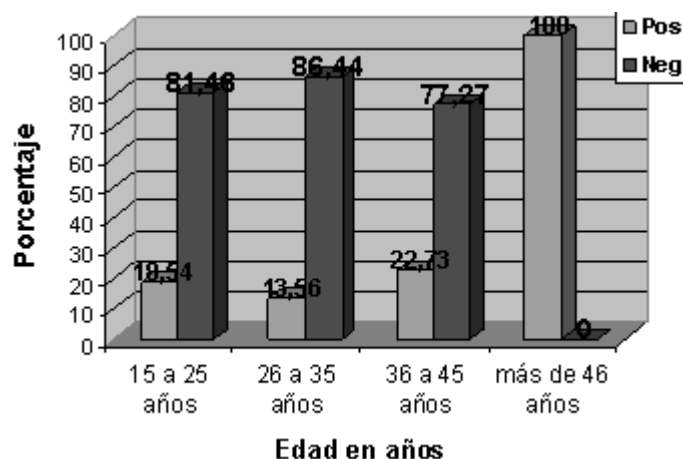


Tabla 11.4 Prevalencia de toxoplasmosis en embarazadas según grupos etáreos laboratorio del Hospital "Eduardo Eguia", segundo semestre del año 2007

Grupo etareo	Positivo		Negativo		Total
	N°	%	N°	%	
15 a 25 años	28	18,54	123	81,46	151
26 a 35 años	8	13,56	51	86,44	59
36 a 45 años	5	22,73	17	77,27	22
más de 46 años	1	100	0	0	1
Total	42		191		233

Gráfico 11.4 Prevalencia de toxoplasmosis en embarazadas según grupos etáreos Hospital “Eduardo Eguía”, segundo semestre del 2007



11.3 Conclusiones

- Se ha logrado de manera satisfactoria el objetivo general de la investigación determinando la prevalencia de Toxoplasmosis en embarazadas comprendidas entre los 15 a 45 años de edad.
- Se obtuvo el 22,73% de embarazadas con Toxoplasmosis entre las edades de 35 a 45 años; se encontró el 18,54% entre las edades de 15 a 25 años; entre los 26 a 35 años se halló el 13,56%; finalmente se presentó un sesgo del 100% de reactividad en embarazadas de más de 46 años de edad, esto se debe a que dentro de este grupo se presentó solo una embarazada.
- Se llegó a la conclusión de que existe el 14,95% de positividad para Toxoplasmosis en embarazadas del área urbana.
- Se concluye que existe un 33,33% con Toxoplasmosis en embarazadas del área rural.
- Finalmente se llega a la conclusión de que existe un 18,03% de prevalencia de Toxoplasmosis en embarazadas tanto del área urbana y rural por lo que es una señal de alerta ya que existe un alto riesgo de infección al feto.

11.4 Agradecimientos

Los investigadores agradecen a la Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología (DICYT) y a la Facultad de Ciencias tecnológicas y agrarias de la Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca por el apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo.

11.5 Referencias

Abramo Orrego Liliana y Gladis W. De Martinni- Medicina, Bs. Aires 1980

Aerhard E. 40; Medicina; Bs Aires 1980

Atías Antonio Parasitología Clínica // edición 1985

Barrouse E, 38; Medicina. Bs Aires, 1978

Bodas de Oro del Hospital “Eduardo Eguia” 1904 – 2004.

Botero David Parasitosis Humana cuarta edición 2003 editorial C.B.

Boyten S. Experimental Medicina; Londres, 1951

Cazullo Juan José, comp., biochem, phisl; Londres 1977 38.-

Cazullo Juan, Journal of Microbiology; Londres 1977

Craigg y Faust Parasitología Clínica edición 1998

De la Rosa Fraile Manuel; Microbiología - Enfermería y Ciencias de la Salud; México.

Diccionario Mosby de Medicina y Ciencias de la Salud.

Ministerio de Salud y Prevision Social. Programa de Reforma de Salud Unidad de Comunicación Social; Boletín informativo del Seguro Universal Materno Infantil; Diciembre 2002.