

**DETECCIÓN DE ADN DE TOXOPLASMA GONDII EN MUESTRAS
DE SANGRE EN UN GRUPO DE GESTANTES DE SINCELEJO,
SUCRE MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR ANIDADO
IDENTIFICANDO EL GEN B1.**

**NINA MACHADO TORRES
ELVIN MANRIQUE CARRASCAL**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2004**

**DETECCIÓN DE ADN DE TOXOPLASMA GONDII EN MUESTRAS
DE SANGRE EN UN GRUPO DE GESTANTES DE SINCELEJO,
SUCRE MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR ANIDADO
IDENTIFICANDO EL GEN B1.**

**NINA MACHADO TORRES
ELVIN MANRIQUE CARRASCAL**

**Proyecto presentado para optar al título de Biólogo con énfasis en
Biotecnología**

Director

BAYRON MANUEL RUIZ HOYOS

Codirector

PEDRO JOSÉ BLANCO TUIRÁN

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2004**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Ciudad y Fecha: _____

DEDICATORIA

A Jesús.

A mis Padres, Willman Machado y Judith Torres.

A mi Familia (Verónica, Fernando, mi abuela, Rocky y Toky).

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme regalado el don de la vida y dotarme de inteligencia y sabiduría para culminar mi carrera.

A mi Padre, por su valioso esfuerzo, sin el cual no hubiera podido salir adelante.

A mi Madre por sus sabios consejos que edificaron este largo caminar.

A mi Director, el Doctor Bayron Ruiz, que a pesar de su ausencia en la ciudad siempre nos respaldó, y a mi codirector Dr. Pedro Blanco por su apoyo.

A la ESE municipal, en especial al Doctor Misael Ibáñez, por haber facilitado la entrada a los diferentes centros de salud, para la captación de pacientes.

A los centros de salud Las Américas, San Luis y San Vicente, especialmente a los doctores Jairo Vergara, Marena Vargas y Amalfi Álvarez y a las enfermeras licenciadas Blanca y Ángela encargadas del Control Prenatal de los diferentes centros.

Al Doctor Jaime Hernández del Hospital Regional de Sincelejo, por su disposición a realizar las Amniocentesis.

Al Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, en especial a los Doctores Jhon Carlos castaño, Jorge Enrique Gómez, Maria Teresa Montoya y a la licenciada especializada en Biología Molecular Nelsy Loango, por su valioso tiempo y entrenamiento en técnicas serológicas y moleculares.

A todo el Personal Laboral del Centro de Diagnostico Médico de la Universidad de Sucre (Doctora Graciela Herrera, Edelmira, Ana Cristina, Mercedes, Yamile, Carmen, Vilma, Ruby y Nora) por su colaboración.

A mis compañeras de laboratorio (Suljei, Diargis y Matilde) por su preocupación y colaboración en materiales y reactivos de laboratorio.

A la Universidad de Sucre, por haberme formado como Profesional.

NINA MACHADO TORRES.

DEDICATORIA

A Dios.

A mis Padres.

A mi Familia.

A todos aquellos amigos que siempre han confiado en mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por dotarme de inteligencia y sabiduría para lograr mis metas durante el transcurso de mi existencia.

A mis Padres y a mi tío Vicente por su gran apoyo familiar.

A Nina Machado, por haberme soportado durante todo el desarrollo del proyecto.

Al Doctor Bayron Ruiz, por siempre creer que todo lo que se quiere hacer, se puede lograr con empeño y dedicación.

Al Doctor Pedro Blanco, por enseñarme que en la vida lo importante es lo que uno quiere alcanzar, no importando las raíces, ni los contratiempos que la vida nos imponga.

A Yamina Cumplido, por su gran espíritu de colaboración y por creer en nosotros.

A los Doctores Jhon Carlos castaño y Jorge Enrique Gómez por su gran colaboración e interés mostrado en nuestra investigación. A María Teresa Montoya y Nelsy Loango por el valioso tiempo dedicado.

A la ESE municipal y al Doctor Misael Ibáñez, por su gran colaboración en facilitarnos la entrada a los diferentes centros de salud.

Al personal de los centros de salud: Las Américas, San Luis y San Vicente, en especial a los Doctores Jairo Vergara, Marena Vargas y a las enfermeras Blanca y Ángela.

A los Doctores especialistas en Ginecología, Jaime Hernández y Guillermo Carriazo, por su disposición de colaboración, interés y tiempo hacia nosotros.

Al Personal del Centro de Diagnostico Médico de la Universidad de Sucre y a mis compañeras de laboratorio por toda la colaboración prestada.

A la Universidad de Sucre, por ser la Institución en la cual tuve el privilegio de graduarme como Profesional.

ELVIN MANRIQUE.

Sólo los graduandos son responsables de las ideas expuestas en este trabajo.
(Artículo 12, resolución 023 de 2000)

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 EL PARÁSITO	4
2.2 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA	5
2.3 EPIDEMIOLOGÍA	8
2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	10
2.5 INFECCIÓN FETAL	10
2.6 RESPUESTA INMUNE	12
2.7 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	14
2.8 DIAGNÓSTICO POR TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	19
3. ANTECEDENTES	24
3.1 LA ENFERMEDAD CONGÉNITA	25
3.2 DETECCIÓN DIRECTA POR PCR	28
4. OBJETIVOS	34
4.1 OBJETIVOS GENERALES	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. METODOLOGÍA	35
5.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO	35
5.2 PROTOCOLO DE TRABAJO	36
5.3 PRUEBAS DE LABORATORIO	36
5.4 TOMA DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS DE INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	37
5.5 PRUEBA ELFA	37
5.5.1 Determinación de IgG anti <i>Toxoplasma</i>	38
5.5.2 Determinación de IgM anti <i>Toxoplasma</i>	42
5.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL PARÁSITO	44
5.6.1 Extracción de ADN con altas concentraciones de sales	44
5.6.2 Prueba de PCR	45
5.6.2.1 PCR anidado	46
5.6.2.2 PCR convencional	49
5.7 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	50
5.8 INTERPRETACIÓN DE LOS GELES DE AGAROSA	51
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
5.10 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	51
6. RESULTADOS	53
6.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO	53
6.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	54
6.3 ESTUDIO DE INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	55
6.3.1 Estudio de inmunoglobulina G anti <i>Toxoplasma</i>	55

6.3.2 Estudio de inmunoglobulina M anti <i>Toxoplasma</i>	58
6.4 PRUEBA DE PCR	59
6.4.1 PCR anidado	59
6.4.2 PCR convencional	64
6.5 RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO	66
6.5.1 Relación entre los resultados obtenidos mediante la prueba ELFA IgG e IgM anti <i>Toxoplasma</i> frente a variables de estudio	66
6.5.2 Relación entre resultados obtenidos mediante la técnica PCR anidado frente a variables de estudio	68
6.5.3 Determinación de seroconversión en gestantes positivas por PCR anidado	69
7. DISCUSIÓN	71
8. CONCLUSIONES	75
9. RECOMENDACIONES	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía electrónica de un taquizoito intracelular	5
Figura 2. Bradizoito o quiste tisular de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 3. Ooquiste no esporulado de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figura 5. Coriorretinitis	11
Figura 6. Hidrocefalia y calcificación cerebral	12
Figura 7. Evolución de los títulos de anticuerpos IgG, IgM, IgA e IgE	14
Figura 8. Pasos de un PCR convencional	20
Figura 9. Primera y segunda ronda de amplificación de un PCR anidado	22

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Equipo Minividas, cartuchos y conos usados en el procesamiento de IgG e IgM mediante la prueba ELFA	38
Fotografía 2. Centros de salud del municipio de Sincelejo en los cuales se ubicó el estudio	53
Fotografía 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la estandarización de las concentraciones óptimas de los cebadores para el PCR anidado	61
Fotografía 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Muestras de gestantes amplificadas mediante PCR anidado	62
Fotografía 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Muestras de gestantes amplificadas en la primera ronda de amplificación del PCR anidado (fragmento amplificado de 193 pb)	63
Fotografía 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Muestra de gestante positiva mediante PCR anidado	64
Fotografía 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Gestantes positivas mediante PCR convencional	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del equipo TXG para la prueba ELFA IgG anti <i>Toxoplasma</i>	39
Tabla 2. Descripción del cartucho TXG para la prueba ELFA IgG anti <i>Toxoplasma</i>	40
Tabla 3. Umbral e interpretación de los resultados para la prueba ELFA IgG anti <i>Toxoplasma</i>	41
Tabla 4. Composición del equipo TXM para la prueba ELFA IgM anti <i>Toxoplasma</i>	42
Tabla 5. Descripción del cartucho TXM para la prueba ELFA IgM anti <i>Toxoplasma</i>	43
Tabla 6. Umbral e interpretación de los resultados para la prueba ELFA IgM anti <i>Toxoplasma</i>	44
Tabla 7. Secuencias de los cebadores usados en el PCR anidado para la amplificación del gen B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	46
Tabla 8. Mezcla de reacción usada en la primera ronda de amplificación del PCR anidado	47
Tabla 9. Mezcla de reacción usada en la segunda ronda de amplificación del PCR anidado	48
Tabla 10. Secuencias de los cebadores usados en el PCR convencional para la amplificación del gen B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	49
Tabla 11. Mezcla de reacción usada en el PCR convencional para la amplificación del gen B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	49
Tabla 12. Frecuencia de abortos previos de las 100 gestantes incluidas en el estudio	54
Tabla 13. Material presente en las viviendas de las gestantes incluidas en el estudio	54

Tabla 14. Frecuencia de la presencia de gatos en las viviendas de las gestantes incluidas en el estudio	55
Tabla 15. Frecuencia de la presencia de otros animales en las viviendas de las gestantes incluidas en el estudio	55
Tabla 16. Rangos de valores de los títulos de IgG encontrados en las gestantes, mediante la prueba ELFA	56
Tabla 17. Seroprevalencia IgG anti <i>Toxoplasma</i> de las gestantes mediante la prueba ELFA	56
Tabla 18. Frecuencia de gestantes seropositivas según grado de sospecha de infección aguda con <i>Toxoplasma gondii</i> de acuerdo con títulos IgG antitoxoplasma obtenidos mediante la prueba ELFA	57
Tabla 19. Rangos de valores de los títulos de IgM encontrados en las gestantes, mediante la prueba ELFA	58
Tabla 20. Frecuencia de gestantes positivas mediante la técnica PCR anidado	62
Tabla 21. Frecuencia de resultados seropositivos y seronegativos por la prueba ELFA IgG anti <i>Toxoplasma</i> en las 18 gestantes positivas mediante la técnica PCR anidado	68
Tabla 22. Evolución de los títulos de anticuerpos IgG anti <i>Toxoplasma</i> en las 10 gestantes positivas mediante la técnica PCR anidado	69

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Distribución de gestantes seropositivas según grado de sospecha de infección aguda con <i>Toxoplasma gondii</i>	57
Gráfica 2. Incidencia encontrada en las gestantes mediante la prueba ELFA IgM antitoxoplasma	59

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Distribución geográfica de toxoplasmosis en Colombia

Anexo 2. Formato de recolección de información

Anexo 3. Formato de consentimiento informado

Anexo 4. Mapa de Sucre, ubicación geográfica de Sincelejo

Anexo 5. Tratamiento farmacológico

Anexo 6. Epicrisis. Niña de dos meses de edad con manifestaciones clínicas de toxoplasmosis congénita.

DETECCIÓN DE ADN DE TOXOPLASMA GONDII EN MUESTRAS DE SANGRE EN UN GRUPO DE GESTANTES DE SINCELEJO – SUCRE MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR ANIDADO IDENTIFICANDO EL GEN B1.

RESUMEN

La Toxoplasmosis es una enfermedad causada por el protozooario *Toxoplasma gondii*, ampliamente difundida en animales y humanos. El ataque al adulto inmunocompetente cursa casi siempre silencioso; sin embargo, la infección adquirida durante el embarazo puede afectar al feto produciendo un amplio espectro de manifestaciones que incluyen desde aborto, hidrocefalia y ascitis hasta el nacimiento de un producto aparentemente sano que podrá presentar trastornos del desarrollo, retardo mental o coriorretinitis.

En Sincelejo, de acuerdo a población de embarazadas para el año 2.002, se calcula que se presentarían en promedio 59 a 118 casos de primoinfección por *Toxoplasma*, de los cuales 30 a 59 serían afectados por la enfermedad, y a su vez nacerían 27 a 54 niños con toxoplasmosis congénita asintomática.

En el presente estudio se incluyeron 100 gestantes que asistieron a control prenatal en tres centros de salud de la ciudad de Sincelejo, a las cuales se les realizó prueba de ELFA para IgG e IgM antitoxoplasma y PCR anidado del gen B1 del parásito, en muestras de sangre periférica.

La seroprevalencia obtenida por ELFA IgG fue del 56% y ELFA IgM del 2%, mientras que la prevalencia obtenida en la prueba de PCR anidado correspondió al 18%. Los resultados obtenidos indican que en algunas pacientes con pruebas de ELFA negativas, es posible detectar el ADN del parásito mediante PCR. Estos resultados tienen un aporte significativo, debido a que haría posible la detección del parásito en sangre en etapas tempranas de la enfermedad contribuyendo con un diagnóstico mucho más sensitivo y específico que las técnicas convencionales.

**NESTED PCR TO IDENTIFY GEN B1 FROM DNA OF TOXOPLASMA GONDII
FOUND IN BLOOD SAMPLES OF PREGNANT WOMEN IN
SINCELEJO – SUCRE.**

ABSTRACT

Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii*, a protozoan parasite widely found in animals and humans. The attack to the adult with normal immune system takes place frequently silent, however the infection acquired during pregnancy can affect the fetus presenting a wide spectrum of manifestations ranging from abortion, hidrocephalus and ascites to the birth of a seemingly healthy child which could have difficulty in development, mental retardation or chorioretinitis.

In 2002, in Sincelejo there could be about 59 – 118 cases of primary infection by toxoplasma among pregnant women from which 30 – 59 could be affected by the disease and consequently 27 – 54 children could be born with asymptomatic congenital toxoplasmosis.

This study was carried out in among 100 pregnant women who were attending prenatal control at 3 (three) health centres in Sincelejo. These women were tested with ELFA for IgG and IgM and Nested PCR of the gen B1 performed in peripheral blood samples.

Seroprevalence obtained by IgG ELFA was 56% and IgM ELFA was of the 2%, while the prevalence obtained by nested PCR was 18%. The results showed that in women negative by ELFA test, it is possible to detect DNA of the parasite by PCR.

These results have significant implications, making possible the detection of the parasite in blood in early stages of the disease, providing a diagnosis more sensitive and specific than the conventional methods.

1. INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis humana es la zoonosis más común en el mundo (1); el ataque al adulto inmunocompetente cursa casi siempre silencioso y excepcionalmente produce secuelas, sin embargo el compromiso del feto por *Toxoplasma* se puede acompañar de diversos grados de afección (dependientes de la época de gestación y el tamaño del inóculo) que van desde el aborto, hidrocefalia, hasta el nacimiento de un producto aparentemente sano, que tendrá en el futuro trastornos del desarrollo, retardo mental o coriorretinitis (2).

La prevalencia de la enfermedad es relativamente alta en la población general, reportándose tasas del 47% y 63% en publicaciones nacionales (1,3,4), e incidencia de 1 – 2% de toxoplasmosis en embarazadas (5).

Sin embargo, el riesgo de posible compromiso fetal obliga a intentar la detección temprana y certera de cada caso, que posibilite la aplicación de medidas terapéuticas adecuadas que pueden minimizar y evitar en la mayoría de los casos los devastadores efectos de la enfermedad en el feto y en el recién nacido, al tiempo que se evita el uso indiscriminado de fármacos potencialmente tóxicos.

No obstante, el feto contraerá la enfermedad en sólo el 40 – 50% de los casos nuevos (la frecuencia de compromiso fetal, en ausencia de manejo adecuado, varía del 10% en el primer trimestre a 70% en el tercer trimestre) la cual será más severa si se adquiere en épocas mas tempranas de la gestación (5).

Se calcula que de 2 a 10 de cada mil nacidos vivos en Colombia tienen toxoplasmosis congénita (adquirida durante la gestación o el parto), el 85 – 90% de ellos nace sin evidencia de compromiso clínico; sin embargo, de permanecer sin tratamiento, más del 80% desarrollarán secuelas como retraso mental, convulsiones o espasticidad, alteraciones visuales graves o trastornos auditivos (6.)

La población de embarazadas para el año 2002 en el departamento de Sucre se calculó en 22721 mujeres (DASSSALUD SUCRE), lo que significa, de acuerdo a los promedios nacionales de incidencia (1 – 2%) y paso transplacentario del parásito (50%, el cual varía con la edad gestacional), se presentarían de 227 – 454 nuevos casos de toxoplasmosis durante la gestación, 114 – 228 casos de infección congénita y el nacimiento de 103 – 206 niños asintomáticos con la enfermedad y que posteriormente desarrollarían secuelas.

En Sincelejo, con una población de embarazadas estimada en 6120 para el año 2002, se presentarían en promedio 61 – 122 nuevos casos de primoinfección por *Toxoplasma* durante la gestación, de los cuales 30 – 60 serían afectados por la enfermedad, y a su vez, nacerían 27 – 54 niños con toxoplasmosis congénita asintomática.

Estas cifras reflejan el verdadero problema de salud pública que representa la enfermedad en la región, y la necesidad prioritaria de realizar un adecuado tamizaje y detección de los nuevos casos.

El diagnóstico de la toxoplasmosis congénita se puede basar en pruebas serológicas que evidencian la presencia de inmunoglobulinas específicas IgG, IgM, IgA e IgE (7). Sin embargo, desde hace algún tiempo la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido adaptada al diagnóstico de la Toxoplasmosis con excelentes resultados (8).

Se ha reportado que la detección de ADN de *Toxoplasma gondii* mediante PCR en líquido amniótico tiene una sensibilidad mayor del 80% (8) y una especificidad que supera el 98% (9).

Sin embargo, son pocos los estudios de diagnóstico prenatal en toxoplasmosis congénita mediante PCR anidado en sangre periférica materna. El objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de madres embarazadas con presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en sangre periférica. Realizando también una correlación con los resultados obtenidos en las pruebas serológicas.

2. MARCO TEÓRICO

La toxoplasmosis es una infección parasitaria del hombre y de diversas especies de mamíferos y de aves, producida por un protozoo coccidio, *Toxoplasma gondii* (10). En humanos, cuando la infección por el parásito es adquirida por primera vez durante el embarazo, puede causar infección fetal grave y en pacientes inmunosuprimidos es una de las principales causas de muerte (10).

2.1 EL PARÁSITO

Toxoplasma gondii, agente causal de la toxoplasmosis es un parásito intracelular obligado perteneciente a:

Sub-phylum: Apicomplexa (Levine, 1972)

Clase: Sporozoa

Sub-clase: Coccidia (Leuckart, 1879)

Familia: Sarcocystidae

Género: Toxoplasma.

Este protozoario es capaz de replicarse en todas las células nucleadas. Como parásito intracelular obligado, el proceso de invasión celular es fundamental para su supervivencia y diseminación. Este es un proceso activo dirigido por el parásito y se basa en una serie de interacciones entre la membrana de superficie del parásito y las moléculas localizadas en la superficie de la célula hospedera (11).

2.2 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA

El parásito adopta diferentes formas según la fase de su desarrollo. Su nombre se deriva de la palabra griega “toxón”, por su morfología curva o de media luna.

En la infección aguda se encuentra la forma proliferativa o taquizoito, que son parásitos extraepiteliales que se multiplican rápidamente, su tamaño es de 4 – 6 micras de longitud, por 2 – 3 micras de ancho (Figura 1).

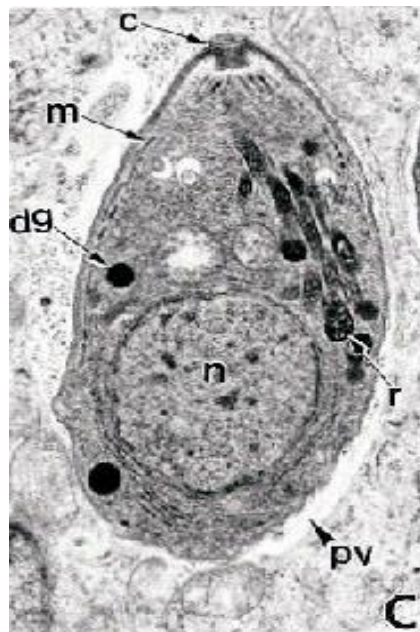


Figura 1. Microfotografía electrónica de un taquizoito intracelular. C: conoide; pv: vacuola parasitófora; r: rhoptrias; n: núcleo; m: micronema; dg: gránulos densos (Tomado de la Revista MedUNAB, No. 24; 2000)

En las infecciones crónicas los quistes son las formas predominantes, estos aparecen en el ciclo de vida del parásito inducidos por la respuesta inmunitaria del hospedero. Los quistes poseen una membrana propia y miden entre 20 y 200 micras, de forma generalmente redondeada, algunas veces alargada. En su interior se encuentran cientos de parásitos conocidos como bradizoitos, que son

los elementos extraepiteliales que se forman por multiplicación lenta, estos miden aproximadamente 7 micras de longitud por 2 micras de ancho (12) (Figura 2, 3).

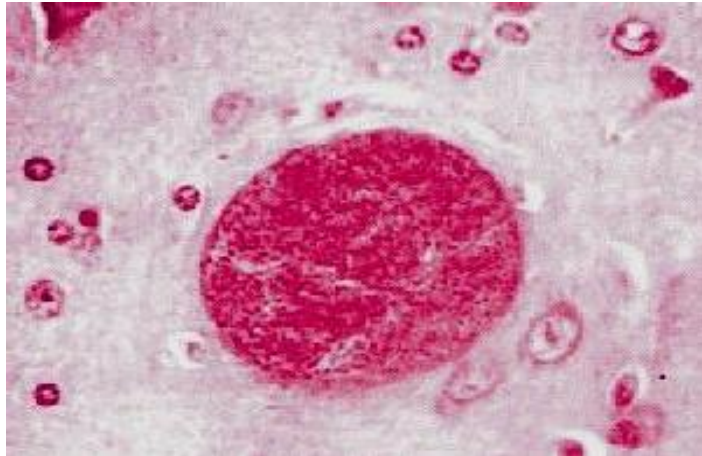


Figura 2. Bradizoito o Quiste tisular de *Toxoplasma gondii* (Tomado de la Revista Microbiología Médica, 1997; 469-71)

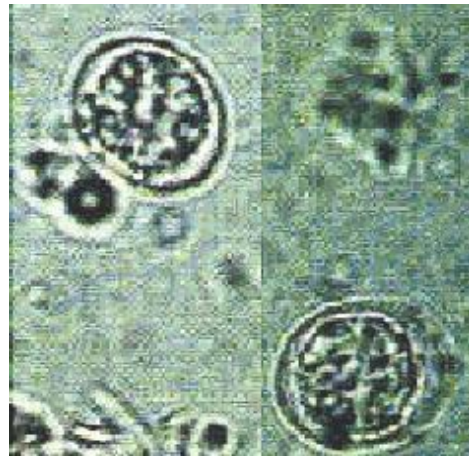


Figura 3. Ooquiste no esporulado de *Toxoplasma gondii* en heces de gato (Tomado de la Revista Parasitología Médica 1997; 265 - 79)

El ciclo de vida corresponde al de las *Coccidias*, las cuales presentan un ciclo enteroepitelial en donde aparecen formas sexuadas y asexuadas. El gato y algunos felinos son los hospederos definitivos de *Toxoplasma gondii*, en los cuales ocurre el ciclo epitelial en el intestino delgado, principalmente en el íleon.

Los taquizoitos que se encuentran en células epiteliales, se multiplican mediante esquizogonias sucesivas, con la formación de esquizontes, merozoitos y posterior aparición de macro y microgametocitos que pasan finalmente a gametos (12) (Figura 4).

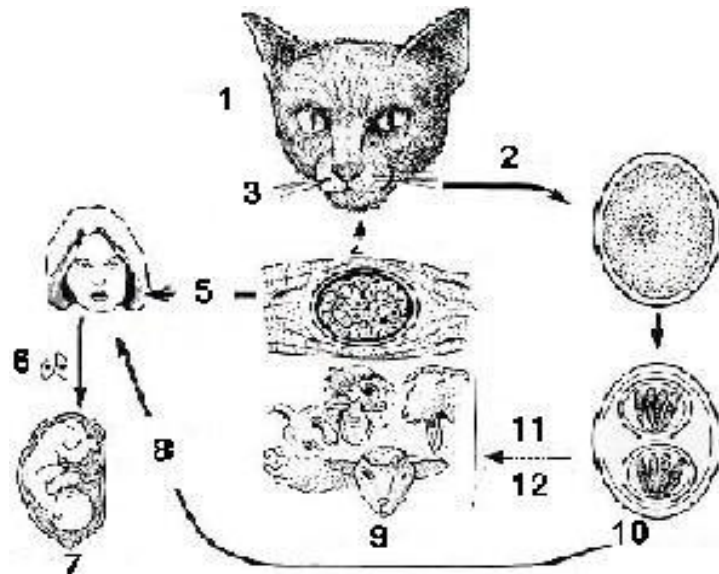


Figura 4. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. 1. Huésped definitivo (gato); 2. Ooquiste no esporulado en heces de gato; 3. Quiste ingerido por el gato; 4. Quiste en huésped intermedio; 5. Quiste ingerido por el hombre; 6. Taquizoito transmitido a través de la placenta; 7. Feto infectado; 8. Alimento y agua contaminada; 9. Huésped intermediario; 10. Ooquiste esporulado; 11. Ooquiste en agua y tierra; 12. Ingesta por huésped intermediario 3.

La fecundación del macrogameto o gameto ocurre dentro de la célula hospedera y el cigoto resultante sale al intestino recubierto por una envoltura translúcida, denominado ooquiste que es expulsado al medio ambiente con las heces del gato, estos miden de 10 – 12 micras y son casi esféricos. En el medio ambiente los ooquistes maduran en 1 – 2 días y se mantienen durante largos periodos de tiempo; en su interior se forman 2 esporoquistes, cada uno de los cuales contiene 4 esporozoitos.

Los felinos se infectan al ingerir ooquistes y después de 20 – 24 días aparecen nuevas formas infectantes del parásito (12).

En el gato y otros felinos además del ciclo enteroepitelial, también pueden coexistir invasiones extraintestinales, pues los taquizoitos se diseminan por vía linfática o sanguínea a todos los órganos en donde se forman quistes.

El hombre y más de 300 especies de mamíferos domésticos y silvestres y aproximadamente 30 especies de aves de corral y silvestres se infectan mediante la ingestión de los ooquistes procedentes de las materias fecales de gato o de las formas quísticas presentes en tejidos de otros animales, en los cuales como hospederos intermediarios ocurren invasiones extraintestinales, haciendo un ciclo incompleto (12).

2.3 EPIDEMIOLOGÍA

La toxoplasmosis es la zoonosis parasitaria más difundida en la naturaleza. Se ha demostrado en todas las latitudes, tanto en poblaciones humanas como en más de 300 especies de mamíferos domésticos y silvestres y en alrededor de 30 especies de aves. Las encuestas serológicas efectuadas en diferentes países indican una prevalencia de infección de 40 – 50%. Estas cifras varían de un lugar a otro, lo que se atribuye a factores geográficos y climáticos, a hábitos alimenticios, al tipo de trabajo, a la higiene ambiental y a la presencia de gatos infectados. La tasa de prevalencia es relativamente baja en los niños pequeños y aumenta con la edad (10).

En América latina entre el 50 – 60% de las personas entre 20 y 30 años de edad han sido infectados alguna vez en su vida (13). En Estados Unidos del 10 – 40% de los adultos tienen infección latente (14).

En Colombia según el estudio nacional de salud realizado en 1982, la prevalencia en la población general fue del 47%. Así la prevalencia más alta fue encontrada en la región de la costa Atlántica con un 63%, mientras que en la región central esta fue del 36% (15) (Anexo 1).

En el reporte de un estudio realizado en Armenia – Quindío en el año 2001 con 335 pacientes embarazadas se encontró una prevalencia de 59,8% (16). En Bogotá en un estudio similar se obtuvo una prevalencia de 47,7% (6).

Estudios epidemiológicos realizados en Cuba, permiten estimar que cada año se primoinfectan entre 500 y 600 mujeres y nacen alrededor de 250 niños infectados con este parásito (13).

En Colombia, según estudios realizados en diferentes regiones, se ha estimado que cada año aparecen 3000 nuevos casos de toxoplasmosis congénita y 2 – 10 de cada 1000 recién nacidos, nacen portando la enfermedad (6, 15).

En humanos las dos rutas principales de infección son: la oral y la congénita; en la primera, la vía de transmisión la constituye la ingestión de carnes que contienen el quiste tisular y de vegetales u otros productos alimenticios contaminados con ooquistes. En la congénita la transmisión ocurre casi exclusivamente en mujeres que adquieren la infección durante la gestación (6).

La toxoplasmosis, con morbilidad y mortalidad aparentemente bajas, no representaría un problema de salud pública, si no fuera por la transmisión

transplacentaria y las infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (10).

2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En el adulto inmunocompetente la infección transcurre en forma asintomática o con ligera sintomatología no específica. Son frecuentes los hallazgos ocasionales de anticuerpos circulantes sin que previamente hayan existido síntomas de la infección inicial (12).

La manifestación clínica más común es la linfadenopatía acompañada de fatiga y sin episodio febril o en ocasiones una febrícula, a veces acompañada de cefalea, malestar general y mialgias. Pueden estar comprometidos el hígado y el bazo, pero la hepatitis toxoplásmica es muy poco frecuente. La coriorretinitis raramente ocurre en la infección aguda, es más frecuente en la forma crónica (9).

Las manifestaciones clínicas en los recién nacidos van desde la típica tétrada de Sabin (coriorretinitis, hidrocefalia, calcificaciones cerebrales y retardo psicomotor), (Figura 5 - 6), a un cuadro clínico de tipo séptico caracterizado por fiebre, hepato y esplenomegalia, ictericia y en algunos casos miocarditis o neumonía intersticial (9).

2.5 INFECCIÓN FETAL

Dado que es frecuente la infección asintomática en humanos, es común que la mujer al llegar al embarazo haya tenido contacto con el parásito creando las defensas necesarias, por lo cual no existe en este caso riesgo para el feto (13).

Diversos estudios señalan una incidencia de comprometimiento del producto de 10 – 15% en el primer trimestre, 40% en el segundo y 60 – 70% en el tercero; a su vez la severidad del cuadro es mayor entre más temprano se presente la infección durante la gestación. Se considera que si la infección se lleva a cabo en las primeras seis semanas de la gestación, el resultado casi siempre será el aborto espontáneo; en cambio los fetos afectados en el último trimestre nacen generalmente asintomáticos pero portando la enfermedad (5, 17, 18).

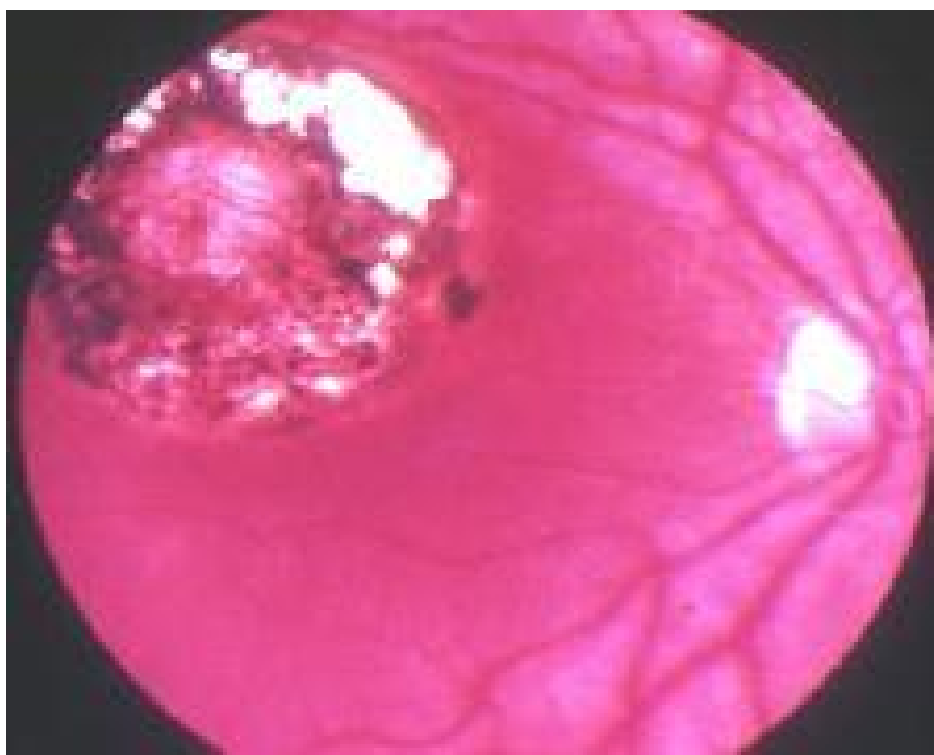


Figura 5. Coriorretinitis. (Tomado del artículo, La Toxoplasmosis: Actitud diagnóstica y terapéutica. Servicio de Microbiología I del Hospital Central de Asturias y el Departamento de Medicina de la Universidad de Oviedo. 2000).



Figura 6. Hidrocefalia y calcificación cerebral. (Tomado del artículo, La Toxoplasmosis: Actitud diagnóstica y terapéutica. Servicio de Microbiología I del Hospital Central de Asturias y el Departamento de Medicina de la Universidad de Oviedo. 2000).

Estos niños sintomáticos al nacimiento son en realidad la minoría de los afectados. En el 75% de los casos son asintomáticos al nacer y sin terapia adecuada un 75% desarrollará coriorretinitis y el 50% sufrirán daños neurológicos años o décadas después (19).

2.6 RESPUESTA INMUNE

Algunos animales presentan resistencia natural a la infección, y todos los hospederos, incluyendo al hombre, aumentan la resistencia con la edad.

Los hospederos que albergan al parásito, desarrollan gran actividad inmunitaria. Esto se logra en la infección inicial, por la activa reproducción intracelular y destrucción de las células con salida de los parásitos. A medida que se estimula la respuesta inmune, ésta induce al parásito a formar quistes en los tejidos; en este momento los taquizoitos extracelulares son lisados por la acción de los anticuerpos y el complemento. Aunque la inmunidad mediada por anticuerpos es efectiva contra el parásito, se considera más importante la inmunidad celular, ya que existe evidencia de que los linfocitos T secretan sustancias específicas que inhiben o matan los parásitos; no obstante la inmunidad mediada por células es deprimida por la acción de corticoesteroides y otros inmunosupresores (12).

La inmunidad mediada por anticuerpos se desarrolla secuencialmente a partir de la producción de diferentes inmunoglobulinas. La IgM es la primera en aparecer y fue propuesta como marcador de infección activa, su vida media oscila entre 5 días y 4 semanas, sin embargo permanece detectable entre 6 a 18 meses e incluso, dependiendo de variaciones individuales, hasta uno o dos años después de la primoinfección.

La IgG usualmente aparece 1 a 3 semanas después de adquirida la infección y alcanzan su máximo nivel 3 a 6 meses después, para luego descender y quedar en bajos niveles por el resto de la vida.

Los anticuerpos IgA aparecen 2 semanas después de la IgM y persisten de 6 a 8 meses luego de la primoinfección (dependiendo de la técnica de detección); la tasa más alta se alcanza al mes.

Los IgE son más precoces y alcanzan un nivel máximo de 15 días a 3 semanas después de la infección y tienen una regresión rápida inferior a 4 meses (9, 12, 13, 19) (Figura 7).

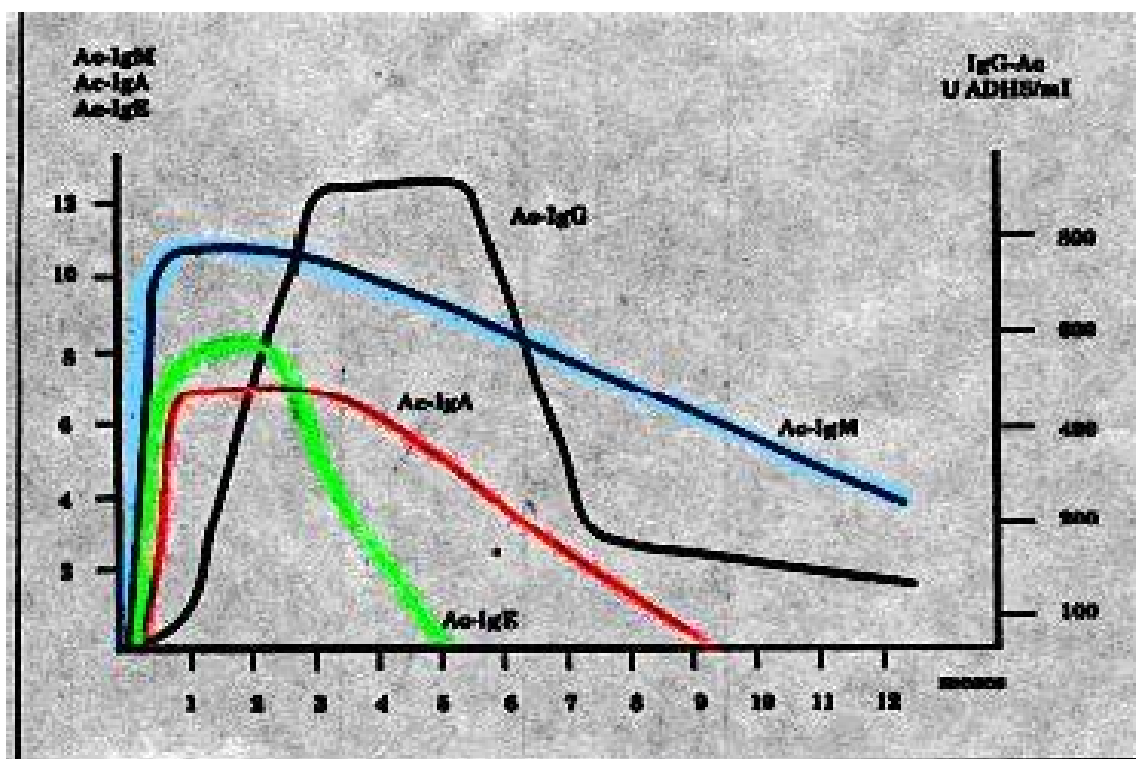


Figura 7. Evolución de los títulos de anticuerpos IgG, IgM, IgA e IgE (técnica ADHS). (Modificado de Montoya M, y otros. Acta Médica Colombiana. Vol 21, No. 3. 1996).

2.7 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

El diagnóstico se puede basar en pruebas serológicas que evidencian la presencia de inmunoglobulinas específicas IgG, IgM, IgA, e IgE. Es importante conocer la cinética de aparición de los anticuerpos y el tiempo de duración de cada isotipo de inmunoglobulinas para realizar la interpretación de las pruebas serológicas y datar

el inicio de la infección. La cinética va a depender de la técnica de detección de anticuerpos que se utilice y los métodos de fabricación del antígeno (19).

La elevación de IgG específicas para *Toxoplasma* en muestras tomadas con un intervalo de cuatro semanas puede ser utilizada como criterio diagnóstico pero tiene el inconveniente que éste se retarda.

En los casos con resultado positivo de IgG durante la gestación, es prudente tener en cuenta que internacionalmente los valores menores de 300 UI/ml han demostrado ser compatibles con infección antigua, mientras que valores iguales o mayores sugieren actividad reciente y justifican una nueva determinación de IgG e IgM, (17, 18, 19).

En estudios recientes realizados en Armenia – Quindío (datos no publicados), sugieren que un valor de ≥ 150 UI/ml en los niveles de IgG antitoxoplasma obtenido mediante técnicas serológicas, permiten considerar la posibilidad de una toxoplasmosis activa.

La detección de IgM ha sido propuesta como marcador de infección activa y se considera que una prueba negativa para IgM con IgG positiva en una gestante descarta virtualmente una infección reciente. Inicialmente se detectaba a través de la inmunofluorescencia indirecta (IFI – IgM o test de Remington); sin embargo, esta prueba carece de una buena sensibilidad debido a que su detección puede ser afectada por la presencia de altos niveles de IgG o de factor reumatoideo; solo 10 a 25% de las toxoplasmosis agudas son positivas por esta técnica (19).

Más adelante se propuso la estrategia EIA por inmunocaptura, la cual detecta la IgM desde la primera o segunda semana de infección lo cual ha mejorado notablemente la sensibilidad (19).

La aparición de pruebas positivas IgG e IgM en el muestreo inicial no son diagnósticas “per se” de infección reciente. Estas deben confirmarse con un nuevo examen en paralelo (comparando al mismo tiempo la muestra inicial y la segunda), con tres o cuatro semanas de diferencia; el resultado debe mostrar un incremento en cuatro diluciones o más, antes de tomar la decisión de realizar procedimientos diagnósticos más invasivos o iniciar tratamiento antibiótico (6).

Buscando otros marcadores serológicos que posibiliten el diagnóstico de una infección aguda desde la primera muestra, se propuso la determinación de IgA e IgE, las cuales tienen una duración más corta en circulación y permiten ser utilizadas en el diagnóstico de infección reciente (19).

Las pruebas para los anticuerpos IgA anti *Toxoplasma* han demostrado ser de gran utilidad para el diagnóstico precoz en recién nacidos con la forma congénita de la infección; de otro lado, la presencia de IgA contra *Toxoplasma gondii* también se ha reportado en pacientes adultos con infección adquirida reciente (2, 19).

Los métodos mas utilizados para la determinación de IgA anti *Toxoplasma* son las técnicas ELISA e ISAGA, esta última se basa en el método de inmunocaptura empleando como antígeno una suspensión de taquizoitos enteros de *Toxoplasma gondii* en formol (2).

Un diagnóstico muy probable de infección reciente o activa es sugerido por la presencia simultanea de IgG, IgM, IgA e IgE específicas contra *Toxoplasma gondii*, todas positivas.

En la actualidad se cuenta con la técnica de avidez de IgG que permite diferenciar una infección aguda o primaria de una crónica. En los dos primeros meses de una infección, el hospedero responde con la producción de anticuerpos de la clase IgG de baja afinidad, la cual aumenta a medida que transcurre el tiempo de infección. Esta técnica es una adaptación de la prueba ELISA IgG para medir la avidez del anticuerpo y se basa en que los anticuerpos producidos durante la fase aguda de la infección tienen una menor avidez. En el caso de la toxoplasmosis aguda el índice de avidez es menor de 30 a 45%, y en el caso de la toxoplasmosis crónica el índice de avidez es mayor al 50% (19).

Otra técnica actualmente usada es la inmunocaptura (IC), la cual se basa en una separación inicial del isotipo de anticuerpos perteneciente al que se quiere 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 presencia de los anticuerpos contra el parásito se detecta por métodos inmunoenzimáticos (ELISA doble sándwich o reversa) o utilizando el principio de aglutinación (técnicas ISAGA) añadiendo el parásito formalizado entero (antígeno figurado). Con este mismo principio se pueden cuantificar anticuerpos de isotipos IgM, IgA e IgE (19).

Otro método de detección bastante útil es la técnica ELIFA la cual consiste en realizar primero una electroforesis con antígenos solubles de *Toxoplasma gondii* y

luego una filtración con anticuerpos anti IgG, IgM, IgA o IgE marcados con una enzima (fosfatasa alcalina) y que revela los arcos de precipitación obtenidos.

Esta técnica permite utilizar criterios cualitativos y cuantitativos; la asociación del método ELIFA y la técnica ISAGA – IgM da como resultado una sensibilidad y especificidad del 90% en los casos congénitos (19).

La técnica de Western Blott ha sido evaluada como método diagnóstico para toxoplasmosis congénita y es de utilidad para comparar anticuerpos maternos, así mismo determinar si estos anticuerpos son transmitidos por la madre o sintetizados por el feto.

Esta técnica se fundamenta en una reacción inmunológica secundaria ya que presenta la formación de un complejo primario antígeno – anticuerpo sobre una tira de nitrocelulosa que contiene antígenos parasitarios separados por electroforesis según su peso molecular. La revelación de la reacción se hace con un anticuerpo secundario marcado con una enzima. Es una técnica cualitativa que puede llegar a ser cuantitativa al leer por densitometría la intensidad de las bandas (19).

2.8 DIAGNÓSTICO POR TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

La detección directa del parásito puede ofrecer un criterio adicional a los criterios serológicos y es muy útil en casos particulares en los cuales debido a la inmadurez o a la alteración del sistema inmunitario, hay una producción insuficiente de anticuerpos (19).

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido adaptada al diagnóstico de la toxoplasmosis utilizando como blancos de amplificación genes únicos (p30) o repetidos como el gen B1, la secuencia TGR1E(20), o el ADNr 18S del ADN del *Toxoplasma gondii* (21, 22).

La característica fundamental de la PCR es su capacidad de hacer gran cantidad de copias de un fragmento de ADN, que posteriormente puede ser analizado mediante procesos comunes de laboratorio. Para obtener las copias, se utilizan oligonucleótidos sintéticos (cebadores) que se unen de forma específica con el ADN diana, a partir de los cuales se sintetizan nuevas cadenas de ADN mediante la acción de una polimerasa termoestable. La amplificación del ADN sigue una curva exponencial debido a ciclos repetidos de aumento y disminución de la temperatura, que permiten la separación de las cadenas de ADN formadas, la unión de los cebadores a estas cadenas y la síntesis del nuevo ADN (23) (Figura 8).

Para la toxoplasmosis congénita, el parásito puede detectarse en diferentes tipos de muestras: líquido amniótico, sangre fetal, placenta o sangre de cordón umbilical. En la toxoplasmosis de los pacientes inmunosuprimidos, a partir de sangre, médula ósea, LCR, lavado bronco alveolar o de biopsia cerebral (17).

Una de las grandes ventajas de la PCR es su extrema sensibilidad, que permite la detección a partir de un solo parásito que equivale a 0.05-0.02 picogramos de ADN (23). El esporozoito de *Toxoplasma gondii* contiene aproximadamente 0.1 picogramos de ADN; este es el ADN contenido en todos los estados del parásito excepto en el cigoto que es diploide (24).

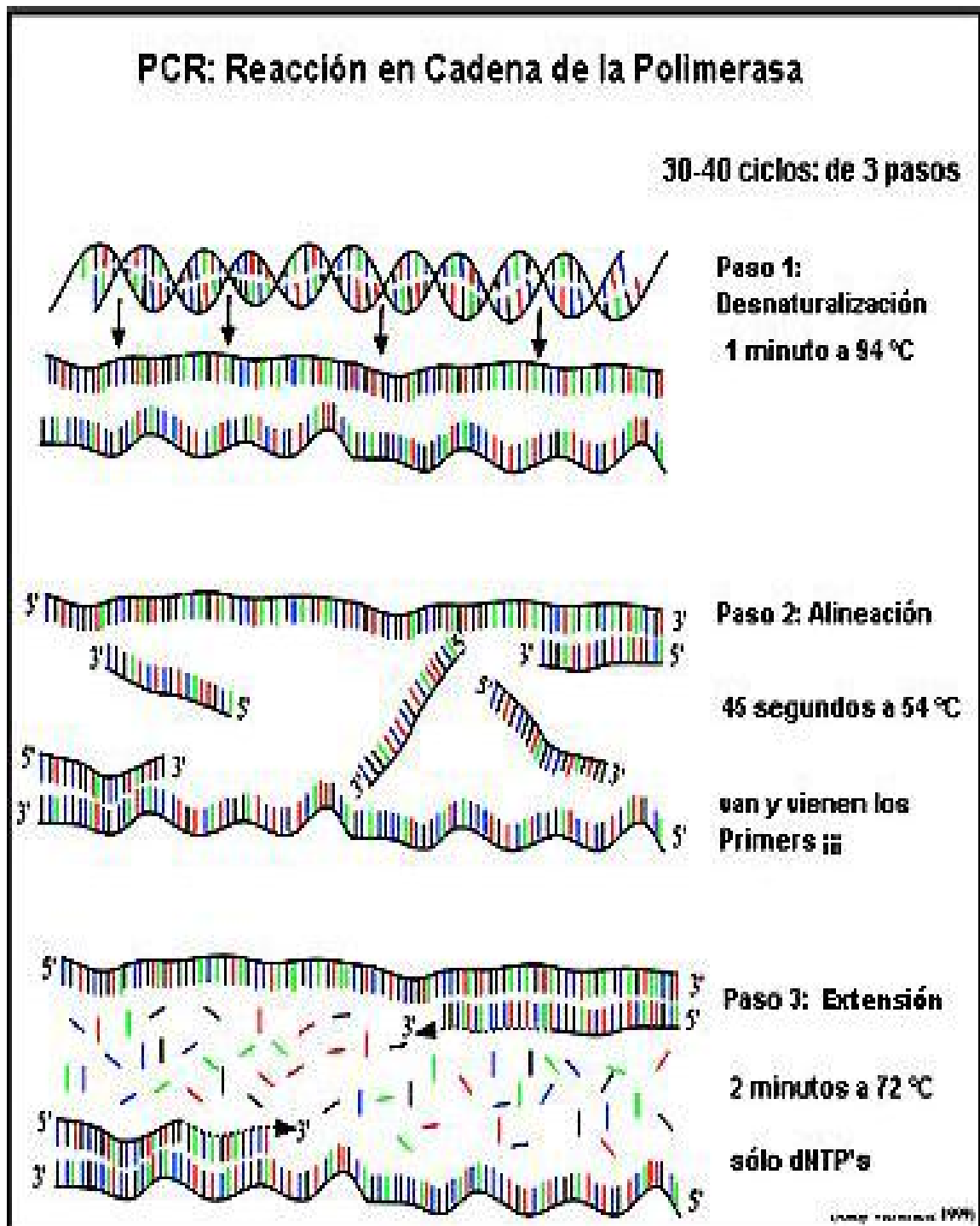


Figura 8. Pasos de un PCR convencional.

Esta gran capacidad de detección crea la necesidad de utilizar estrictos protocolos para impedir resultados falsos positivos(25, 26).

La técnica de PCR en el diagnóstico de la toxoplasmosis aporta un progreso indiscutible en aquellos casos donde los exámenes clínicos y serológicos son inoperantes, así como una mayor rapidez para realizar el diagnóstico, dando resultados en 24 horas (26).

En el trabajo reciente de Hohlfeld y otros (27) en París, en 2632 mujeres con infección adquirida durante el embarazo se encontró una sensibilidad de 97.4% para el diagnóstico de infección fetal con la realización de la PCR en muestras de líquido amniótico, lo cual la coloca en un rango muy superior frente a los métodos convencionales (inoculación de líquido amniótico y sangre fetal en ratón, Identificación de IgM específica en sangre fetal), cuya sensibilidad no llega sino hasta 89.5%.

En casos de madres con toxoplasmosis activa, el diagnóstico prenatal se puede realizar por medio de amniocentesis a partir de la semana 20 de gestación con detección del ADN del parásito por PCR e inoculación en ratón. Si se obtienen resultados positivos a partir de estas pruebas se confirma una infección fetal; en caso de resultados negativos la vigilancia inmunológica se continúa luego del nacimiento en el segundo, tercero, sexto y noveno mes de vida para descartar la infección congénita. La PCR en líquido amniótico tiene una sensibilidad de 80 - 90% y el cultivo de ratón de 50 - 60%. La combinación de las 2 técnicas eleva la sensibilidad de detección de 90 a 95% (19).

Existen variantes de la PCR clásica, cuyo uso está en aumento tanto en la experimentación como en el diagnóstico clínico rutinario. Estas variantes incluyen: PCR anidado (Figura 9), RT-PCR, PCR múltiple y PCR en tiempo real.

PCR Anidado

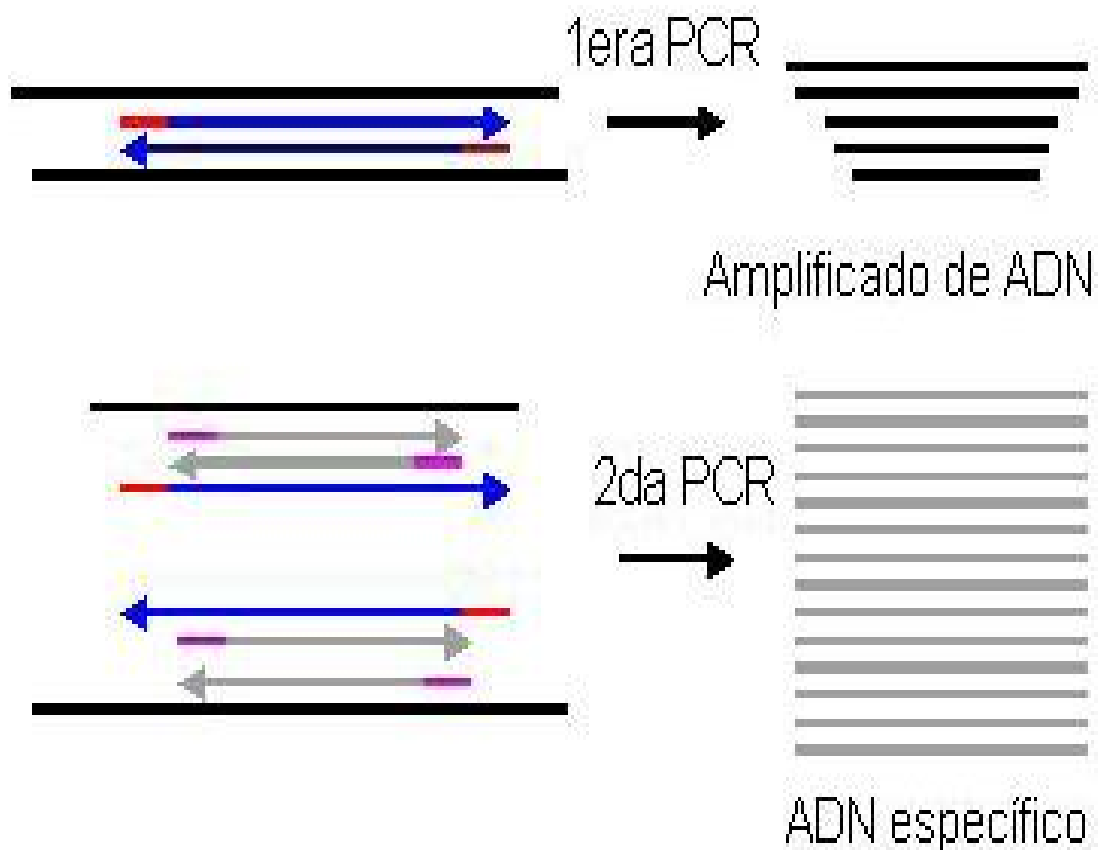


Figura 9. Primera y segunda ronda de amplificación en un PCR Anidado.

El PCR anidado permite que el ADN amplificado en una primera reacción, pueda ser reamplificado en una segunda, usando nuevos primers que hibriden con una

zona interna de la secuencia amplificada. Mediante el PCR anidado se mejora tanto la especificidad como la sensibilidad de la técnica, aunque existe un gran peligro de contaminación accidental con ADN amplificado en la primera reacción (23).

3. ANTECEDENTES

La toxoplasmosis es una infección producida por un esporozoario del grupo de los coccideos, *Toxoplasma gondii*, el cual fue descubierto por Nicolle y Maceaux en el año de 1909 en el Gondi un roedor del norte de África (28).

Avances recientes en el conocimiento del ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* han dilucidado muchos interrogantes sobre la transmisión y la epidemiología de la toxoplasmosis. En 1970, se demostró al gato como hospedero definitivo del toxoplasma, donde éste realiza un ciclo sexual en el epitelio del intestino delgado y da origen a ooquistes que se eliminan por las materias fecales, quedando establecidas dos fases en el ciclo del parásito: la fase exoentérica (*Toxoplasma*) y la fase entérica (*Isospora*) (28).

Desde que se reconoció el *Toxoplasma* como un coccideo y al gato y otros felinos como los hospederos definitivos del parásito, se clarificó mucho sobre los mecanismos de transmisión (28).

Los ooquistes del *Toxoplasma*, millones de los cuales pueden estar en una simple defecación de un animal infectado, sobreviven por periodos largos (meses) en el medio ambiente húmedo, agua o suelo, permitiendo la infección en una gran variedad de animales y del hombre.

Mientras la transmisión por carnivorismo se conoce hace varios años, la producida por ooquistes vino a dilucidar la transmisión en ausencia de carnivorismo (28).

La presencia de ooquistes depende de la presencia de gatos y posiblemente de otros felinos. Los ooquistes persisten en el suelo húmedo pero mueren por la desecación y el congelamiento. La frecuencia de transmisión por alimentos de animales infectados y por ooquistes provenientes de heces de gato probablemente varía con el área, la temperatura, la humedad y las costumbres de la población. Los hábitos culturales como las costumbres de comer carnes crudas de animales que han estado en contacto con gatos, favorece la transmisión por carnivorismo (28).

Algunas especies de hospederos son genéticamente más resistentes a los efectos de la infección primaria con la misma cepa de *Toxoplasma*. Esto se presenta también en el hombre, ya que la madre presenta un alto grado de resistencia natural mientras que el feto es más susceptible.

La inmunidad adquirida depende de la interacción de factores celulares y de los anticuerpos (28).

3.1 LA ENFERMEDAD CONGÉNITA

La infección congénita puede ser asintomática, o presentar signos de enfermedad benigna. Las formas severas pueden presentarse en forma generalizada o pueden afectar solamente el sistema nervioso central (S.N.C.). Se ha demostrado que la infección ataca primero las vísceras causando hepatitis, neumonía y extendiéndose más tarde al S.N.C. (28).

Otras manifestaciones de la toxoplasmosis congénita son la microcefalia, las calcificaciones cerebrales y la coriorretinitis.

El signo más común de la toxoplasmosis congénita es la coriorretinitis con o sin compromiso del S.N.C.

En 1961, se propuso un mecanismo de patogenicidad de la coriorretinitis usando como modelo la infección experimental del Hamster con *Besnoitia Jellisoni*, parásito semejante al *Toxoplasma*.

Los niños con infección asintomática en el momento del nacimiento, pueden desarrollar coriorretinitis años después (28).

Stanton y Pikerton en 1953, informaron del nacimiento de un niño totalmente sano, de una madre que durante el embarazo tuvo una toxoplasmosis ganglionar que permitió el aislamiento del parásito a partir del ganglio linfático (28).

Lorber y Bassi en 1965, encontraron 4 casos de hidrocefalia causada por toxoplasmosis congénita en 310 niños con hidrocefalia no atribuida a espina bífida (28).

En la toxoplasmosis congénita, la ruta de infección es transplacentaria. Demonts y Couvrer en 1974, recobraron toxoplasmas del 25% de las placentas de madres que adquirieron la infección durante el embarazo y solamente pudieron recuperar toxoplasma en el 2% de las placentas de madres que adquirieron la infección en fechas no determinadas antes del embarazo, determinando que cuando el parásito fue encontrado en la placenta, el 95% de los niños se encontraron infectados, mientras que en los niños provenientes de madres en las que *Toxoplasma* no se encontró en la placenta, solamente un 1% se encontró infectado (28).

Con relación al aborto por toxoplasmosis, trabajos realizados, Milton y Jacob (1960), Remington y Cavonaugh (1971), García (1968) y Kimboll, Kean, Fuchs

(1971); demuestran que éste se puede presentar en mujeres que adquieren la infección tempranamente durante el embarazo, pero ninguno evidencia la existencia de aborto a repetición por *Toxoplasma* (28).

En Colombia *Toxoplasma* fue informado por primera vez en el año de 1944 por el doctor Gabriel Toro Mejía quien lo encontró accidentalmente en Cobayos en el curso de su estudio sobre Rickettsias. Posteriormente la toxoplasmosis humana fue reconocida y diagnosticada en el país por varios autores de los que se destacan los trabajos de Patiño Camargo, David Botero, Velásquez D., Marcos Restrepo y Luz E. Mejía. Estos trabajos muestran que la prevalencia de títulos de anticuerpos contra toxoplasma en la población colombiana es similar a la de otros países y fluctúa para la edad adulta entre el 39% y 49% de la población (28).

El primer reporte Nacional sobre toxoplasmosis adquirida durante el embarazo tuvo lugar en 1976 en Medellín con una muestra de 120 gestantes mediante la prueba del colorante, donde se encontró una tasa de seroconversión de 8.3% (IC 95% 3.36 – 13.23), inusualmente altas si se compara con otros estudios a nivel mundial (3).

Luego en 1988 los mismos investigadores con la técnica de inmunofluorescencia indirecta para IgG (IFI – IgG) encontraron una tasa de seroconversión del 1.7% (IC 95%: 0.9 – 2.5) en 960 madres (3).

En un estudio sobre una muestra representativa de todas las gestantes del Quindío (Colombia), con base en doble criterio de títulos altos y presencia de IgM y de acuerdo con una fórmula aconsejada por Ades que corrige la mayor duración de la IgM descubierta por las nuevas técnicas de inmunocaptura, se encontró una

incidencia de 1.9% (IC 95%: 1.2 – 2.8) por 100 gestantes susceptibles (seronegativas) (3).

María Teresa Montoya y colaboradores, presentaron los resultados de la evaluación de dos técnicas diferentes que miden IgA anti *Toxoplasma* como son: ISAgA IgA y ELISA IgA, para utilización como prueba de referencia en un programa de control de la toxoplasmosis materna reciente, encontrando que la prueba ISAgA IgA puede ser utilizada como confirmatoria en un laboratorio de referencia, junto con otras que buscan marcadores de infección aguda, con el fin de detectar casos de toxoplasmosis adquirida recientemente (2).

Roberts y Frenkel (29) demostró que para los Estados Unidos, los 3300 casos anuales de niños con toxoplasmosis congénita, teniendo en cuenta la diversidad de manifestaciones y secuelas y su frecuencia, provocaban costos (en el año de 1978) de 222 millones de dólares. Debemos tener en cuenta que en Colombia a partir de resultados de estudios realizados en diferentes regiones del país, se estimó que se presentan 3000 casos nuevos de toxoplasmosis congénita cada año (5); este número de casos se presenta con una población total aproximadamente 10 veces menor a la de Estados Unidos, pero con una incidencia de toxoplasmosis adquirida en el embarazo aproximadamente 10 veces mayor.

3.2 DETECCIÓN DIRECTA POR PCR

La prueba de PCR es una técnica que fue descrita por primera vez por Mullis y Cols en 1986 (9). La técnica busca amplificar rápida y fácilmente un gen o

fragmento de éste, o de cualquier segmento de ADN. Para poder llevarla a la práctica, se requiere que se conozca la secuencia a ambos lados de la región del ADN de interés y permite que la región entre ellas dos defina el sitio de amplificación. El ADN extraído se desnaturaliza por calentamiento, se alinean a las bandas sencillas dos cortas secuencias llamados cebadores, los cuales son complementarios a las bandas opuestas en ambos lados de la región blanco. La enzima ADN taq-polimerasa sintetiza una banda sencilla desde el extremo 3' de cada cebador, el ciclo entero puede ser repetido al desnaturalizar la preparación y comenzar de nuevo. El número de copias de la secuencia blanco crece exponencialmente (9).

Desde sus inicios, la técnica de la PCR comenzó a utilizarse para el diagnóstico de enfermedades infecciosas como el virus de la inmunodeficiencia tipos 1 y 2, el papilomavirus humano, el citomegalovirus, entre otros. La reacción en cadena de polimerasa para el diagnóstico prenatal de la toxoplasmosis congénita fue descrita por primera vez por Grover y otros (1990), usando como blanco de la amplificación el gen B1 del *Toxoplasma*. Desde entonces otros investigadores han publicado sus observaciones amplificando el gen P30. También se ha investigado acerca del ADN ribosomal 18S (9).

El gen B1 ha sido el más utilizado, está repetido 35 veces en el genoma de *Toxoplasma gondii*, es específico de esta especie pero su función aún se desconoce; su longitud es de 193 pares de bases, desde 1988 se ha venido trabajando con él y se han obtenido muy buenos resultados de sensibilidad y especificidad. Para la amplificación del gen B1 se han utilizado cebadores toxo

B22, toxo B23, tX2, tX4. Para evitar resultados falsos negativos se utiliza como control interno un fago modificado, el M13mp18, el cual posee en sus extremos segmentos de ADN idénticos a los sitios del gen B1 de *Toxoplasma gondii* (9).

La técnica del PCR en el diagnóstico de toxoplasmosis aporta un progreso indiscutible en aquellos casos en los que los exámenes clínicos y serológicos son inoperantes, así como una mayor rapidez para realizar el diagnóstico.

Los estudios de Johnson tuvieron resultados limitados con la detección de PCR positivo en muestra de placenta y sangre de cordón umbilical en niños no infectados, debido a la contaminación de los especímenes con sangre materna (30). En el trabajo de Hofheld y otros (27), esto se superó mediante un sistema selectivo de tampón de lisis que permitía la detección de las muestras contaminadas con sangre materna, esto explica la sensibilidad de 97,4% y el valor predictivo negativo para ese grupo de pacientes de 99.7%. Así el protocolo propuesto por este grupo permite una mejoría significativa del método y una disminución de los riesgos debido a la cordocentesis, pues estos resultados son con una sola muestra de amniocentesis.

En Alemania, Khalifa y otros (31) en un estudio de 148 pacientes inmunosuprimidos con sospecha clínica de toxoplasmosis cerebral o extracerebral evaluados por PCR, concluyeron que el examen de sangre por PCR puede ser muy útil para el diagnóstico pues la mayoría de estos casos estuvieron asociados con diseminación de los parásitos en sangre periférica.

Otros autores (32), describen un caso en el que fue posible la amplificación, en sangre y suero, de ADN específico para *Toxoplasma* varios días después de

iniciar tratamiento con pirimetamina-sulfadiazina, en un paciente con SIDA y toxoplasmosis diseminada; los resultados fueron rápidamente obtenidos permitiendo un tratamiento específico oportuno.

Cazenave y otros (21) encontraron para el diagnóstico de toxoplasmosis ocular en 65 casos, una sensibilidad de 38% por PCR y 42% utilizando el coeficiente de Witmer (relación valores de anticuerpos humor acuoso con anticuerpos en suero), sin embargo, cuando ambos criterios -PCR y Witmer- fueron utilizados, el diagnóstico se logró en 38 casos (58%) (33).

En un estudio en 23 pacientes para determinar la asociación entre resultados serológicos y PCR, se analizaron 23 muestras clínicas: incluyendo 14 sueros, 7 muestras de fluido cerebroespinal y 2 muestras de sangre de cordón umbilical, de hombres y mujeres con rangos de edad entre 3 semanas y 54 años. Encontraron que de 9 muestras positivas para anticuerpos anti *Toxoplasma* IgG e IgM, ninguna fue positiva por PCR. Esta diferencia en la correlación probablemente es debida a que *Toxoplasma gondii* es un patógeno intracelular obligado, que puede ser detectado en suero o plasma; a no ser que se esté frente a una infección severa sistémica (34).

Dupouy Jean y otros (1993), detectaron *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre mediante PCR, esto facilitó el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes con SIDA, donde cada muestra de sangre fue ensayada en 3 ocasiones diferentes detectando el gen que codifica para la proteína de superficie P30 (35).

Spalding y otros (2002), en un estudio realizado en Brasil, mediante PCR anidado detectaron ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre venosa y placenta

de 50 gestantes, con una sensibilidad mayor del 92.9% y una especificidad del 100%; demostrando que la detección de este parásito en sangre venosa facilita el diagnóstico prenatal de toxoplasmosis congénita (36).

Hohlfeld y otros, en un estudio de diagnóstico prenatal de toxoplasmosis con PCR en líquido amniótico, encontraron que fue posible demostrar la infección en 34 de 339 fetos estudiados (27).

Foudrinier y otros, encontraron que en individuos infectados con SIDA, con episodios de toxoplasmosis y sin tratamiento antiparasitario; La sensibilidad del PCR para detectar ADN de *Toxoplasma gondii*, fue de 86.6% en muestras de sangre periférica y 60% en líquido cefalorraquídeo (LCR) (37).

Mei-Hui Lin y otros (38), en un estudio realizado en Taiwán China, en 10 muestras clínicas como: líquido amniótico, sangre, fluido cerebroespinal y biopsia de tejidos, utilizando para el análisis técnicas serológicas y varias técnicas basadas en PCR e inoculación en ratón; se encontró que de todas estas técnicas, el PCR Anidado seguido por la Hibridización de productos de PCR, son los métodos más sensibles para detectar ADN toxoplásmico.

En un estudio retrospectivo de 110 casos de mujeres con seroconversión para *Toxoplasma* durante el embarazo, 94 de ellas fueron analizadas por PCR en líquido amniótico, con o sin cultivo celular e inoculación en ratón, encontrando una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico prenatal entre 81 y 100% respectivamente (39).

El diagnóstico de la toxoplasmosis ha evolucionado de manera positiva en los últimos años, gracias a las nuevas estrategias aportadas por la inmunología y la biología molecular.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la frecuencia de detección del ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre en gestantes mediante la técnica de PCR amplificando el gen B1.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la amplificación del gen B1 de *Toxoplasma gondii* mediante la técnica de PCR Anidado en muestras de sangre periférica materna.
- Establecer la incidencia y prevalencia de la infección por *Toxoplasma* en una población de gestantes de Sincelejo mediante la prueba ELFA IgG e IgM antitoxoplasma.
- Correlacionar los resultados de IgG e IgM antitoxoplasma con los resultados de la PCR en sangre.
- Correlacionar los resultados de laboratorio con los datos epidemiológicos.

5. METODOLOGÍA

En el presente estudio se incluyeron gestantes del municipio de Sincelejo que ingresaron al programa de control prenatal en los centros de salud materno infantil Las Américas, San Vicente y San Luis, en el período comprendido entre marzo de 2002 a marzo de 2003. Cada gestante debía cumplir los siguientes criterios de inclusión para el estudio, tales como: Residencia permanente en Sincelejo, asistir a control prenatal en los centros de salud seleccionados y no estar bajo tratamiento con drogas inmunosupresoras. Los datos referentes al estudio fueron colectados en un instrumento de captación de información el cual contenía datos de filiación y variables a estudiar, solicitando a cada gestante la firma de un documento de consentimiento informado (Anexo 2, 3). Se excluyeron del estudio gestantes con prueba confirmatoria de toxoplasmosis previa.

5.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El área de estudio se determinó tomando como referencia los centros de salud con mayor número de gestantes en control prenatal en el casco urbano del municipio de Sincelejo, capital del Departamento de Sucre, localizado al nordeste del país a 9° 18" latitud norte, 75° 23" latitud oeste del meridiano de Greenwich; con un clima de bosque húmedo tropical y una altura sobre el nivel del mar de 213 metros (40) (Anexo 4).

5.2 PROTOCOLO DE TRABAJO

La captación de las pacientes se realizó en los centros materno infantil Las Américas, San Vicente y San Luis de la ciudad de Sincelejo, durante un periodo de doce meses y hasta completar un número de 100 gestantes.

A Todas las gestantes incluidas en este trabajo se les realizó Investigación previa del estado serológico para *Toxoplasma*, por interrogatorio y revisión de su historia clínica.

Se solicitó en forma inmediata una muestra de sangre para el procesamiento de IgG e IgM anti*Toxoplasma* y PCR con el fin de determinar presencia de la parasitemia. Durante el procesamiento de las muestras se reservó una cantidad de suero para futuros exámenes de la misma muestra.

5.3 PRUEBAS DE LABORATORIO

El procesamiento de inmunoglobulinas G y M anti*Toxoplasma*, fué realizado en un Laboratorio Clínico de la ciudad de Sincelejo, centralizando la toma de muestras en los Centros de Salud Las Américas, San Vicente y Centro de Diagnóstico Médico de la Universidad de Sucre.

Los estudios de biología molecular fueron realizados (por los autores) en el laboratorio de investigaciones biomédicas de la Universidad de Sucre.

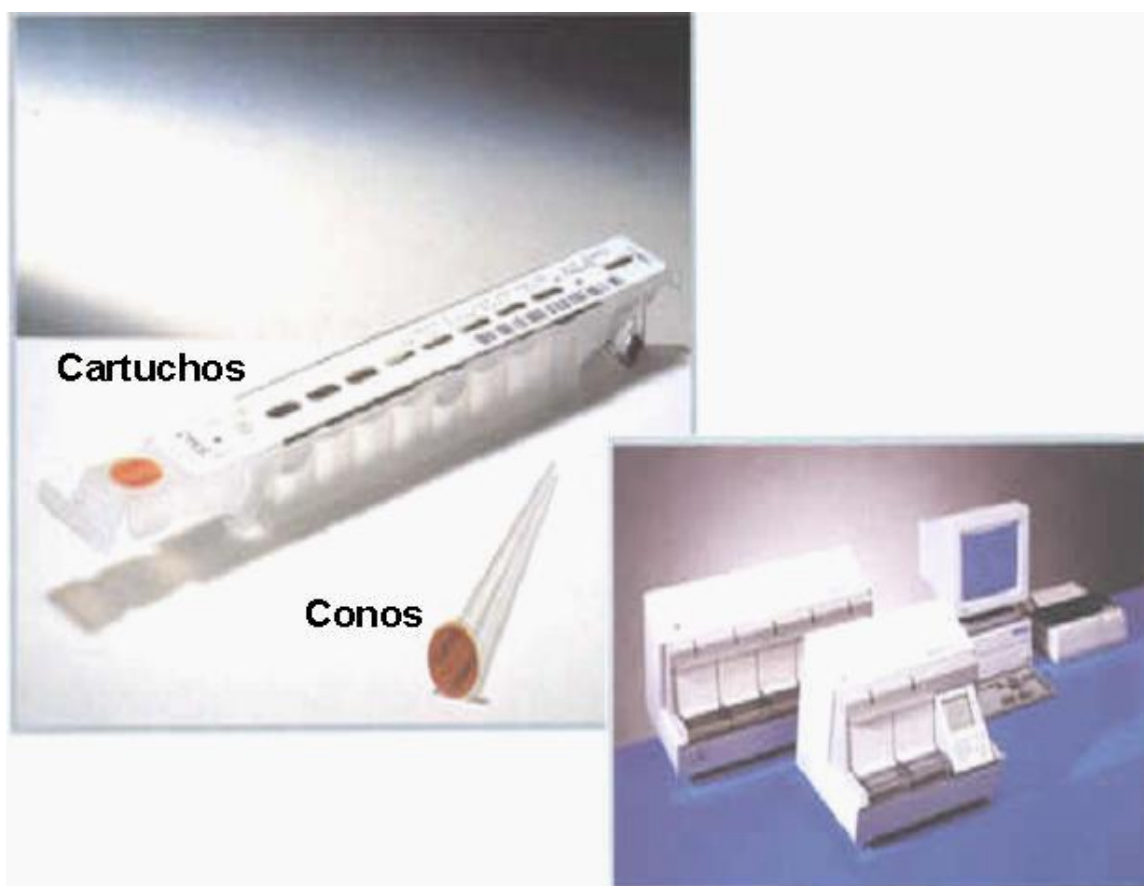
5.4 TOMA DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS DE INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Para el estudio de Inmunoglobulinas G y M anti*Toxoplasma* y PCR anidado en sangre materna, se extrajo por personal capacitado, 3 ml de sangre total por venopunción; la muestra se almacenó en un tubo Vacutainer (K3 – EDTA); utilizando 1.5 ml de la muestra de sangre para el estudio de inmunoglobulinas y 1.5 ml de muestra para el estudio de Biología Molecular.

5.5 PRUEBA ELFA

Para el procesamiento de IgG e IgM anti*Toxoplasma*, la muestra fué sometida a centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, para separar el plasma y las células sanguíneas.

Para el procesamiento de IgG e IgM anti*Toxoplasma* fue utilizado el test cuantitativo automatizado VIDAS TOXO IgG II (TXG) y VIDAS TOXO IgM (TXM), que permite la determinación cuantitativa de las IgG e IgM anti-toxoplasmicas en suero y plasma humano (heparina, EDTA) por técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) (41) (Fotografía 1).



Fotografía 1. Equipo Minividas, cartuchos y conos, usados en el procesamiento de IgG e IgM anti *Toxoplasma* mediante la prueba ELFA.

5.5.1 DETERMINACIÓN DE IgG ANTI *TOXOPLASMA*.

El principio de determinación, asocia el método inmunoenzimático sandwich en dos etapas, con una detección final por fluorescencia (ELFA).

Tabla 1. Composición del equipo TXG para la prueba ELFA IgG anti *Toxoplasma* (60 tests).

60 cartuchos TXG	Sellados para utilizar en 60 ensayos.
60 conos TXG 2 x 30	Conos sensibilizados por el antígeno toxoplásmico de membrana y citoplásmico (cepa RH Sabin).
Control positivo TXG 1 x 2 ml (líquido) C1	Suero humano con IgG antitoxoplásmicas + estabilizante proteico + azida sódica 1 g/L. Título en UI/ml.
Control negativo TXG 1 x 3 ml (líquido) C2	Suero humano negativo sin IgG antitoxoplásmicas + estabilizante proteico + azida sódica 1 g/L.
Calibrador TXG 1 x 1 ml (líquido) S1	Suero humano con IgG antitoxoplásmicas y calibrado respecto al segundo patrón de OMS + estabilizante proteico + azida sódica 1 g/L. Título en UI/ml.

Tabla 2. Descripción del cartucho TXG para la prueba ELFA IgG anti *Toxoplasma*.

POCILLO	REACTIVO
1	Pocillo de muestra.
2	Diluyente de suero: Tampón TRIS (50 mmol/L) pH 7.4 + estabilizantes proteicos y químicos + azida sódica 0.9 g/L (600 µl).
3	Tampón de prelavado: TRIS (50 mmol/L) pH 7.4 + estabilizantes proteicos y químicos + azida sódica 0.9 g/L (600 µl).
4 – 5 – 7 – 8	Tampón de lavado: TRIS (50 mmol/L) pH 7.4 + estabilizantes proteicos y químicos + azida sódica 0.9 g/L (600 µl).
6	Conjugado: Anticuerpos monoclonales anti-IgG humanas (ratón) marcados con fosfatasa alcalina + azida sódica 0.9 g/L (400 µl).
9	Diluyente de suero: Tampón TRIS (50 mmol/L) pH 7.4 + estabilizantes proteicos y químicos + azida sódica 0.9 g/L (400 µl).
10	Cubeta de lectura con sustrato: 4-Metil-umbeliferil fosfato (0.6 mmol/L) + Dietanolamina DEA (0.62 mol /L es decir 6.6%) pH 9.2 + azida sódica 1 g/L (300 µl).

El cono de uso único sirve a la vez de fase sólida y de sistema de pipeteo, todas las etapas del test son realizadas automáticamente en el sistema.

En una primera etapa la muestra es diluida, después es aspirada y expulsada del interior del cono durante un tiempo determinado. Los anticuerpos anti *Toxoplasma* IgG presentes en la muestra se fijan a los antígenos de *Toxoplasma gondii* fijados en el interior del cono. Las etapas de lavado eliminan los componentes no fijados.

Las IgG de ratón monoclonales anti-IgG humanas conjugadas con la fosfatasa alcalina son expulsadas y aspiradas del interior del cono y se van a fijar a las IgG humanas fijadas sobre la pared interna del cono.

En la etapa final de revelado, el sustrato (4-Metil-umbeliferil fosfato) es aspirado y después expulsado del cono: la enzima del conjugado cataliza la hidrólisis de este sustrato en un producto (4-Metil-umbeliferona), cuya fluorescencia es medida a 450 nm. Esto es proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra.

Finalizado el test, los resultados son analizados automáticamente por el sistema informático, el cual realiza dos lecturas de fluorescencia en la cubeta óptica para cada test. La primera lectura toma en consideración el ruido de fondo debido a la cubeta y el sustrato. La segunda lectura se realiza después de la incubación del sustrato en el cono. El cálculo del RFV es el resultado de la diferencia entre ambas lecturas y aparece en la hoja de resultados, los resultados son expresados en UI/ml (patrón OMS).

Tabla 3. Umbral e interpretación de los resultados para la prueba ELFA IgG anti *Toxoplasma*.

ÍNDICE (UI/ml)	INTERPRETACIÓN
≤ 4	Negativo
$4 \geq \text{Título} \leq 8$	Dudoso
≥ 8	Positivo

En nuestro estudio, las pacientes sospechosas de infección activa fueron seleccionadas tomando como rango resultados mayores o iguales a 170 UI/ml para IgG anti *Toxoplasma*.

5.5.2 DETERMINACIÓN DE IgM ANTI *TOXOPLASMA*.

El principio de determinación asocia el método inmunoenzimático a una detección final en fluorescencia (ELFA). Tras la inmunocaptura de las IgM del suero, las IgM antitoxoplásmicas se detectan específicamente gracias a un inmunocomplejo marcado con fosfatasa alcalina.

Tabla 4. Composición del equipo TXM para la prueba ELFA IgM anti *Toxoplasma* (60 tests).

60 cartuchos TXM	Sellados para utilizar en 60 ensayos.
60 conos TXM 2 x 30	Conos sensibilizados por anticuerpos anti-cadena μ humana (cabra) purificados por afinidad. Cada cono está identificado.
Control positivo TXM 1 x 2 ml (líquido)	Suero humano con IgM antitoxoplásmicas + azida sódica 1 g/L.
Control negativo TXM 1 x 3 ml (líquido)	Suero humano negativo sin IgM antitoxoplásmicas + azida sódica 1 g/L.
Calibrador TXM 1 x 1 ml (líquido)	Suero humano con IgM antitoxoplásmicas + azida sódica 1 g/L.

Tabla 5. Descripción del cartucho TXM para la prueba ELFA IgM anti *Toxoplasma*

POCILLO	REACTIVO
1	Pocillo de muestra.
2	Diluyente de suero: Tampón TRIS (50 mmol/L) pH 7.4 + estabilizantes proteicos y químicos + azida sódica 1 g/L (300 µl).
3	Tampón de prelavado: TRIS (50 mmol/L) pH 7.4 + estabilizantes proteicos y químicos + azida sódica 1 g/L (600 µl).
4 – 5 – 7 – 8	Tampón de lavado: TRIS (50 mmol/L) pH 7.4 + estabilizantes proteicos y químicos + azida sódica 1 g/L (600 µl).
6	Conjugado: Inmunocomplejo (antígeno toxoplásmico-anticuerpo monoclonales de ratón anti P30) marcado con fosfatasa alcalina + azida sódica 1 g/L + Gentamicina 0.02% (400 µl).
9	Pocillo vacío.
10	Cubeta de lectura: Substrato: 4-Metil-umbeliferil fosfato + azida sódica 1 g/L (300 µl).

Todas las etapas del test son realizadas automáticamente en el sistema. El cono de uso único sirve a la vez de soporte sólido y de sistema de pipeteo.

Finalizado el test, los resultados son analizados automáticamente y el índice *i* (se obtiene según la señal de fluorescencia obtenida en el suero analizado con respecto a la señal memorizada por el calibrador).

Tabla 6. Umbral e interpretación de los resultados para la prueba ELFA IgM anti *Toxoplasma*

ÍNDICE (UI/ml)	INTERPRETACIÓN
$I \leq 0.55$	Negativo
$0.55 \geq i \leq 0.65$	Dudoso
$I \geq 0.65$	Positivo

5.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL PARÁSITO

La identificación molecular del parásito se hizo mediante la técnica de PCR Anidado, utilizando como blanco de amplificación el gen B1 repetido 35 veces en el genoma de *Toxoplasma gondii*.

Para extraer ADN de las muestras de sangre de las gestantes, se ensayaron 3 técnicas diferentes de extracción de ADN, tales como: extracción de ADN orgánica, extracción de ADN en caliente, y extracción de ADN con altas concentraciones de sales; obteniendo los mejores resultados con la técnica de extracción de ADN con altas concentraciones de sales.

5.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN CON ALTAS CONCENTRACIONES DE SALES

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA: La extracción de ADN se realizó en 490 μ l de sangre total, tratada con un Buffer de lisis [Tris HCl 10 mM pH = 8.0, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%], agregando 10 μ l de Proteinasa K [2 mg/ml]. La mezcla se incubó durante 1 hora a 55 °C , con inactivación de la proteinasa K a 94 °C

durante 5 minutos y centrifugación a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Luego se extrajo el sobrenadante y se le adicionó 300 µl de Acetato de Potasio [5 M], seguido de agitación con inversión del tubo durante 10 minutos en hielo y centrifugación a 12000 rpm a 4 °C por 5 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se adicionó 700 µl de Isopropanol, agitando el tubo por inversión durante 10 minutos en hielo y centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, eliminando el sobrenadante. Al pellet se le adicionó 1 ml de Etanol al 70%, incubando durante 15 minutos. Centrifugación a 12000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. El precipitado de ADN fué secado durante 15 minutos y se le adicionó 50 µl de buffer TE filtrado (42).

5.6.2 PRUEBA DE PCR

Para incrementar la especificidad y sensibilidad del PCR se optimizó una variante de la técnica, conocida como PCR Anidado. En la cual se dirigen 2 pares de cebadores contra el gen B1 de *Toxoplasma gondii*, utilizando 1 µl del producto obtenido en la primera amplificación como molde para la etapa anidada (43).

Para evitar resultados falsos negativos se empleó como control interno positivo, ADN de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* y ADN de una muestra de sangre de una gestante positiva para IgG antitoxoplasma y positiva por PCR; control interno negativo, ADN obtenido de una muestra de sangre de una paciente seronegativa para IgG e IgM anti *Toxoplasma*, que no amplifica con los cebadores usados en el PCR anidado; y como control interno negativo adicional, un volumen de agua filtrada estéril, que tiene la función de indicar posibles contaminaciones.

Para confirmar los resultados positivos las muestras fueron procesadas de 2 – 3 veces (35); para descartar que los resultados negativos obtenidos, no fueran por la presencia de inhibidores de la PCR, se le adicionó 1µl de ADN de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* a cada una de las muestras negativas y se procesaban nuevamente mediante PCR anidado.

5.6.2.1 PCR ANIDADO

En la estandarización del PCR Anidado se ensayaron diferentes concentraciones para los cebadores [60, 40, 20 y 10 picomoles], hasta obtener bandas definidas y nítidas correspondiente al fragmento de 193 pb de la amplificación inicial y el fragmento de 96 pb esperado en la etapa anidada.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador HYBAID PCR Express utilizando los siguientes cebadores: Toxo N1, Toxo C1, Toxo N2 y Toxo C2 (36) sintetizados por Invitrogen life technologies (USA) (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias de los cebadores usados en el PCR anidado para la amplificación del gen B1 de *Toxoplasma gondii*.

Cebador	Secuencia	Longitud del cebador
Toxo N1	5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'	21 pb
Toxo C1	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'	20 pb
Toxo N2	5'-TGCATAGGTTGCCAGTCACTG – 3'	21 pb
Toxo C2	5'-GGCGACCAATCTGCGAATACACC –3'	23 pb

En la primera amplificación se emplearon los cebadores Toxo N1 y Toxo C1 cada uno a una concentración de 10 picomoles por reacción con la siguiente mezcla de reacción (Tabla 8).

Tabla 8. Mezcla de reacción usada en la primera ronda de amplificación del PCR anidado.

Reactivos	Concentración final	Cantidad (µl)
Agua filtrada estéril		11.3
Buffer de PCR	1 X	2.5
MgCl ₂	1.25 mM	2.5
DNTP's	2,5 mM	2.5
Cebador N1	10 picomoles	2
Cebador C1	10 picomoles	2
Taq Polimerasa	1 Unidad	0.2
Muestra de ADN		2
Volumen total		25

Condiciones de amplificación

Desnaturalización inicial: 94°C----2 minutos

40 ciclos con las siguientes condiciones

Desnaturalización 94°C ----- 1 minuto

Alineación 53°C ----- 1 minuto

Extensión 72°C ----- 1 minuto

Un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C.

En la segunda amplificación (anidada) se emplearon los cebadores Toxo N2 y Toxo C2 cada uno a una concentración de 20 picomoles por reacción con la siguiente mezcla de reacción (Tabla 9).

Tabla 9. Mezcla de reacción usada en la segunda ronda de amplificación del PCR anidado.

Reactivos	Concentración	Cantidad (µl)
Agua filtrada estéril		7.3
Buffer de PCR	1 X	2.5
MgCl ₂	1.25 mM	2.5
DNTP's	25 mM	2.5
Cebador N2	20 picomoles	4
Cebador C2	20 picomoles	4
Taq Polimerasa	1 Unidad	0.2
Muestra de ADN		2
Volumen total		25

Condiciones de amplificación

14 ciclos con las siguientes condiciones

Desnaturalización 94°C ----- 1 minuto

Alineación 53°C ----- 30 segundos

Extensión 72°C----- 30 segundos

Un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C.

5.6.2.2 PCR CONVENCIONAL

La identificación del parásito mediante PCR convencional con los cebadores Toxo B22 y Toxo B23 (9, 27), fue usada en muestras positivas obtenidas por PCR Anidado, con el fin de comparar la sensibilidad y especificidad del PCR convencional frente a un anidado.

El PCR convencional se realizó utilizando los siguientes cebadores y reactivos con las siguientes condiciones (Tabla 10, 11).

Tabla 10. Secuencias de los cebadores usados en el PCR convencional para la amplificación del gen B1 de *Toxoplasma gondii* (27)

Cebador	Secuencia	Longitud del cebador
Toxo B22	5'- AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA-3'	25 pb
Toxo B23	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'	21 pb

Tabla 11. Mezcla de reacción usada en el PCR convencional para la amplificación del gen B1 de *Toxoplasma gondii*.

Reactivos	Concentración	Cantidad (µl)
Agua filtrada estéril		11.3
Buffer de PCR	10 X	2.5
MgCl ₂	1.25 mM	2.5
DNTP's	25 mM	2.5
Cebador Toxo B22	20 picomoles	2
Cebador Toxo B23	20 picomoles	2
Taq Polimerasa	1 Unidad	0.2
Muestra de ADN		2
Volumen total		25

Condiciones de amplificación

Desnaturalización inicial a 95°C ----- 4 minutos

25 ciclos con las siguientes condiciones

Desnaturalización : 94°C ----- 1 minuto

Alineación: 60°C ----- 30 segundos

Extensión: 72°C -----1 minuto

Un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C (27).

5.7 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Las visualizaciones de los fragmentos fueron analizadas en una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. La preparación del gel se hizo con la disolución de la agarosa en un buffer TBE 0.5 X (Tris-HCl 0,045 M pH 8.0; Borato 0.045 M; EDTA 0.001M) utilizando un volumen de 100 ml (44).

Se usó un volumen de muestra de 12 µl, mas 3 µl de Orange G, para un volumen final de 15 µl vertidos en los pozos del gel. El corrido del gel se hizo a 95 Voltios por aproximadamente 1 hora, en un buffer TBE 0.5 X (Tris-HCl 45 mM pH 8.0; Borato 45 mM; EDTA 1 mM), que contenía 5 µg/mL de Bromuro de Etidio. El fragmento de 96 pb de la etapa anidada fué visualizado con luz ultravioleta a 254/352 nm de longitud de onda, y posteriormente fotografiado el gel con una cámara digital Canon Power Shot A 200.

5.8 INTERPRETACIÓN DE LOS GELES DE AGAROSA

Se calcularon los pesos moleculares de cada uno de los fragmentos de ADN de las muestras amplificadas a partir de los valores del marcador de bajo peso molecular de 100pb (GIBCO-BRL) mediante la gráfica distancia de migración de las bandas en centímetros versus el logaritmo de la longitud en pares de bases.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó una distribución de frecuencias para medidas de tendencia central y tablas de contingencia 2x2, mediante el Software Epi Info 2.002.

5.10 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

MANEJO DE LAS PACIENTES

1. Si la IgG y el PCR son negativos, indica que no ha habido contacto con el parásito, en dicho caso se instruye a la paciente sobre medidas preventivas (evitar comer carnes parcialmente cocidas, manipular tierra y carnes con guantes, evitar la cercanía de gatos jóvenes y sus deposiciones) y se recomienda la realización de un control trimestral de IgG.
2. Si el reporte de IgG es positivo, se procesa IgM en la misma muestra. De encontrarse una IgM y PCR positivos, se remite la paciente a manejo especializado. Si el valor de IgG inicial es igual o mayor a 170 UI /ml y se tiene una IgM positiva, se puede iniciar tratamiento farmacológico con Spiramicina (Anexo 5).

3. Cuando el reporte de IgG es positivo, pero la IgM y el PCR negativos, indica que estuvo en contacto previamente con el parásito y se recomienda control de IgG a los 30 días, si no se encuentra aumento en los títulos de IgG es probable que se trate de una reinfección lo cual no tiene riesgo para el feto porque existe inmunidad previa. La paciente se considera negativa para nuestro estudio y no se le hace seguimiento.
4. Si el reporte de IgG e IgM son positivos, pero el PCR es negativo. Se remite a manejo especializado.
5. Si el reporte de IgG e IgM son negativos y el resultado de PCR es positivo. Indica parasitemia activa, por lo tanto se remite a manejo especializado y se toma una segunda muestra antes de la semana 40 de gestación, para determinar seroconversión.
6. Todos los recién nacidos productos de madres consideradas positivas para infección por *Toxoplasma* durante el embarazo, serán sometidos a estudios de inmunoglobulinas y PCR en sangre para *Toxoplasma* y se remitirán al manejo del pediatra.

6. RESULTADOS

6.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio fué realizado en tres centros de salud materno Infantil: Las Américas, San Luis y San Vicente (Fotografía 2), del casco urbano del municipio de Sincelejo, capital del Departamento de Sucre; los cuales atienden población del régimen subsidiado y que presentan mayor asistencia de gestantes a control prenatal; se captaron para nuestro estudio 70 gestantes en el centro de salud Las Américas, 27 en el centro de salud San Vicente y 3 gestantes en el centro de salud San Luis, para un total de 100 gestantes en un período de 12 meses.



Fotografía 2. Centros de Salud del municipio de Sincelejo en los cuales se realizó el estudio; 1 - Las Américas, 2 - San Luis y 3 - San Vicente.

6.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de embarazadas presentaba un rango de edad entre los 14 y los 37 años, un rango de edad gestacional entre las 6 - 34 semanas, manifestando el 78% no tener antecedente de abortos mientras que el 22% sí; en su mayoría vivían en casas de ladrillo y cemento seguidas de bahareque en donde predominó el piso de cemento en todas las viviendas, con presencia de gatos y otros animales (perros, gallinas, loros, monos, conejos y tortugas) (Tablas 12 – 15).

Tabla 12. Frecuencia de abortos previos de las gestantes incluidas en el estudio.

ABORTOS	Frecuencia	Porcentaje
0	78	78.0%
1	18	18.0%
2	3	3.0%
3	1	1.0%
Total	100	100.0%

Tabla 13. Material presente en las viviendas de las gestantes incluidas en el estudio.

Material	Frecuencia	Porcentaje
BAHAREQUE	14	14.0%
LADRILLO CEMENTO	83	83.0%
MADERA	3	3.0%
Total	100	100.0%

Tabla 14. Frecuencia de la presencia de gatos en las viviendas de las gestantes incluidas en el estudio.

Presencia de gatos	Frecuencia	Porcentaje
Si tiene	60	60.0%
No tiene	40	40.0%
Total	100	100.0%

Tabla 15. Frecuencia de la presencia de otros animales en las viviendas de las gestantes incluidas en el estudio.

Presencia de otros Animales	Frecuencia	Porcentaje
Si tiene	56	56.0%
No tiene	44	44.0%
Total	100	100.0%

6.3 ESTUDIO DE INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

En el estudio de Inmunoglobulinas G y M antitoxoplasma mediante la prueba ELFA se encontraron dos pacientes con valores que sugirieron infección activa, lo que equivale a una incidencia del 2 %; los valores encontrados en estas dos pacientes fueron 300 y 1625 UI/ml para IgG antitoxoplasma; 0.97 y 2.35 UI/ml para IgM antitoxoplasma respectivamente.

6.3.1 ESTUDIO DE INMUNOGLOBULINA G ANTITOXOPLASMA

Los valores de Inmunoglobulina G antitoxoplasma obtenidos en la población de estudio oscilaron en un rango entre 0 – 1625 UI/ml (Tabla 16, Gráfica 1).

Tabla 16. Rangos de valores de los títulos de IgG encontrados en las gestantes, mediante la prueba ELFA.

Valores IgG (UI/ml)	Frecuencia	Porcentaje
0 – 7.9	44	44.0%
8 – 100	25	25.0%
101 – 200	15	15.0%
201 – 300	10	10.0%
301 – 1625	6	6.0%
Total	100	100.0%

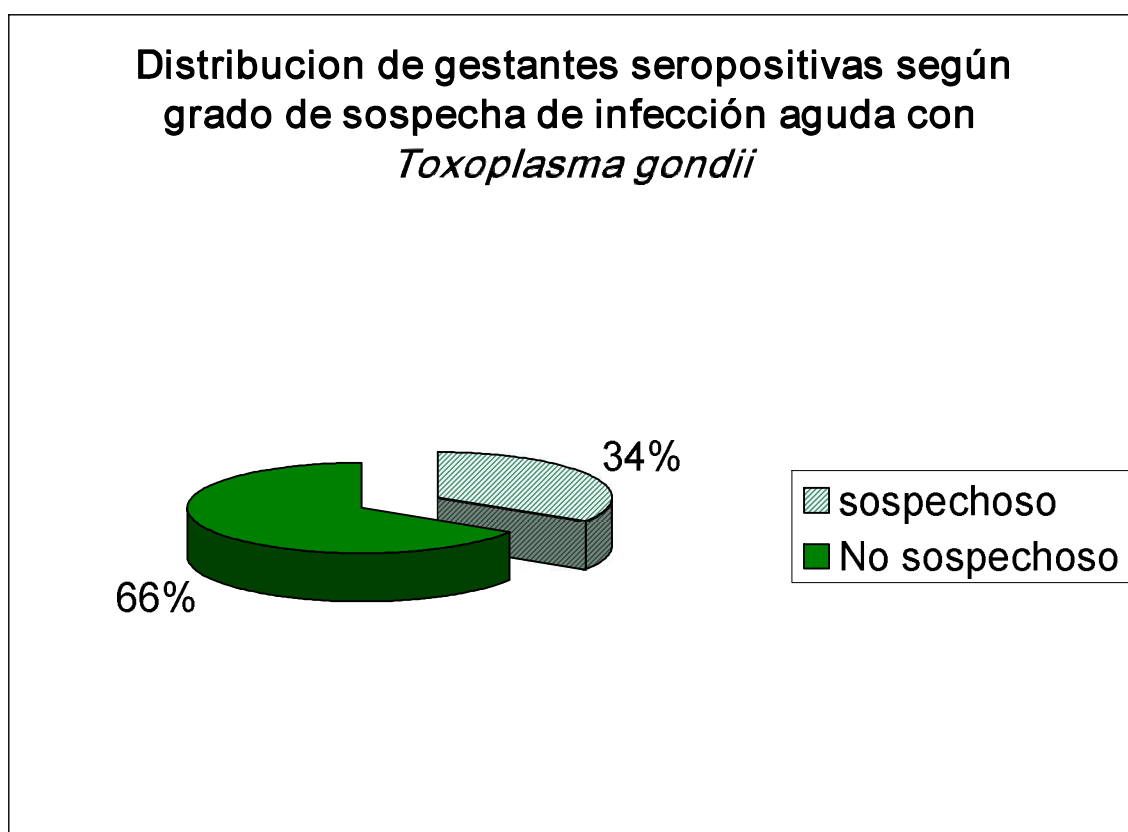
Del total de pacientes estudiadas mediante ELFA IgG, 56 presentaron valores de anticuerpos específicos mayores a 8 UI/ml, lo que corresponde a una prevalencia del 56%. De estas, 19 presentaron valores superiores a 170 UI/ml, que representan las pacientes sospechosas de infección activa con *Toxoplasma*, (Tabla 17 y 18; Gráfica 1).

Tabla 17. Seroprevalencia IgG antitoxoplasma de las gestantes, mediante la prueba ELFA.

Valores IgG (UI/ml) Punto de corte ≥ 8	Frecuencia	Porcentaje
0 – 7.9	44	44.0%
8 – 1625	56	56.0%
Total	100	100.0%

Tabla 18. Frecuencia de gestantes seropositivas según grado de sospecha de infección aguda con *Toxoplasma gondii*, de acuerdo con títulos IgG antitoxoplasma obtenidos mediante la prueba ELFA.

Valores IgG	Frecuencia	Porcentaje
Entre 8 - 169 UI/ml	37	66.0%
≥ 170 UI/ml	19	34.0%
Total	56	100.0%



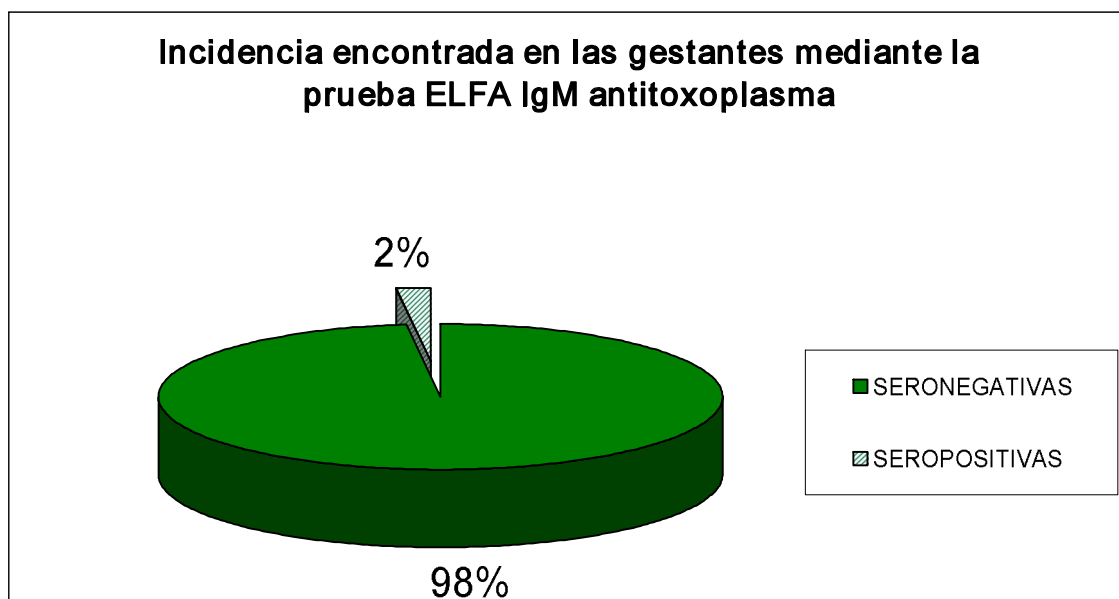
Gráfica 1. Distribución de gestantes seropositivas según grado de sospecha de infección aguda con *Toxoplasma gondii*.

6.3.2 ESTUDIO DE INMUNOGLOBULINA M ANTITOXOPLASMA

Los valores de Inmunoglobulina M antitoxoplasma obtenidos en la población de estudio oscilaron en un rango entre 0 – 2.35 UI/ml, resultando dos pacientes positivas (por encima del punto de corte usado en la prueba ELFA antitoxoplasma ≥ 0.65 UI/ml) con valores de 0.97 y 2.35 UI/ml respectivamente, lo que corresponde a una incidencia del 2% (Intervalo de confianza del 95%) (Tabla 19, Gráfica 2).

Tabla 19. Rangos de valores de los títulos de IgM encontrados en las gestantes, mediante la prueba ELFA.

Valores IgM (UI/ml) Punto de corte ≥ 0.65	Frecuencia	Porcentaje
0	72	72.0%
0.01 – 0.65	26	26.0%
0.66 – 2.35	2	2.0%
Total	100	100.0%



Gráfica 2. Incidencia encontrada en las gestantes mediante la prueba ELFA IgM antitoxoplasma.

6.4 PRUEBA DE PCR

6.4.1 PCR ANIDADO

En la estandarización de las concentraciones de los cebadores Toxo N1 y Toxo C1 para el PCR anidado, los mejores productos de la amplificación fueron obtenidos en concentraciones de 10 picomoles por reacción, obteniendo el fragmento de 193 pb, esperado en la primera ronda de amplificación.

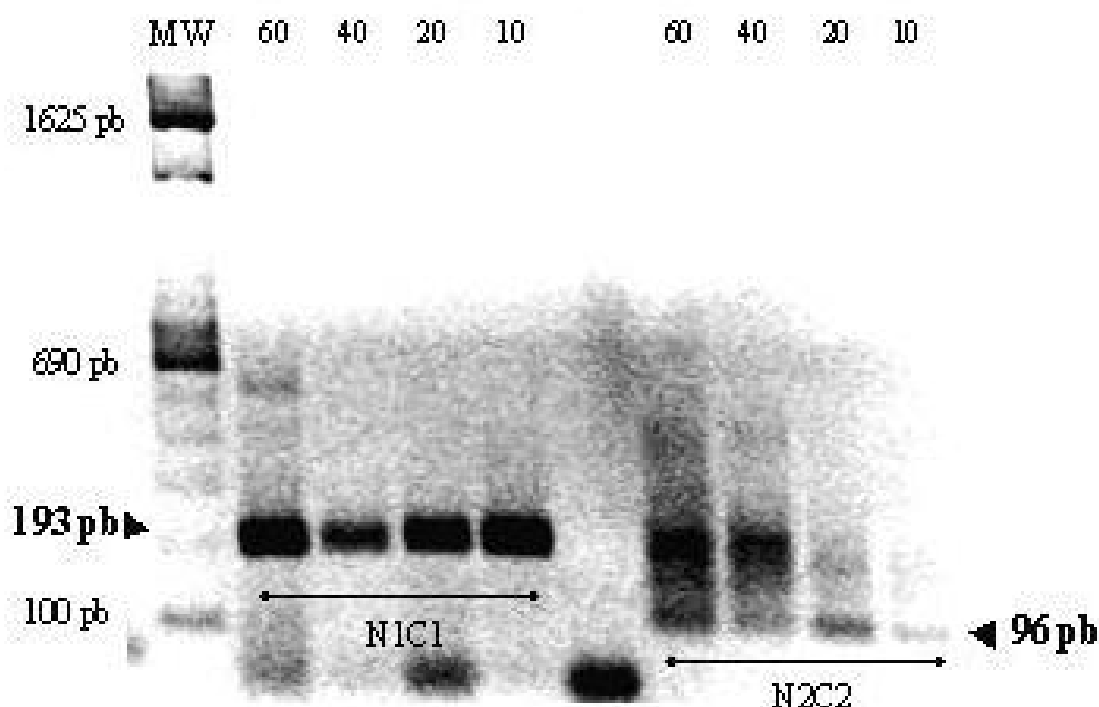
Para la etapa anidada la concentración óptima para los cebadores Toxo N2 y Toxo C2 fue de 20 picomoles por reacción, donde se obtuvo un fragmento de 96 pb, correspondiente a una banda de amplificación del gen B1 (Fotografía 3).

El proceso de amplificación del gen B1 mediante el PCR anidado fue realizado en cuatro horas y treinta minutos. Las condiciones de amplificación fueron

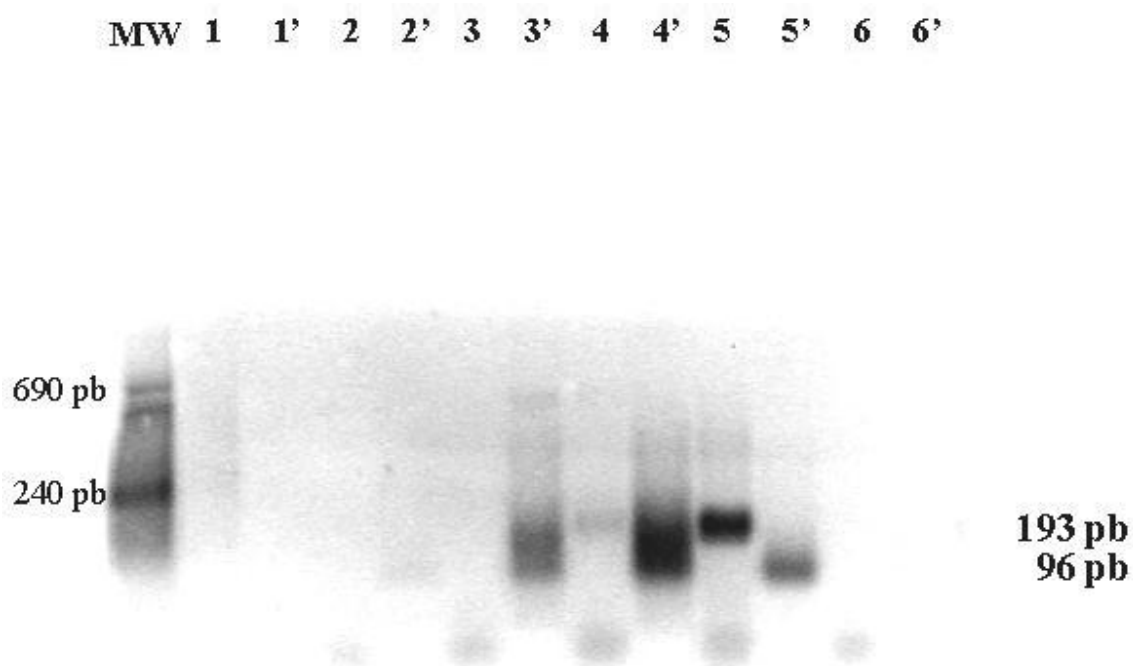
optimizadas, disminuyendo las amplificaciones inespecíficas que se originaron durante el procedimiento.

De todas las muestras (100) de sangre periférica materna procesadas mediante el PCR anidado y analizados los productos obtenidos en los geles de agarosa – TBE, fue posible detectar la presencia del ADN del parásito en 18 muestras de gestantes con un rango de edad gestacional entre las 8 y 24 semanas (Fotografía 4), por identificación del fragmento de ADN de 96 pb de *Toxoplasma gondii*, lo que equivale a una frecuencia de detección del 18%; estas 18 muestras al realizarle PCR anidado consecutivamente (2 veces) siempre fueron positivas, y los controles negativos siempre fueron negativos (Tabla 20, Fotografía 5 y 6).

ESTANDARIZACIÓN CONCENTRACIONES TOXO N1 - C1 Y TOXO N2 - C2



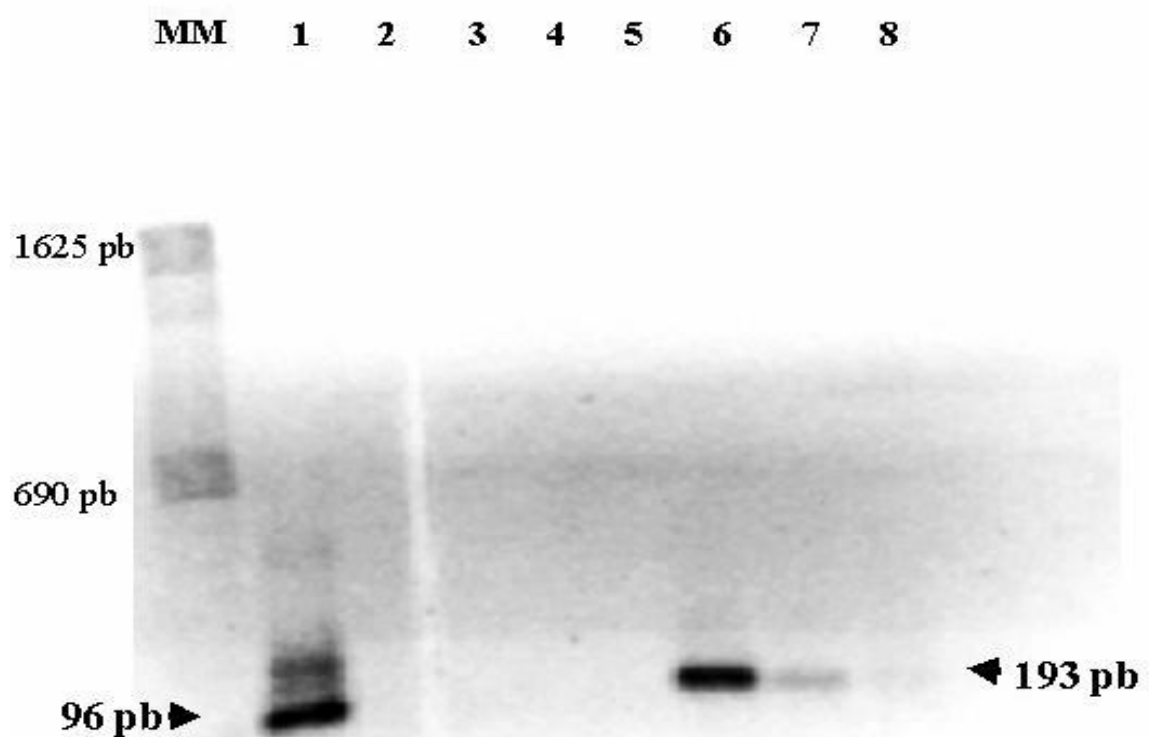
Fotografía 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio de productos de amplificación de ADN de *Toxoplasma gondii* en la estandarización de las concentraciones óptimas de los cebadores. PCR anidado utilizando los cebadores Toxo N1, C1, N2 y C2 con 1U de Taq – pol, pozo 1. Marcador molecular 100 bp Ladder; pozo 2-3-4-5. Primera ronda de amplificación, ADN de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* usado como control positivo con los cebadores N1 y C1 en concentraciones de 60, 40, 20 y 10 picomoles; pozo 6. Control negativo (agua filtrada estéril); pozo 7-8-9-10. Segunda ronda de amplificación, ADN de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* con los cebadores N2 y C2 en concentraciones de 60, 40, 20 y 10 picomoles.



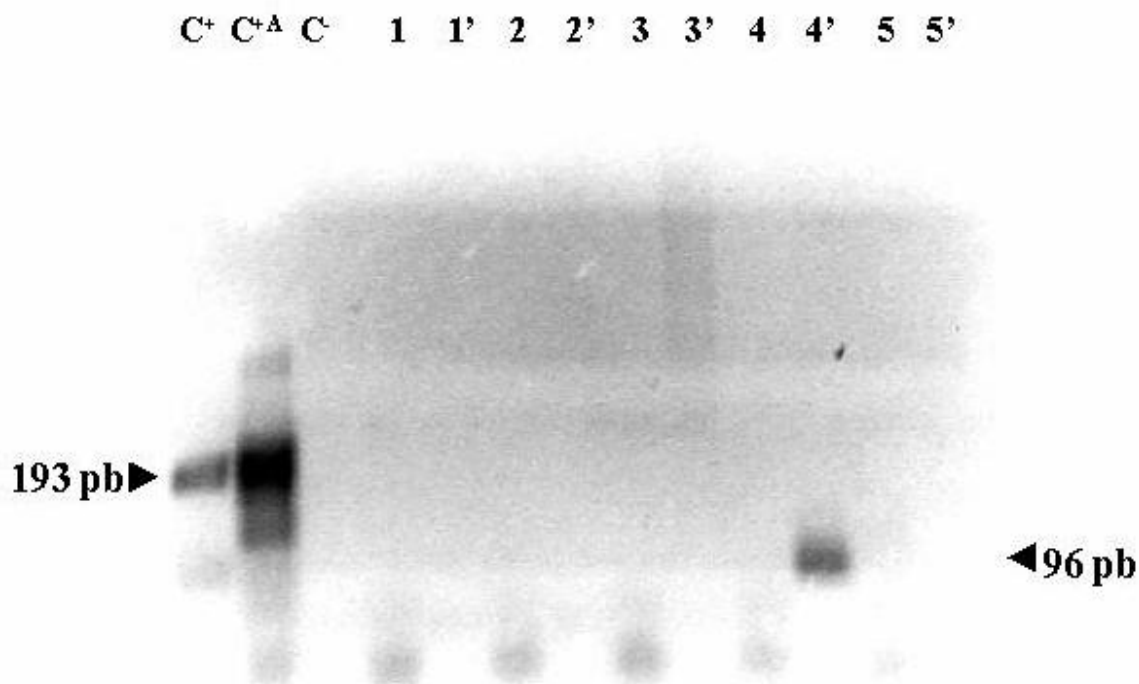
Fotografía 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y tinción con Bromuro de Etidio, de los productos de amplificación de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre periférica de gestantes mediante PCR anidado, pozo 1. Marcador molecular 100 pb Ladder; muestras 1-2-3-4-5-6 Primera ronda de amplificación con cebadores N1 C1; muestras 1'-2'-3'-4'-5'-6'. Etapa anidada con los cebadores N2 C2; muestras 1 y 2 gestantes negativas, muestras 3'-4'-5'. Gestantes positivas (fragmento amplificado de 96 pb).

Tabla 20. Frecuencia de gestantes positivas mediante la técnica PCR anidado.

PCR Anidado	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	82	82,0%
Positivo	18	18,0%
Total	100	100,0%



Fotografía 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y tinción con Bromuro de Etidio, de los productos de amplificación de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre periférica de gestantes amplificadas en la primera ronda de amplificación del PCR anidado (fragmento amplificado de 193 pb), pozo 1. Marcador molecular 100 pb Ladder; muestra 1. Control positivo (ADN cepa RH de *Toxoplasma gondii*); muestras 6-7. Gestantes positivas; muestras 2-3-4-5-8 gestantes negativas.



Fotografía 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio, de los productos de amplificación de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre periférica de gestantes, amplificada mediante PCR anidado, pozo 1. Control positivo de la primera ronda de amplificación (cepa RH de *Toxoplasma gondii*); pozo 2. Control positivo de la etapa anidada; pozo 3. Control negativo (agua filtrada estéril); muestras 1-2-3-4-5. Primera ronda de amplificación; muestras 1'-2'-3'-4'-5'. Etapa anidada; muestra 4'. Gestante positiva (fragmento amplificado de 96 pb).

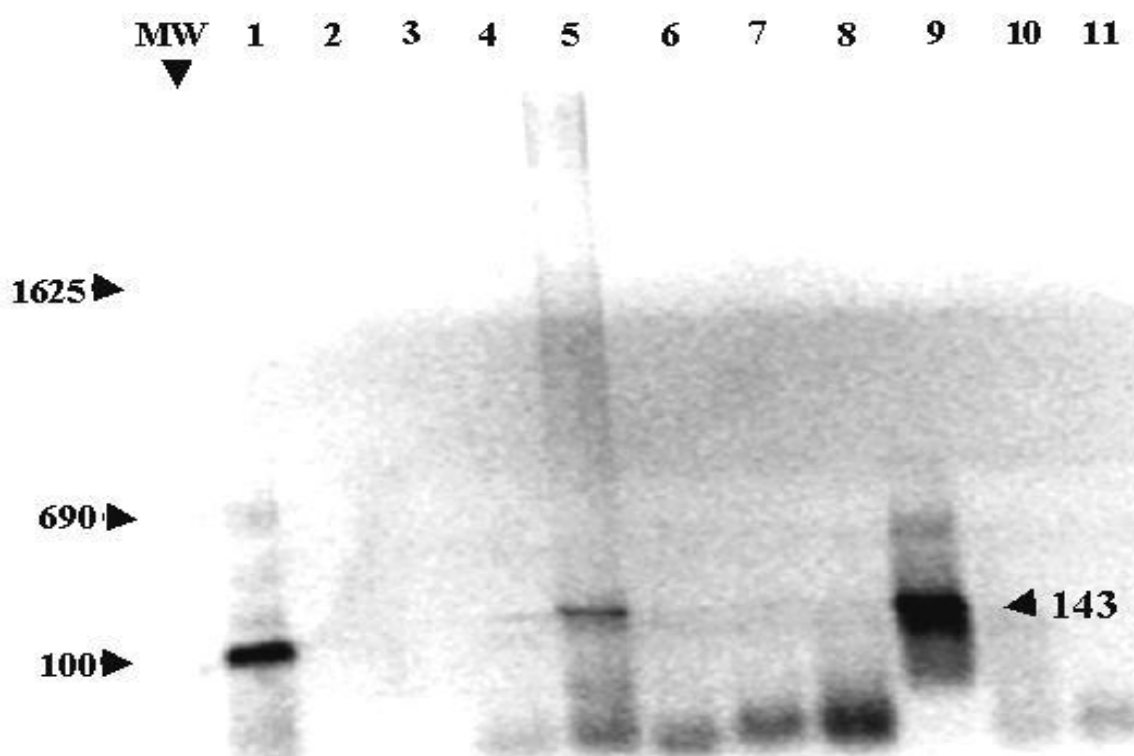
6.4.2 PCR CONVENCIONAL

En la estandarización de las concentraciones de los cebadores para el PCR convencional, los mejores productos de la amplificación fueron obtenidos usando los cebadores Toxo B22 y Toxo B23 en concentraciones de 20 picomoles por reacción, con los cuales fue posible obtener un fragmento de 143 pb, correspondiente al ADN de *Toxoplasma gondii*.

El proceso de amplificación del gen B1 mediante el PCR convencional fue realizado en tres horas y veinticinco minutos. Las condiciones de amplificación

fueron optimizadas, disminuyendo las amplificaciones inespecíficas que se originaron durante el procedimiento.

En el análisis de las bandas teñidas con bromuro de etidio en los geles de agarosa – TBE, fue posible la amplificación del fragmento de 143 pb correspondiente al ADN de *Toxoplasma gondii*, en 10 muestras de las 18 analizadas (muestras positivas por PCR anidado), identificando de esta forma las pacientes positivas para el estudio, mediante esta técnica (Fotografía 7).



Fotografía 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio, de los productos de amplificación de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre periférica de gestantes, gestantes positivas mediante PCR convencional, pozo 1. Marcador molecular 100 pb Ladder; muestra 1. Control positivo (cepa RH de *Toxoplasma gondii*); muestra 2. Control negativo (agua filtrada estéril); muestras 5-9. Gestantes positivas (fragmento amplificado de 143 pb); muestras 3-4-6-7-8-10-11. Gestantes negativas.

6.5 RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO

Se realizó una correlación entre los resultados obtenidos en las gestantes, por la prueba ELFA IgG e IgM anti*Toxoplasma* y la técnica PCR anidado con las variables de estudio, tales como: presencia de gatos, visitas de gatos extraños en sus viviendas, presencia de otros animales, presencia de perros y manipulación de carne cruda.

6.5.1 RELACIÓN ENTRE RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA PRUEBA ELFA IgG E IgM ANTI *TOXOPLASMA* FRENTE A VARIABLES DE ESTUDIO

Las 56 gestantes seropositivas por la prueba ELFA IgG anti*Toxoplasma*, 2 fueron seropositivas mediante la prueba ELFA IgM anti*Toxoplasma* y 8 positivas por la técnica de PCR anidado; 32 manifestaron presencia de gatos en sus viviendas (57.1%, gatos propios o extraños), 29 presencia de otros animales, entre los que predominaba el perro, el cual estaba presente en 18 viviendas; 42 manipulaban carne cruda diariamente; 20 de las gestantes seropositivas presentaban afecciones tales como: infección en la orina, infección vaginal, resfriado común y algunos síntomas como malestar general, dolor de garganta, cefalea y escalofríos. De la población de estudio (n = 100 gestantes), el 60% estaba expuesta a la principal fuente de infección con *Toxoplasma gondii* (presencia de gatos en sus viviendas), encontrando que para las 56 gestantes seropositivas mediante la prueba ELFA IgG anti*Toxoplasma*, solamente 32 de ellas tenían gatos en sus viviendas, lo que corresponde al 32% sobre el total de la población de gatos en el estudio y una correlación para seropositividad por presencia de gatos del 57.1%.

En el presente estudio no se observó una asociación significativa (corrección de continuidad de Yates: 0.20, $P > 0.05$), entre la presencia de gatos con la obtención de resultados seropositivos.

Las 19 gestantes sospechosas de infección activa por *Toxoplasma gondii* con la prueba ELFA IgG anti*Toxoplasma* (títulos ≥ 170 UI/ml), 2 fueron seropositivas mediante la prueba ELFA IgM anti*Toxoplasma* y 3 positivas por la técnica de PCR anidado; manifestando 15 de ellas presencia de gatos en sus viviendas, 14 presencia de otros animales, siendo el animal más predominante el perro, el cual estaba presente en 7 viviendas; 8 manipulaban carne cruda diariamente y 6 de ellas manifestaron afecciones tales como: infección en la orina, infección vaginal, gripa y algunos síntomas como malestar general, dolor de garganta, cefalea y escalofríos. Para nuestro estudio la presencia de gatos correlacionada con la obtención de resultados seropositivos para ELFA IgG anti*Toxoplasma* (títulos ≥ 170 UI/ml), no presentó una asociación significativa (corrección de continuidad de Yates: 2.60, $P > 0.05$).

Las 2 gestantes seropositivas por la prueba ELFA IgM antitoxoplasma y sospechosas de infección activa por *Toxoplasma gondii*, no presentaron resultados positivos por la técnica de PCR anidado; en sus viviendas tenían presencia de gatos, 1 manifestó presencia de otros animales, ninguna de ellas manipulaba carne cruda y no presentaron afección alguna.

6.5.2 RELACIÓN ENTRE RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA PCR ANIDADO FRENTE A VARIABLES DE ESTUDIO

Las 18 gestantes positivas por la técnica de PCR anidado, todas estaban seronegativas por la prueba ELFA IgM antitoxoplasma y 8 fueron seropositivas mediante la prueba ELFA IgG antitoxoplasma (Tabla 21); 8 manifestaron presencia de gatos en sus viviendas, 11 manifestaron tener otros animales, siendo el animal más predominante el perro, el cual estaba presente en 6 viviendas; 10 manipulaban carne cruda diariamente y 6 de ellas manifestaron las afecciones mencionadas anteriormente. En este estudio la presencia de gatos correlacionada con la obtención de resultados positivos mediante PCR anidado, no presentó una asociación significativa (corrección de continuidad de Yates: 0.75, $P > 0.05$).

Tabla 21. Frecuencia de resultados seropositivos y seronegativos por la prueba ELFA IgG anti *Toxoplasma* en las 18 gestantes positivas mediante la técnica PCR anidado.

Gestantes positivas por PCR anidado	Resultado IgG antitoxoplasma	Porcentaje
10	Seronegativas	56.0%
8	Seropositivas	44.0%
Total = 18		100.0%

6.5.3 DETERMINACIÓN DE SEROCONVERSIÓN EN GESTANTES POSITIVAS POR PCR ANIDADO

De las 18 gestantes positivas mediante PCR anidado sólo fue posible tomar nuevamente muestra de sangre en 10 de ellas, de las cuales 5 eran seronegativas. Estas muestras fueron procesadas por la prueba ELISA Human IgG anti*Toxoplasma* en el laboratorio de investigaciones biomédicas de la Universidad del Quindío, encontrando 2 gestantes con valores que confirman una seroconversión (Tabla 22).

Tabla 22. Evolución de los títulos de anticuerpos IgG anti*Toxoplasma* en las 10 gestantes positivas por PCR anidado.

Gestantes positivas por PCR anidado	Resultado IgG (UI/ml) anti <i>Toxoplasma</i> inicial ELFA	Resultado IgG (UI/ml) anti <i>Toxoplasma</i> Final ELISA
1	212	154.0
2	0.0	93 *
3	273	107.7
4	0.0	No Reactiva
5	0.0	No Reactiva
6	167	68.1
7	0.0	No Reactiva
8	111	91.3
9	148	123.1
10	0.0	59.9 *

* Seroconversión.

Los productos de las 18 gestantes positivas por PCR anidado, 18 niños, de los cuales se encontró 1 niño que desarrolló severas anomalías como hidrocefalia y retardo en el desarrollo, falleciendo a los 3 meses de edad (Anexo 6), producto de una madre seronegativa para IgG e IgM anti*Toxoplasma*, con 6 meses de edad gestacional al momento de la toma de muestra inicial y seroconversión confirmada posteriormente. En los 17 bebés restantes, a 7 de ellos (edad promedio entre 5 y 9 meses) sus padres accedieron a realizarle seguimiento, para lo cual se les tomó una muestra de sangre venosa (2 mililitros). Estas muestras fueron procesadas por la prueba ELISA Human IgG anti*Toxoplasma* y PCR anidado en el laboratorio de investigaciones biomédicas de la Universidad del Quindío, encontrando 1 niño con un valor para IgG anti*Toxoplasma* de 44.7 UI/ml, proveniente de una madre seropositiva para IgG anti*Toxoplasma* y negativa para IgM anti*Toxoplasma*, con una edad gestacional de 6 meses al momento de la toma de muestra inicial. Mediante la técnica de PCR anidado se encontraron 6 niños con resultados positivos y 1 con resultado negativo. De estos 6 niños positivos, 4 eran producto de madres seropositivas para IgG anti*Toxoplasma* y negativas para IgM anti*Toxoplasma* (incluyendo al niño con resultado serológico positivo), y 2 eran producto de madres seronegativas para IgG e IgM anti*Toxoplasma*. Todos los niños positivos mediante PCR anidado fueron remitidos a manejo especializado.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se confirmó que los títulos de IgG iguales o mayores a 300 UI/ml suelen ser compatibles con una infección aguda adquirida durante el embarazo, lo anterior es sugerido, porque las gestantes con resultados de IgM anti*Toxoplasma* positivos, tenían títulos de IgG con valores de 300 y 1625 UI/ml respectivamente.

La seroprevalencia del 56% e incidencia del 2% obtenidas en la población de estudio, procesadas con la técnica ELFA automatizada para IgG e IgM antitoxoplasma, presentan valores aproximados a los reportados en diversos estudios nacionales (15, 16, 19). La frecuencia del 18% obtenida mediante la técnica de PCR anidado, es un resultado que requiere un seguimiento de estas pacientes con el fin de determinar su importancia clínica. Sin embargo, no es claro si la enfermedad se debe a una reactivación de una infección latente adquirida antes de que ocurra el embarazo o si ésta es causada por infección reciente. Faltan estudios que nos ayuden a elucidar éstos y otros datos como el origen de la infección, las fuentes de contaminación, las interacciones parásito-hospedero y la regulación del sistema inmunológico en el control de la enfermedad.

En nuestro estudio, para confirmar los resultados positivos mediante PCR anidado, las muestras de ADN fueron procesadas de 2 a 3 veces, donde los controles negativos siempre fueron negativos y los positivos (controles y muestras)

siempre fueron positivos, sólo de esta forma los resultados son aceptados (35). En el caso de los resultados negativos, se les adiciona a las muestras una pequeña cantidad de ADN - control positivo (cepa RH de *Toxoplasma gondii*), con lo cual la muestra negativa debe mostrar amplificación.

Resultados positivos obtenidos mediante PCR anidado sugieren la presencia de parasitemia. Es posible que esta técnica pueda detectar la enfermedad cuando aún no se han presentado anticuerpos, por lo tanto es necesario repetir la determinación para IgG anti *Toxoplasma* 4 semanas más tarde.

Los resultados negativos por PCR anidado en gestantes con IgG e IgM anti *Toxoplasma* positivos, pueden estar relacionados con la ausencia de parásitos en circulación periférica; y además no se excluye la posibilidad de que en el procedimiento usado para la extracción de ADN, al momento de recuperar los leucocitos en el sobrenadante, estos pudieran haberse sedimentado junto con los eritrocitos, interfiriendo con la sensibilidad del PCR anidado.

Con referencia a los resultados negativos obtenidos mediante PCR anidado en gestantes con títulos positivos para IgG anti *Toxoplasma*, estos se pueden explicar con el periodo de la parasitemia, el cual es fugaz o muy corto (36). Es importante recalcar que una PCR negativa no excluye una infección reciente (45).

Los resultados positivos mediante PCR anidado, obtenidos en gestantes en las cuales nunca existió seroconversión, podrían explicarse por presencia de parásitos en sangre en niveles no infectantes, lo cual es interesante ya que estos resultados indicarían que es posible tener parásitos en sangre pero que "No son persistentes" o no inducen respuesta inmune específica, esto sería evidencia de

una alta exposición al parásito en la región y que la respuesta innata es suficiente protección con dosis bajas de parásitos. Este es el primer reporte de PCR positivo en pacientes seronegativos.

Los resultados obtenidos sugieren que la técnica de PCR anidado en muestras de sangre periférica puede ser útil en el diagnóstico precoz de una toxoplasmosis congénita, este hecho se confirma al encontrar una gestante seronegativa con PCR anidado positivo, que da a luz un niño con manifestaciones clínicas de una toxoplasmosis, tales como hidrocefalia, retardo en el desarrollo (46) y que fallece a los 3 meses de edad; confirmándosele posteriormente a la madre una seroconversión. En otros estudios realizados se ha demostrado la alta sensibilidad y especificidad de esta técnica para este tipo de muestra (35, 36, 45).

Este estudio confirma la complementariedad del diagnóstico serológico y el diagnóstico molecular en la detección de una toxoplasmosis congénita en sangre periférica materna, y la posibilidad de incluirlo en los programas de vigilancia epidemiológica de la toxoplasmosis.

La técnica de PCR anidado mostró mayor sensibilidad en lo que respecta al diagnóstico, esto se refleja en el menor número de resultados detectados mediante la PCR convencional.

La presencia de gatos en las viviendas de las gestantes presenta una importancia no significativa en la obtención de títulos altos para IgG anti *Toxoplasma* (≥ 170 UI/ml) y resultados positivos mediante PCR anidado. Por lo tanto se puede

inferir que la presencia de gatos en las viviendas no es un factor por sí solo determinante de la infección (4). Sin embargo no se deben descartar las otras formas de transmisión de la enfermedad, tales como: ingestión de ooquistes presentes en el medio, consumo de carnes de animales infectados y por transfusión de sangre contaminada, esta última poco frecuente.

8. CONCLUSIONES

- La seroprevalencia del 56% e incidencia del 2% obtenida en la población de estudio mediante la prueba ELFA IgG e IgM anti *Toxoplasma*, coincide con la reportada en diversos estudios nacionales.
- Mediante la técnica de PCR anidado es posible detectar ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre periférica materna.
- La técnica de PCR anidado en muestras de sangre periférica materna puede ser útil en el diagnóstico de una toxoplasmosis congénita, no obstante una PCR negativa no excluye una infección reciente.
- La frecuencia de detección del 18% obtenida mediante la técnica de PCR anidado, puede estar relacionada con la ubicación geográfica de la zona de estudio, hábitos de higiene y hábitos alimenticios.
- Un PCR anidado puede ser positivo en sangre periférica materna, en presencia de pruebas serológicas negativas.

9. RECOMENDACIONES

Es necesario complementar el diagnóstico serológico con el diagnóstico molecular en la detección de una toxoplasmosis congénita en sangre periférica materna, y se sugiere la posibilidad de incluirlo en los programas de vigilancia epidemiológica de la toxoplasmosis.

Una gestante positiva para *Toxoplasma gondii* mediante PCR anidado, indicaría presencia de parasitemia activa, por lo tanto, los productos de estas madres deben ser sometidos a un completo seguimiento y control hasta el año de vida.

Se hace necesario realizar nuevos estudios en la región con el fin de establecer datos de prevalencia e incidencia de la toxoplasmosis congénita.

Realizar nuevos estudios que ayuden a elucidar el origen de la infección, las fuentes de contaminación, las interacciones parásito-hospedero y la regulación del sistema inmunológico en el control de la enfermedad.

Se sugiere para futuros estudios, realizar genotipificación con marcadores altamente discriminativos como los microsatélites, en muestras encontradas positivas mediante PCR anidado, con el fin de descartar contaminación por presencia de amplicones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) GÓMEZ J. E, CASTAÑO J. C, RIOS M. P, MONTOYA M. T, DUQUE A. M. Tratamiento de la toxoplasmosis adquirida durante el embarazo y en el recién nacido con infección congénita: presentación de las normas del programa de control y vigilancia epidemiológica para la toxoplasmosis congénita en el departamento del Quindío. Grupo de investigación regional en toxoplasmosis. SEInvestiga - Universidad del Quindío. Armenia – Colombia. 1992. pp. 1-3.
- (2) MONTOYA M. T, GOMEZ J. E, CASTAÑO J. C, y Otros. Utilidad de dos técnicas serológicas para IgA anti *Toxoplasma* como pruebas de referencia para toxoplasmosis materna reciente. Acta Médica Colombiana. 1992. Vol. 23, No. 5, pp. 275 -282.
- (3) GÓMEZ J. E, CASTAÑO J. C, MONTOYA M. T. Toxoplasmosis congénita en Colombia: Un problema subestimado de salud pública. Colombia Médica. 1995. Vol. 26, No. 2, pp. 66-70.
- (4) GÓMEZ J. E, MONTOYA M. T, CASTAÑO J. C, RIOS M. P, PEREZ J. C. Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en gestantes de Armenia – Quindío, Colombia. Colombia Médica. 1993. Vol. 24, pp. 14 - 18.
- (5) GÓMEZ J. E, MONTOYA M. T, CASTAÑO J. C. A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío – Colombia and applications of mathematical models to estimate incidence using age – stratified data. American Journal of Tropical Medicine. 1997. Vol. 57, No. 2, pp. 180-186.
- (6) PRADA G. *Toxoplasma* y embarazo: ¿Tamizaje universal?. Acta Médica Colombiana. 1998. Vol. 23, No. 5, pp. 271 – 274.
- (7) JENUM P. A, STRAY – PEDERSEN B. Development of specific immunoglobulins G, M and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. Journal of Clinical Microbiology. 1998. Vol. 36, No. 10, pp. 2907 – 2913.
- (8) FONSECA D. J. PCR en toxoplasmosis. Revista de Salud Pública. 2002. Vol. 4, Suplemento 2, pp. 63-64.
- (9) ORJUELA J. E, DUQUE G. M, GIRALDO R. A, y otros. Toxoplasmosis congénita: Avances en diagnóstico y tratamiento. Bogotá – Colombia. 1995. pp. 9 – 10.

- (10) ATIAS, A. THIERMAN, E. Toxoplasmosis en Parasitología Clínica. Ed. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago – Chile. 3ª Edición. 1995. Cap. 31, pp. 269 – 282.
- (11) CASTAÑO J. C. Vacunas contra toxoplasmosis; importancia de la inmunidad de mucosas. SEInvestiga - Universidad del Quindío. Armenia – Colombia. 2001. Vol. 6, No. 1, pp. 10 - 12.
- (12) BOTERO D, RESTREPO M. Parasitosis humana. Fundación editorial CIB (Corporación para investigaciones biológicas). Medellín Colombia. 4ª Edición. 2003. Cap. 9, pp. 252 – 270.
- (13) GONZÁLEZ T, MOLINA J. Toxoplasmosis congénita. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. 1997. Vol. 23, No. 1, pp. 7 –12.
- (14) JOSEPH S. Toxoplasmosis. 2002. Emedicine, instant access to the minds of medicine. Web en línea.
- (15) GÓMEZ J. E. Toxoplasmosis: Un problema de salud pública en Colombia. Revista de salud pública. 2002. Vol. 4, Suplemento 2, pp. 7 – 10.
- (16) MONTOYA M. T, GOMEZ J. E, NIETO O. A, y otros. Reporte diagnóstico del sistema de vigilancia epidemiológica para toxoplasmosis congénita en la ciudad de Armenia: Un año de experiencia. SEInvestiga - Universidad del Quindío. Armenia – Colombia. 2001. Vol. 6, No. 1, pp. 35 – 36.
- (17) MONTOYA M. T, GOMEZ J. E, CASTAÑO J. C, y otros. Avances diagnósticos en Toxoplasmosis. PCR nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas. Acta médica colombiana. Colombia. 1996. Vol. 21, No 3, pp. 127 – 130.
- (18) ARIAS F. Guía practica para el embarazo y el parto de alto riesgo. Mosby Doyna libros. 1ª Edición. Madrid – España. 1994. pp. 385 – 389.
- (19) GÓMEZ J. E. Diagnóstico de la toxoplasmosis humana: Nuevos conceptos y técnicas. Medicina y laboratorio. 2002. Vol. 9, No. 3 – 4, pp. 168 – 170.
- (20) CRISTINA N, DEROVIN F, PELLOUX J. Detection de toxoplasma gondii chez des patients sideens a l'aide de la secuencia repetae TGR1E. Path Biology. 1992. Vol. 40, pp. 52 – 55.
- (21) BEQUERETT J. Improvment of rDNA based PCR assay to detect *Toxoplasma* prenatal diagnosis. 1993. pp. 543.

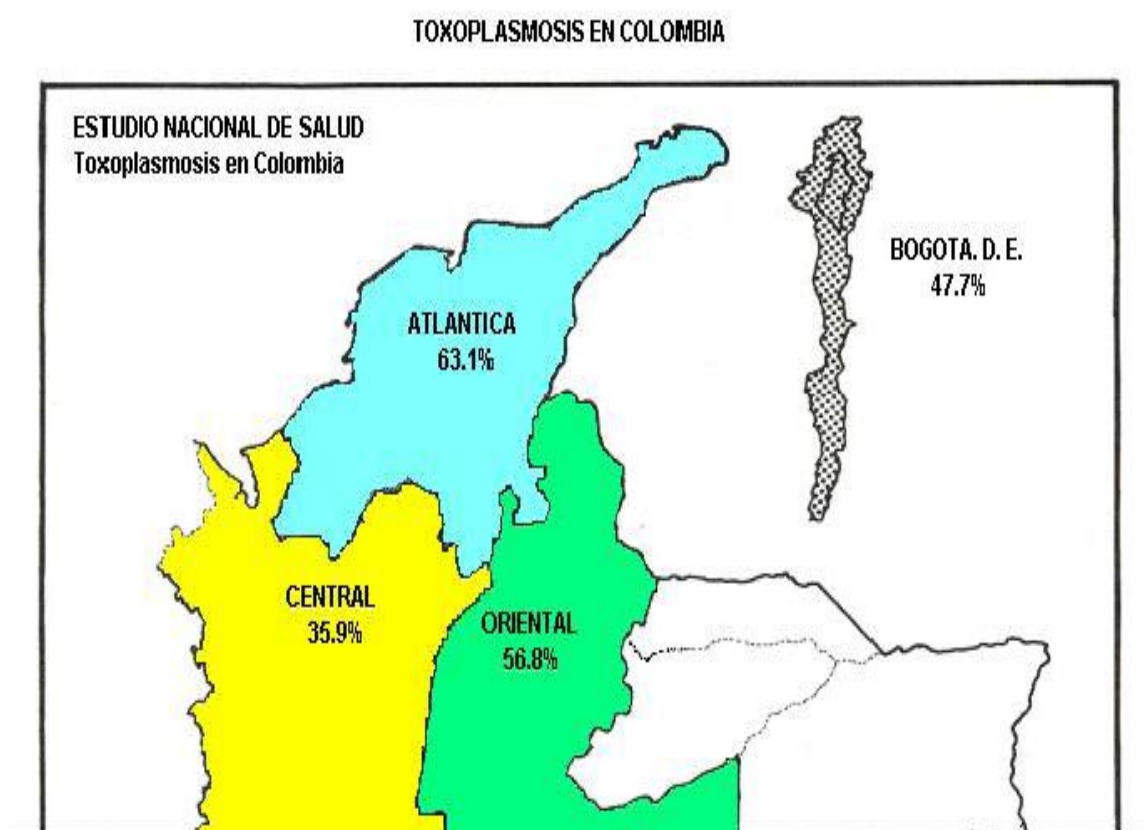
- (22) BAVERSTOCK P. J. Propried nucleotide sequence análisis of the subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii*, evolutionary implications for the apicomplexa. Molecular Biochemical Parasitology. 1987. pp. 239 – 246.
- (23) PUJOL I. M, AMONDARAIN I, DANES C, VALLS M. E. Utilidad de la PCR en el diagnóstico de las lesiones cerebrales focales en pacientes infectados por el VIH. Journal of clinical Microbiology. 1999. Vol. 17, No. 1, pp. 29 – 35.
- (24) DUPOY J. La PCR et les parasites, en: Larzul D (ed), La PCR un procede de replication in vitro. Tec & Doc lavoisier. Paris. 1993. pp. 342 – 345, 1993.
- (25) WONG S. Y, REMINTONG J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. Texbook of AIDS Medicine. Ed. Williams & Wilkins. 1994. pp. 223 – 258.
- (26) HIGUCHI R, KWOK S. Avoiding falses positives with PCR natural. 1989. No. 339, pp. 237 – 238.
- (27) HOHLFELD P, DAFFOS F, COSTA J. M, THULLIEZ P, FORESTIER F, VIDAUD M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. The New England Journal of Medicine. 1994. Vol. 331, No. 11, pp. 695 – 696.
- (28) CORREDOR A. A. Programa de Educación Continuada en Salud: Toxoplasmosis. Ministerio de Salud. Bogota – Colombia. 1981. pp. 1 – 33.
- (29) GOGIEVSKY – HRISOHO M, GERMANN D, MATTER L. Diagnostic implications of kinetic of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. Journal of clinical Microbiology. 1996. Vol. 34, No. 6, pp. 127 – 130.
- (30) JOHNSON J. D, BUTCHER P. D, SAVVA D, HOLLIMAN R. E. Aplications of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. Journal of Parasitology. 1993. Vol. 26, pp. 147 – 158.
- (31) KHALIFA K, ROTH A, ROTH B, ARASTE K. N, JANISTSCHKE K.. Value of PCR for evaluating ocurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. Journal of Parasitology. 1994. Vol. 29, pp. 133 – 138. 1994.
- (32) LIESENFELD O, ROTH A, WEINKE T, FOSS H. D, HAHN H. A case of disseminated toxoplasmosis – value of PCR for the diagnosis. Journal of Parasitology. 1994. Vol. 29, pp. 133 – 138.

- (33) AOUIZERATE F, CAZENAVE J, POIRIER L, CHEYROU A, VERIN P. Detection of *Toxoplasma* in aqueous humor by using the polymerase Chain reaction. Ann Biology Clinical. 1992. Vol. 50, pp. 357 – 358.
- (34) ANÓNIMO. Evaluation of a PCR probe capture for the detection of *Toxoplasma gondii* incorporation of uracil N – Glycosilase for contamination control.
- (35) DUPOUY C. J, LAVAREDA S, MASLO C, y otros. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood form AIDS patients by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology. 1993. Vol. 31, No. 7, pp. 1866 – 1869.
- (36) SPALDING S. M, REIS M, COELHO J, ANGEL S. Otimizacao da reacao de polimerase em cadeia para deteccao de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2002. Vol. 38, No. 2. pp. 1 – 9.
- (37) FOUDRINIER F, AUBERT D, ROUGER C, y otros. Detection of *Toxoplasma gondii* in immunodeficient subjects by gene amplification: Influence of therapeutic. Scandinave Journal infectology disease. 1996. Vol. 28, pp. 383 – 386.
- (38) MEI-HUI LIN, TSE-CHING CHEN, TSENG-TONG KUO, CHING-CHUNG TSENG, CHING-PING TSENG. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. Journal of clinical Microbiology. 2000. Vol. 38, No. 11, pp. 4121 – 4125.
- (39) ROBERT G. F. Value of prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: Retrospective study of 110 cases. Journal of clinical Microbiology. 1999. Vol. 37, No. 9, pp. 2893 – 2898.
- (40) Plan de Desarrollo Municipal de Sincelejo 2001 – 2003. Secretaria de Planeación, Alcaldía de Sincelejo. Sincelejo - Colombia.
- (41) Manual bioMérieux Sa para el diagnóstico in vitro. BioMérieux Sa. Francia. 2000. pp. 1 – 5.
- (42) KATZ D, CLADWYNE P. A. DNA isolation. Flinn scientific, INC. Web site: [www. Flinnsci.com](http://www.Flinnsci.com). En línea.
- (43) JONES C, OKHRAVI N, ADAMSON P, TASKER S, LIGHTMAN S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30 and 18s rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. Investigative ophthalmology and visual science. 2000. Vol. 41, No. 3, pp. 634 - 642.

- (44) MANIATIS T, FRITSCH E, SAMBROOK J. Molecular cloning, A laboratory manual. 2ª Edición. 1989. Vol. 1, Capitulo 6, pp. 6.1 – 6.62.
- (45) GUY E. C, JOYNSON D. H. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. Journal infectology diseases. Vol. 172, No. 1, pp. 319 – 322. 1995.
- (46) SADLER T. W. Embriología médica con orientación clínica. Editorial médica panamericana. 8ª Edición. España. pp. 119 – 120. 2001.

ANEXOS

ANEXO 1. Distribución geográfica de la toxoplasmosis en Colombia.



Tomado del Estudio Nacional de Salud, 1983.

ANEXO 2. Formato de Recolección de Información.

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DETECCIÓN DE ADN DE TOXOPLASMA GONDII EN MUESTRAS DE SANGRE EN UN GRUPO DE GESTANTES DE SINCELEJO - SUCRE MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR ANIDADO IDENTIFICANDO EL GEN B1

Encuesta No _____ Fecha _____ (dd/mm/aa)

1. Datos personales:

- **Nombre** _____ **Edad** _____
- **CC.:** _____ **Teléfono:** _____ **Entidad de Salud:** _____
- **Centro de Atención:** _____ **Nº Historia** _____
- **Lugar de residencia:** Urbana _____ Rural _____ **Dirección:** _____

2. Antecedentes Gineco-obstétricos:

- Nº gestaciones anteriores _____ Nº Partos _____ Abortos _____ Mortinatos _____
 FUM _____ (dd/mm/aa) Edad Gestacional _____ (Semanas)
 FPP _____ (dd/mm/aa)
 Antecedentes de enfermedades: VIH _____ Tratamiento con corticoides _____

3. Material de la vivienda actual:

- Madera _____ Bahareque _____ ladrillo-cemento _____ plástico-cartón _____ otro _____ cuál? _____
 Piso de la vivienda: Baldosa _____ Madera _____ Cemento _____ Tierra _____

4. Contacto con gatos:

- _____ Actualmente tiene gatos en la casa. Hace cuanto tiempo: _____ (meses)
 _____ Tiene visitas de gatos extraños
 _____ Tenía gato antes

▪ **Edad del gato:**

Menos de 6 meses _____ Entre 6 meses y 8 años _____ Más de 8 años _____

▪ **Tipo de contacto con el gato:**

Los acaricia _____ Duerme con ellos _____ Le da la comida _____ Asea la caja de arena _____
 Tiene otros animales en la casa: Si _____ No _____ Cuales _____ Perros: Si _____ No _____

5. Consumo de carne:

Res _____ Cerdo _____ Aves _____ Pescado _____ Ninguna _____ Otra _____ Cual _____
 Bien cocida _____ A medio cocer _____ Cruda _____
 Manipula carne cruda: Si _____ No _____

6. Ha estado enferma en los últimos tres meses: Si _____ No _____ De que: _____

▪ **Ha presentado algunos de los siguientes síntomas actualmente:**

Fiebre _____ Escalofrío _____ Dolor de garganta _____ Erupción _____ Ganglios _____
 Otros _____ Cuales: _____

Para uso exclusivo de los Investigadores:

Resultados:

Título de IgG _____ Título de IgM _____ (Si es necesaria) Control IgG _____
 I Muestra PCR (+) _____ (-) _____ II Muestra PCR (+) _____ (-) _____

ANEXO 3. Formato de Consentimiento Informado.

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DETECCIÓN DE ADN DE TOXOPLASMA GONDII EN MUESTRAS DE SANGRE
EN UN GRUPO DE GESTANTES DE SINCELEJO - SUCRE MEDIANTE
LA TÉCNICA DE PCR ANIDADO IDENTIFICANDO EL GEN B1**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ he sido informada por los estudiantes de Biología con énfasis en Biotecnología de la Universidad de Sucre, Elvin Manrique y Nina Machado, sobre el trabajo que realizan en Toxoplasmosis congénita en el Municipio de Sincelejo utilizando para ello técnicas de Biología Molecular, motivo por el cual me tomarán una muestra de sangre periférica con el fin de diagnosticarme IgG e IgM antitoxoplasma y PCR para detectar presencia de ADN de *Toxoplasma gondii*.

Este trabajo también maneja datos de Prevalencia e Incidencia, por lo tanto se hace necesario recolectar cierta información con respecto a las mujeres en estado de embarazo.

Teniendo en cuenta todas las garantías que me ofrecen, admito que estoy de acuerdo en participar en este trabajo de investigación.

Firma y Cédula de la paciente aprobando su consentimiento.

ANEXO 5. Tratamiento Farmacológico.

DETECCIÓN DE ADN DE TOXOPLASMA GONDII EN MUESTRAS DE SANGRE EN UN GRUPO DE GESTANTES DE SINCELEJO – SUCRE MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR ANIDADO IDENTIFICANDO EL GEN B1.

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

1. IgG mayor de 300 UI/ml inicial, o valores en aumento en los controles, o seroconversión materna confirmada: **Spiramicina** (Rovamicina®) 9 Megaunidades (M.U.I.) / día, dividido en tres dosis hasta el momento del parto.
2. PCR en líquido amniótico positiva:
Spiramicina 9 M.U.I / día dividido en tres dosis desde el momento en el cual se hace el diagnóstico, hasta el momento del parto.
 Adicionar desde la semana 18 o desde el momento del diagnóstico por PCR, la combinación **Pirimetamina–Sulfa** (Falcidar®: tableta que contiene Pirimetamina 25 mg + Sulfadoxina 500 mg) a razón de tres tabletas cada 8 días por dos semanas , la cual se administra hasta 15 días antes de la fecha probable de parto, alternando con tres semanas de Spiramicina; siempre que se use este protocolo de manejo se debe administrar ácido fólico (**levadura de pan** 10 gramos / día) para contrarrestar el efecto inhibidor de la Dihidro Folato Reductasa (DHFR) por la combinación de Sulfa y Pirimetamina. También se debe realizar estricto control de cuadro hemático semanal durante el tratamiento con Sulfa y Pirimetamina, para evaluar posible compromiso de médula ósea.
3. Tratamiento neonatal (supervisado por Pediatra):
Spiramicina 50 mg / kg día, triturando las tabletas y disolviendo en 10 cc de agua para dar 50 mg x cc.
Pirimetamina – Sulfa cada 8 días tomando como base la dosis de Pirimetamina 1 mg/Kg / día empleando la presentación en suspensión que contiene 12,5 mg de Pirimetamina y 250 mg de Sulfadoxina en cada 5 cc.

ANEXO 6. Epicrisis niña con 2 meses de edad.

H2 NIVEL
HOSPITAL REGIONAL DE II NIVEL DE SINCELEJO

NT 892 260 033 - 114 SOLUCION No. 01095 DE 1999 Y 3374 DE 2000
DILIGENCIAR EN FORMA CLARA, LEGIBLE SIN TACHONES, ENMIENDAS, INTERCALACIONES SIN DEJAR ESPACIOS
EN BLANCO Y SIN UTILIZAR SIGLAS.

EPICRISIS

I. DATOS DE IDENTIFICACION DEL PACIENTE

HISTORIA CLINICA No. 4731414

FECHA Y HORA DE INGRESO: 26/07/08 SERVICIO DE INGRESO: Pediatría

FECHA Y HORA DE EGRESO: 08/07/08 SERVICIO DE EGRESO: Pediatría

NOMBRE: Hija de la Sra. Beltrán APELLIDO 2: Castro

CEDULA O TALLA DE IDENTIDAD No. 4731414 SEXO: M EDAD: 2 meses

REGIMEN CONTRIBUTIVO: Subsidiado PARTICULAR: OTROS

TIPO DE AFILIADO: BENEFICIARIO OTROS: ADMINISTRADORA: Da S. S. S.

II. DATOS DEL INGRESO.

MOTIVO DE LA SOLICITUD DEL SERVICIO: Fiebre y llanto desesperado.

ESTADO GENERAL AL INGRESO: Estable

ENFERMEDAD ACTUAL: Pta. Fiebre de 38.5°C, g. de 14 días de evolución, asociada a llanto desesperado, irritabilidad, vómitos de contenido gástrico.

ANTECEDENTES: pg. Tránsito, diarrea de 14 días de evolución, asociada a llanto desesperado, irritabilidad, vómitos de contenido gástrico.

REVISIÓN POR SISTEMAS: Respiratorio: sin alteraciones. Digestivo: vómitos de contenido gástrico. Genital: sin alteraciones. Neurológico: sin alteraciones.

HALLAZGOS DEL EXAMEN FISICO: Prólapsos y secreciones en recto.

T.C. = max. 38.5°C - Temp. 38.5°C

- C.C.: Hidrocefalia, cuello rígido sin adopción.

- C.P.: Ruidos con soplo, pulmones sin ruidos, sin crepitantes.

- A.B.: Blando, no doloroso. G.U.: Prólapsos rectal y vaginal.

- E.C.: Sin alteraciones. S.N.C.: Sin déficit.

DIAGNOSTICO DE INGRESO: (1) Hidrocefalia (2) Prólapsos Rectal

(3) Prólapsos Vaginal

CONDUCTA: PEU, Kinomioterapia, Ampicilina, Penicilina, NBE, Ceftriaxona, Acetaminofén, Hidrocortisona, Prednisona, R x Tórax, Compresión con saco fisiológico en zonas de prolapsos.

III. DE LA EVOLUCION.

CAMBIO EN EL ESTADO DEL PACIENTE (SE DEBE INCLUIR COMPLICACIONES, ACCIDENTES U OTROS EVENTOS QUE HAYAN SUCURRIDO DURANTE LA ESTADIA EN EL SERVICIO DE ESPECIALIDAD O DE HOSPITALIZACIÓN): Fiebre, Dificultad Respiratoria.

RESULTADOS DE PROCEDIMIENTOS DIAGNOSTICOS (SE DEBE INCLUIR LOS CAMBIOS EN EL MANEJO O EN EL DIAGNOSTICO):

- Hemograma: Hgb = 7.9 g/dl - HTO = 21.9%, WBC = 8.1

- G.R. = 45% - Linf. = 54% - N = 54 - L = 44%

- Plaquetas = 292000

- R x Tórax: Infiltrados difusos.

IV. DEL EGRESO.

DIAGNOSTICO DE EGRESO PRELIMINAR, PRINCIPALES RELACIONADOS CONFIRMADOS:

(1) Hidrocefalia (P. 835) (2) Prólapsos Rectal (P. 623) (3) Prólapsos Vaginal (N. 879)

(4) SDR (P. 600)

DEL MEDICO QUE ELABORO LA EPICRISIS

NOMBRES Y APELLIDOS LEGIBLES

REGISTRO MEDICO

REGISTRO OBLIGATORIO

LA CALIDAD ES UN COMPROMISO DE TODOS

AUDITORIA MEDICA

CRA. 14 No. 15a - 140 TEL: 2820305 NIT. 892280031

