EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA PCR EN TIEMPO REAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN GESTANTES DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE

YULENIS MARGARITA ASSIA MERCADO

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
Sincelejo
2016

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA PCR EN TIEMPO REAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN GESTANTES DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE

YULENIS MARGARITA ASSIA MERCADO

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Biología

Director:
MSc. en Inmunología.Yosed Patricia Anaya Chávez

Codirector:
Ph.D. en Medicina Tropical, MSc. en Medicina Tropical. Pedro José Blanco Tuirán

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
Sincelejo
2016

Notas de aceptación:

Firma de presidente del jurado

Firma del jurado 2

Firma del jurado 3

Sincelejo, 18 de Julio del 2016.

DEDICATORIA

A Dios, por ser lo más hermoso que he conocido y por darme la oportunidad de existir en este tiempo y espacio. Le Agradezco al todo poderoso, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi madre, Mercedes Vivero, por ser la mejor mamá del mundo, gracias por tu esfuerzo, tu apoyo y por la confianza que depositaste en mí. Siempre me enseñaste el valor de la vida en familia, y a respectar a los demás. Madre, no sabes cuánto me hubiera gustado poder dedicarte este triunfó en persona, pero aunque no estés físicamente a mi lado, sé que desde el cielo siempre me guías y me cuidas para que todo me salga bien. Eres tú madre mía mi ángel guardián.

A mi Padre, Jorge Assia, éste es un logro que quiero compartir contigo, gracias por ser mi papá y por creer en mí. Agradezco tus sabios consejos y quiero que sepas que ocupas un lugar especial.

A mi tíos Alberto Mercado y Pablo Mercado, quienes han sido como unos segundos padres para mí, gracias por preocuparse por mí.

A todas aquellas personitas especiales que Dios puso en mi camino para brindarme su amor, su amistad y apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.

Yulenis Margarita Assia Mercado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser la luz que guía mi camino, por darme la fuerza de voluntad para levantarme victoriosa tantas veces en los momentos de crisis

A mis padres y familiares, por brindarme el calor de un hogar, por sus esfuerzos y sabios consejos.

A mi directora de tesis de grado, Yosed Anaya por su apoyo y respaldo durante el desarrollo de esta investigación.

A mi profesor, jefe, y Codirector de trabajo de grado, el Dr. Pedro Blanco, por todas sus enseñanzas a nivel profesional y laboral.

A las gestantes del estudio por su confianza, disposición e interés en participar en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mis compañeros y profesores de maestría, por hacer de esta primera corte una gran familia.

A mis amigas de estudio y trabajo Yina Montero y Kelly Orozco, por enseñarme el verdadero valor de la amistad y por sacar adelante juntas este proyecto.

A los biólogos Erwin Camacho, Stiven Arroyo, Alveiro Pérez y Jussep Salgado, por su orientación y colaboración en la realización de este trabajo.

A mis compañeros del grupo de Investigaciones Biomédicas, por acogerme y fortalecer mi interés en el desarrollo de la investigación.

A Colciencias, por creer en este proyecto y brindar su apoyo y financiación para la realización de esta investigación científica.

A la Universidad de Sucre por formarme como profesional y magister.

Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo.

Artículo 12 Resolución 02 – 03.

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN 16

ABSTRACT 18

INTRODUCCIÓN 20

OBJETIVOS 23

1. MARCO REFERENCIAL 24
1.1 ESTADO DE ARTE 24
1.2 MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL 27
1.2.1 Clasificación taxonómica 28
1.2.2 Biología del parásito 29
1.2.2.1 Morfología 29
1.2.2.2 Ciclo de vida 31
1.2.2.3 Mecanismos de invasión celular 33
1.2.3 Patogenia 35
1.2.4 Vías de transmisión 37
1.2.4.1 Transmisión Horizontal 37
1.2.4.2 Transmisión Vertical 38
1.2.5 Respuesta inmune frente a *T.gondii.* 38
1.2.6 Genética del parásito 41
1.2.7 Epidemiología 44
1.2.8 Manifestaciones clínicas 45
1.2.8.1 Toxoplasmosis congénita 45
1.2.8.2 Toxoplasmosis ocular 47

1.2.8.3 Toxoplasmosis cerebral 47
1.2.9 Técnicas de diagnóstico 48
1.2.9.1 Aislamiento del parásito 48
1.2.9.2 Pruebas serológicas 49
1.2.9.3 Diagnóstico molecular 51
1.2.10 Tratamiento 53

2. METODOLOGÍA 55
2.1 TIPO DE ESTUDIO 55
2.2 ÁREA DE ESTUDIO 55
2.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO 56
2.4 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO 57
2.4.1 Obtención de muestras 57
2.4.2 Detección de anticuerpos IgG anti-*T.gondii* mediante la prueba ELISA automatizada. 58
2.4.3 Detección de anticuerpos IgM anti-*T.gondii* mediante la prueba ELISA de captura. 60
2.4.4 Detección de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre periférica por PCR en tiempo real. 62
2.4.4.1 Extracción de ADN de *T. gondii* 62
2.4.4.2 PCR en tiempo real 63
2.4.4.3 Estimación de la carga parasitaria por PCR en tiempo real de las gestantes positivas para *Toxoplasma.* 64
2.4.4.4. Estimación de la carga parasitaria por PCR en tiempo real de las gestantes positivas para *Toxoplasma.* 64
2.5 ASPECTOS ÉTICOS 65
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 65

3. RESULTADOS 67
3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO 67
3.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO 67

3.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG ANTI-T. GONDII POR LA TÉCNICA ELISA ……...69
3.4 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGM ANTI-T. GONII POR LA TÉCNICA ELISA 72
3.5 Prueba ELISA IgG anti*Toxoplasma* y factores de riesgo asociados con la toxoplasmosis en embarazadas del departamento de sucre. 74
3.6 PCR en tiempo real 75
3.6.1 Estandarización de la curva de calibración para el control Endógeno 75
3.6.2 Estandarización de la Curva para el control positivo específico para *T.gondii* 76
3.6.3 Detección de ADN de *T.gondii* mediante PCR en tiempo real 77
3.6.4 Cuantificación y estimación de la carga parasitaria en gestantes positivas por PCR en tiempo real 79
3.6.5 Prueba PCR en tiempo real y factores de riesgo asociados con la toxoplasmosis en embarazadas del departamento de sucre. 81
3.6.6 Correlación entre los resultados obtenidos por ELISA IgG e IgM anti-*T.gondii* y PCR en tiempo real. 82

4. DISCUSIÓN 85

5. CONCLUSIONES..... 93

6. RECOMENDACIONES 94

REFERENCIAS..... 95

ANEXOS 110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ultraestructura del Taquizoito de *T.gondii*.. 30
Figura 2. Estados Biológicos de *T. gondii*. 31
Figura 3. Ciclo de vida de *T. gondii*. 33
Figura 4. Cinética de los anticuerpos durante la infección por *T.gondii.* 40
Figura 5. Respuesta immune imnata frente a *T.gondii*. 41
Figura 6. Representación esquemática del genoma de *T.gondii.* 44
Figura 7. Área de estudio, Departamento de Sucre donde se indican los municipios de muestreo.. 56
Figura 8. Obtención de muestras. 58
Figura 9. Prueba ELISA IgG Anti-*Toxoplasma gondii***.** 59
Figura 10. Prueba ELISA de Captura para la detección de anticuerpos tipo IgM anti-*T.gondii* 61
Figura 11. Características de la población de estudio. 68
Figura 12. Factores de riesgos asociados a la posibilidad de adquirir la infección por *T.gondii* 69
Figura 13. Frecuencia de detección de anticuerpos IgG anti-*T.gondii* encontrada en las gestantes del estudio 72
Figura 14. Frecuencia de detección de anticuerpos IgM anti-*T.gondii* encontrada en las gestantes del estudio.. 74
Figura 15. Frecuencia de detección de ADN de *T.gondii* encontrada en las gestantes del estudio positivas mediante PCR en tiempo real. 78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos establecidos a partir del diagnóstico serológico por prueba ELISA.... 57
Tabla 2. Controles incluidos en el estuche comercial cuantitativo Toxo IgG (HUMAN).59
Tabla 3. Interpretación de los resultados del ensayo ELISA IgG anti-*T.gondii*. 60
Tabla 4. Controles incluidos en el estuche comercial cuantitativo Toxo IgM (HUMAN) 62
Tabla 5. Cebadores y sondas que flanquean la región repetida lineal de 529 bp de ADN de *T.gondii*. 63
Tabla 6. Concentración de anticuerpos IgG Anti-Toxoplasma en las gestantes por municipios. 71
Tabla 7. Resultados prueba PCR en tiempo real por municipios..... 79
Tabla 8. Cuantificación y estimación de la carga parasitaria en gestantes positivas por PCR en tiempo real. 80
Tabla 9. Distribucción de las 220 gestantes de acuerdo a la producción de anticuerpos específicos contra *T.gondii.* 82
Tabla 10. Asociación entre la presencia (TaqMan^{+}) o ausencia (TaqMan^{-}) del DNA de *T.gondii* y los grupos serológicos preestablecidos. 83

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Punto de corte establecido por el Kit cuantitativo Toxo IgG (HUMAN). 70
Gráfica 2. Punto de corte establecido por el Kit cuantitativo Toxo IgM (HUMAN). 73
Gráfica 3. Curva estándar para el control endógeno 18s RNA ribosomal. 76
Gráfica 4. Establecimiento de la curva estándar para la cuantificación de ADN *T.gondii.*. 77
Gráfica 5. Amplificación de las muestras positivas por *Toxoplasma* mediante PCR en tiempo real. 78

LISTA DE IMÁGENES

Imágen 1. Manifestaciones clinicas de la toxoplasmosis..... 48

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Autorización y vinculación de las gestantes al estudio. 110
Anexo 2. Formato de colección de información tipo encuesta para la determinación de los factores de riesgo asociados a la toxoplasmosis en embarazadas del municipio de Sincelejo..... 113
Anexo 3. Formulas empleadas para el cálculo de eficiencia diagnostica, sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos e índice de concordancia Kappa de Cohen..... 115
Anexo 4. Relación entre factores de riesgo y positividad para toxoplasmosis por la técnica de Elisa IgG en la población de estudio**.**..... 117
Anexo 5. Relación de las variables edad y período de gestación con resultados positivos por la técnica de Elisa IgG anti*Toxoplasma* en la población de estudio. 119
Anexo 6. Relación entre factores de riesgo y positividad para toxoplasmosis por la técnica de PCR en tiempo real en la población de estudio. 120
Anexo 7. Relación de las variables edad y período de gestación con resultados positivos por la técnica de PCR en tiempo real en la población de estudio. 122

RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria producida por *Toxoplasma gondii,* el cual infecta a animales de sangre caliente, incluido el hombre; la importancia médica de esta parasitosis reside, principalmente, en la forma congénita y la reactivación en el inmunodeprimido. El diagnóstico de infección congénita se realiza a través del empleo de técnicas serológicas fundamentadas en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito, sin embargo, estas pruebas muchas veces pueden arrogar resultados falsos positivos y falsos negativos lo que interfiere en la interpretación y manejo adecuado de los casos de infección, debido a que la mayoría de ellas, emplean taquizoitos intactos o extractos antigénicos solubles del parasito; por otro lado, estas pruebas dependen del tiempo de aparición de cada anticuerpo y del estado inmunológico del paciente. Además, tienen una baja sensibilidad y especificidad en la detección de casos activos de toxoplasmosis. En respuesta a esta falta de especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de la enfermedad, esta investigación propone evaluar nuevas herramientas que permitan establecer un diagnóstico certero y oportuno de la toxoplasmosis. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la utilidad de la PCR en tiempo real en la detección de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre periférica de gestantes con diagnóstico serológico confirmado por la técnica Elisa IgG e IgM anti-*T.gondii*. De un total de 220 muestras de sangre periférica de gestantes con serología confirmada para *T.gondii,* solo fue posible detectar el parasito en 23 muestras, lo que corresponde una frecuencia de detección de ADN de *Toxoplasma* del 10,5%. En las pacientes que presentaron toxoplasmosis reciente, el ADN de *Toxoplasma* fue detectado en 12 de 17 lo que corresponde a una sensibilidad diagnóstica del 70,58%, mientras un 4,6 % de positividad fue encontrado en el grupo de infección crónica (6/128). En el tercer grupo compuesto de gestantes negativas para la infección por *T.gondii*, el ensayo fue positivo en el 6,6% de los casos (5/75). Los análisis estadísticos revelaron que la probabilidad de que un paciente IgM positivo presente parasitemia detectada por el ensayo TaqMan fue de 13,02 (odds ratio value) mayor que en un individuo IgM negativo ($p<0.05$). Considerando los datos obtenidos en

ambos grupos IgM negativos, la PCR en tiempo real mostró que el 97,5% de las muestras fueron negativas para la infección por *T.gondii*, revelando una alta especificidad calculada usando el grupo I como grupo enfermo (IgM +) y el grupo II + III como grupo no enfermo (IgM-). El PCR cuantitativo en tiempo real para el elemento repetido de *T.gondii* fue capaz de detectar y cuantificar el ADN del parasito en mínimas cantidades (desde 0.04 hasta 1,63 copias/ml), permitiendo de este modo estimar así la carga parasitaria de las gestantes positivas que varía de 0.06 hasta 3 equivalentes de genomas de taquizoitos por mililitro de sangre, indicando bajos niveles de parasitemia en las gestantes infectadas. Estos resultados demuestran que la PCR en tiempo real es una herramienta útil para el mejoramiento del diagnóstico de la toxoplasmosis.

PALABRAS CLAVE: Toxoplasmosis, gestantes, diagnóstico, ELISA IgG e IgG, PCR en tiempo real.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by *Toxoplasma gondii,* which infects warm-blooded animals, including humans; medical importance of this disease resides mainly in the congenital form and the reactivation in immunosuppressed individuals. The diagnosis of congenital infection involves the use of serological techniques based on the detection of specific antibodies against the parasite, however, these tests can often yield false positive and false negative results which interferes with the interpretation and proper handling of infection cases, because most of them use intact tachyzoites or antigenic soluble extracts of the parasite; Moreover, these tests rely on the time of appearance of each antibody and the immune status of the patient. They also have a low sensitivity and specificity in detecting active cases of toxoplasmosis. In response to this lack of specificity and sensitivity in the diagnosis of disease, this research aims to evaluate new tools to establish an accurate and timely diagnosis of toxoplasmosis. The objective of the present work was to evaluate the usefulness of real-time PCR in detecting *T. gondii* DNA in peripheral blood samples of pregnant women with serological diagnosis confirmed by anti-*T.gondii* IgG and IgM ELISA. Out of 220 peripheral blood samples of pregnant women with confirmed serology for *T. gondii*, was only possible to detect the parasite in 23 samples, which represents a 10.5% detection frequency of Toxoplasma DNA. Toxoplasma DNA was detected in 12 of 17 patients with recent toxoplasmosis, corresponding to a diagnostic sensitivity of 70.58%; while a 4.6% positivity was found in the group of chronic infection (6/128). The third group consisted of negative pregnant woman for T. gondii infection and the test was positive in 6.6% of the cases (5/75). Statistical analyzes revealed that the probability for an IgM positive patient of having detectable parasitemia by the TaqMan assay was 13.02 (odds ratio value) higher than IgM negative individuals ($p < 0.05$). Considering the data obtained in both IgM negative groups, real-time PCR showed that 97.5% of the samples were negative for *T. gondii* infection, revealing a high specificity calculated using group I as a sick group (IgM +) and groups II + III as non-sick group (IgM-). Quantitative real time PCR for repeated *T.gondii* element was able to detect and quantify parasite DNA in minimal quantities (from 0.04 to 1.63 copies / ml), thus allowing to estimate the parasitic

load of positive pregnants, ranging from 0.06 to 3 tachyzoites genomes equivalents per milliliter of blood, indicating low levels of parasitemia in infected pregnants. These results demonstrate that real-time PCR is a useful tool to improve the diagnosis of toxoplasmosis.

KEYWORDS: toxoplasmosis, pregnant women, diagnosis, ELISA IgG and IgM
Real Time PCR.

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una infección parasitaria causada por *T. gondii*, un protozoo intracelular obligado, capaz infectar una amplia variedad de animales endotérmicos incluido (Jiménez, Acosta, Guzmán, Puerto, & Ortega, 2012; Martín & García, 2003a). Es una enfermedad benigna o asintomática en niños y adultos inmunocompetentes; sin embargo, puede causar ceguera, retraso mental y aborto en fetos con infección congénita y enfermedades graves en pacientes inmunodeprimidos (Botero & Restrepo, 2003; Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000).

La infección congénita puede ocurrir en mujeres que adquieren la infección por primera vez durante el embarazo. La tasa de transmisión transplacentaria y la gravedad de la enfermedad en el feto están inversamente correlacionadas (Rosso, Agudelo, Isaza, & Montoya, 2007; Thulliez, 2001). En etapas tempranas del embarazo, la tasa de infección es baja; sin embargo, las manifestaciones clínicas son severas y puede causar muerte del feto y aborto espontáneo. La infección materna tardía está asociada con una alta tasa de transmisión, pero los síntomas clínicos en el recién nacido son leves o están ausentes. No obstante, pueden manifestarse serias secuelas en la segunda o tercera década de vida que incluyen trastornos neurológicos y corioretinitis (J. Montoya & Liesenfeld, 2004; Sroka et al., 2010)

La toxoplasmosis congénita en el país es aún un problema de salud pública importante; se calcula que cada año aparecen de 2 a 10 casos de infección congénita por cada 1000 nacidos vivos (Gómez, 2007); el ministerio de salud y protección social solo incluye en el plan obligatorio de salud (POS) la realización de una prueba de diagnóstico para detección de la infección por toxoplasma durante el embarazo, lo cual evidencia el inadecuado manejo técnico-científico de esta enfermedad. Un programa de control nacional para la toxoplasmosis congénita debería incluir el seguimiento de las madres seronegativas debido a que son la población en riesgo de adquirir la infección. De ésta forma, se podrían detectar oportunamente los casos de toxoplasmosis

congénita y se disminuirían las secuelas de la enfermedad mediante un tratamiento oportuno. Por ello, en ausencia de intervención terapéutica, cada año nacen entre 800 y 3000 niños infectados (Gómez & Piñón, 2001). Para implementar a tiempo el tratamiento adecuado y evitar malformaciones neonatales y problemas visuales en recién nacidos, es fundamental establecer si la madre ha adquirido la infección primaria y además, determinar si se ha producido la transmisión vertical al feto (Beghetto, Spadoni, Bruno, Buffolano, & Gargano, 2006).Sin embargo, la imprevisible evolución de la toxoplasmosis congénita y la ausencia de síntomas específicos, dificultan el diagnostico e impiden determinar efectivamente el estado de la infección (Martín & García, 2003a).

Actualmente, el diagnóstico de la toxoplasmosis se realiza a través de técnicas serológicas, estas consisten en la detección de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE antiToxoplasma que establecen el inicio y la importancia clínica de la infección tanto en la madre como en el feto (Gómez J. 2000). También, se utilizan técnicas de diagnóstico molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa ó PCR) como herramienta diagnóstica de la toxoplasmosis mediante la detección del ADN del parásito en sangre, líquido amniótico y orina. Esta última herramienta muestra un alto grado de sensibilidad y especificidad, lo que permite el diagnóstico temprano de toxoplasmosis congénita en gestantes con resultados negativos obtenidos en las pruebas de detección de inmunoglobulinas (Gómez J. 2000). Las técnicas serológicas son frecuentemente utilizadas en el diagnóstico de esta parasitosis, sin embargo, presentan inconvenientes como baja sensibilidad y especificidad en la detección de la infección por *T. gondii* lo que muchas veces genera resultados falsos positivos y negativos, esto va a depender del fundamento técnico de cada ensayo, debido a que algunos emplean como antígenos extractos de proteínas solubles del parásito o proteínas recombinantes de la superficie del parásito, proteínas de la roptrias y proteínas de los gránulos densos. Por otro lado, el tiempo de aparición de cada inmunoglobulina y el estado inmunológico del paciente frente a la infección van a afectar la interpretación de los resultados. Las dificultades anteriormente mencionadas, se reflejan en un estudio realizado en la ciudad de Sincelejo, en el cual fue posible detectar ADN del parasito por la técnica PCR

anidado en 12 muestras de sangre periférica de 100 gestantes seronegativas por la prueba ELFA IgG anti*Toxoplasma*. Estos resultados, demuestran la presencia de parásitos en sangre, lo que indica que se está frente a una infección reciente en la cual, posiblemente, no se ha producido una respuesta inmune humoral secundaria *anti-Toxoplasma* (Pedro B et al 2011). En otro estudio realizado en Egipto, se evaluaron las técnicas ELISA IgM y PCR en muestras de madres y recién nacidos para determinar infección por *T.gondii*, los resultados obtenidos mostraron que fue posible detectar infección reciente en 23 muestras por PCR y en 18 muestras por Elisa IgM de un total de 70(Nagaty I et al. 2009). Más recientemente en Brasil, con el fin de mejorar el diagnóstico de la toxoplasmosis se llevó a cabo una investigación en la cual se evaluó la técnica PCR en tiempo real en muestras de sangre de pacientes con VIH con diagnóstico de Toxoplasmosis cerebral confirmado por pruebas serológicas, los resultados obtenidos mostraron altos porcentajes sensibilidad (97%) y especificidad (87%) de la técnica (Mesquita R et al. 2010). De acuerdo a estudios previos se demuestra la utilidad del PCR en tiempo real en el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis congénita, debido a que es posible realizar cuantificación de carga parasitaria, es altamente sensible y específica, se reducen los riesgos de contaminación y se pueden obtener los resultados en un menor tiempo (Vinueza C. 2009). Por esta razón, en la presente investigación se evaluará la utilidad de la PCR en tiempo real en el diagnóstico temprano de infección por *Toxoplasma gondii* empleando muestras de sangre periférica de gestantes del departamento de Sucre; con pruebas Elisa IgG negativa e IgM positiva, y de este modo poder contribuir con la implementación de un tratamiento oportuno que disminuya las secuelas de la enfermedad.

En este estudio se captaron 220 gestantes del departamento de Sucre, a los cuales se les realizaron pruebas para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*T.gondii* en suero y PCR en tiempo real en sangre periférica con el fin de evaluar la utilidad de la técnica PCR en tiempo real en el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis congénita en gestantes del departamento de Sucre.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de la técnica PCR en tiempo real en el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis congénita en gestantes del departamento de Sucre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar anticuerpos tipo IgG e IgM anti-*T.gondii* mediante el empleo de la técnica ELISA convencional en muestras de suero gestantes del departamento de Sucre.

- Detectar el ADN de *Toxoplasma gondii* a través de PCR en tiempo real usando muestras de sangre periférica de gestantes del departamento de Sucre con diagnostico serológico confirmado.

- Estimar la carga parasitaria por PCR en tiempo real en muestras de sangre periférica de gestantes del departamento de Sucre.

- Correlacionar los resultados de ELISA IgG e IgM anti*Toxoplasma* con los resultados obtenidos por PCR en tiempo real en muestras de sangre periférica materna.
- Establecer los posibles factores de riesgo relacionados con la toxoplasmosis en embarazadas del municipio de Sincelejo.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 ESTADO DE ARTE

La infección con el parásito protozoorio *T. gondii* se produce en todo el mundo. Los gatos y otros felinos son los únicos huéspedes definitivos en los cuales se lleva a cabo la reproducción sexual para producir los ooquistes infectivos. Los animales de sangre caliente, incluyendo los humanos, son los huéspedes intermediarios que albergan los quistes tisulares en su organismo. La infección activa generalmente se adquiere por vía oral y probablemente resulta en la colonización del parásito y producción de anticuerpos específicos durante toda la vida. En consecuencia, la prueba serológica específica para IgG ofrece la oportunidad de medir la protección individual y el impacto de la toxoplasmosis en la salud pública (estudio transversal).

El diagnóstico de la toxoplasmosis se fundamenta en el estudio de los anticuerpos producidos contra *T. gondii* y en la detección directa de éste. La mayoría de las técnicas serológicas (ELISA, IFI, entre otras), requieren de la preparación de antígenos de taquizoitos cultivados en ratón o mediante sistemas de cultivo celular; sin embargo, el uso de antígenos solubles del cuerpo lisado del parásito pueden arrojar resultados falsos positivos y falsos negativos que interfieren en la interpretación y manejo adecuado de los casos de infección (Hassl A et al. 1991); por este motivo se han desarrollado nuevas metodologías que mejoren el diagnóstico de la enfermedad con la posibilidad de ofrecer una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de la enfermedad. Una de las alternativas propuestas para ello es la utilización de la técnica la PCR, la cual ha sido aplicada como herramienta de diagnóstico de la toxoplasmosis mediante la detección del ADN del parásito en sangre, líquido amniótico y orina, permitiendo el diagnóstico temprano de toxoplasmosis congénita en gestantes con pruebas de inmunoglobulinas negativa (Blanco P et al, 2011).

Son numerosos los estudios dirigidos a evaluar los genes blancos de *T. gondii* por ensayos de PCR para el diagnóstico de la toxoplasmosis, el antígeno mayoritario de superficie de *T. gondii* (P30), es un gen de copia única con una longitud de 1500 nucleótidos el cual presenta abundantes trascriptos de RNAm y no contiene intrones (Abdul R. 2011; Burg J et al. 1988). Ensayos de PCR han sido desarrollados para amplificar el gen P30 de *T.gondii* en muestras de fluidos y tejidos del cuerpo (Savva D et al. 1990), en un estudio realizado en mujeres embarazadas de Egipto se evaluó el P30 en muestras de fluido amniótico reportándose una sensibilidad y especificidad del 92.2% y 94.4% (Eida O et al. 2009). Otro gen de interés y bastante estudiado es el gen B1 repetido 35 veces en el genoma del parasito, de función desconocida, pero bastante conservado en todas las cepas aisladas de *T. gondii* (Burg J et al. 1989), son muchos los estudios que emplean el gen B1 como blanco de amplificación, debido a que este ha mostrado una buena sensibilidad y especificidad en los ensayos de PCR basados en el diagnóstico de casos de toxoplasmosis.

En el país la técnica de PCR se ha empleado para confirmar casos de toxoplasmosis en gestantes y en recién nacidos, en un estudio realizado en la ciudad de Medellín en el cual se evaluaron 534 muestras de líquido amniótico se pudo detectar la presencia de DNA de *T. gondii* en 38 muestras lo cual corresponde a una frecuencia de 7.1% de los casos estudiados (Pujol I et al. 1999); esta técnica se ha evaluado también en otro tipo de muestras como en sangre de gestantes y recién nacido, con un estudio realizado en el departamento del Quindío en donde se estudiaron 23 muestras de madres con criterios serológicos para infección por toxoplasma (15 con líquido amniótico y 8 con sangre materna) y 12 muestras de sangre de recién nacidos las cuales fueron analizadas mediante un PCR anidado reportandose sensibilidades del 37.5% y especificidad del 100% para la detección en líquido amniótico, de las11 muestras de los recién nacidos 5 fueron positivos por PCR y de las madres ninguna tuvo PCR positivo (Higuchi R et al . 1993). La PCR anidada demostró una frecuencia de detección de ADN de *Toxoplasma gondii* del 18% en un estudio en la ciudad de Sincelejo en muestras de sangre periférica de 100 gestantes (Machado N et al. 2004), posteriormente en otro estudio realizado en esta misma ciudad se encontró una

frecuencia del 12% en muestras de sangre periférica en 100 gestantes seronegativas para la prueba Elfa IgG anti*Toxoplasma* (Pedro et al. 2011).

En los últimos años se ha buscado mejorar el diagnóstico molecular de la toxoplasmosis empleando distintas variantes de la PCR convencional como es el caso de la PCR en tiempo real, la cual se ha utilizado como herramienta diagnóstica debido a su capacidad de detectar casos de infección por *Toxoplasma gondii* (Nestor C et al . 2011). Con el desarrollo del PCR se ha buscado mejorar la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de la toxoplasmosis para lo se han evaluado dos blancos de amplificación, uno de ellos es el fragmento 529 pb repetido unas 200-300 veces en el genoma de *T. gondii* (Secuencia AF146527) utilizado para mejorar las sensibilidades y especificidades obtenidas por los ensayos de PCR (Homan W et al. 2000). En un estudio de diagnóstico de toxoplasmosis congénita, se evaluaron 3 blancos de detección de *Toxoplasma gondii*: el 18S DNAr, el gen B1 (con los primer B22/B23) y la secuencia AF146527 y los resultados arrogan una especificidad del 100%(23/23 de las muestras analizadas) y una sensibilidad del 42%(8/19 muestras analizadas) para la secuencia AF146527, mientras que para el gen B1 y el 18S DNAr la especificidades fueron del 95% y 100% respectivamente(Wahab T et al. 2010). Sin embargo, más tarde en el 2009, la secuencia AF146527 estuvo ausente en 4.8% de las muestras humanas positivas por *Toxoplasma gondii* y no fue más específico que el gen B1 (Wallon M et al. 2010). Más recientemente, se evaluó el desarrollo de un nuevo ensayo TaqMan PCR en tiempo real que emplea la actividad 5´nuclesa de la enzima Taq polimerasa, y el cual utilizó la secuencia de ADN blanco de 529 pb AF146527, con el fin de establecer el diagnóstico oportuno de la enfermedad e instaurar el tratamiento. Este estudio demostró una alta sensibilidad y especificidad del ensayo de PCR basado en la TaqMan con la utilización de la secuencia blanco AF146527 (Menotti J et al. 2010). El PCR en tiempo real se ha evaluado en muestras de sangre y fluido cefalorraquídeo de pacientes con toxoplasmosis cerebral infectados con VIH con un 97% y un 87% de sensibilidad y especificidad para el blanco de 529pb RETg; y valores de 87% y 97% de sensibilidad y especificidad respectivamente para el blanco B1, lo que sugiere que puede ser una herramienta útil en el diagnóstico de la toxoplasmosis

cerebral en pacientes con SIDA (Mesquita R et al. 2010). De lo anterior podemos concluir que la PCR en tiempo real ha mostrado ser una técnica que presenta muchas ventajas con respecto a las técnicas PCR convencionales como son: mayor sensibilidad y especificidad, es completamente automatizada lo que reduce el riesgo de contaminación y al no necesitar un paso de electroforesis permite obtener resultados confiables en un corto tiempo, todas estas características convierten a la PCR en tiempo real en una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la toxoplasmosis.

Considerando los casos de toxoplasmosis presentados en nuestro país y en distintas regiones del mundo, y la amenaza que representa en la salud del niño infectado congénitamente por *Toxoplasma gondii*, es necesario validar en Colombia nuevas metodologías que permitan mejorar el diagnóstico de esta enfermedad en términos de sensibilidad y especificidad. Con los resultados de esta investigación se espera que se mejore el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis congénita para prevenir y disminuir las secuelas de la enfermedad con el suministro del tratamiento clínico oportuno.

1.2 MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria causada por el protozoo intracelular obligado *Toxoplasma gondii* (Estrada A. 2012; Biagi, F. 2004; El-On, J. & Peiser J. 2003), este parásito puede infectar a los humanos, así como prácticamente a todos los animales de sangre caliente, incluyendo mamíferos y aves (Gangneux F & Dardé M. 2012; Dubey J. 2010; Ospina, S. 1993). La infección producida por *Toxoplasma gondii* en adultos es casi siempre asintomática (Hide G et al. 2007); sin embargo los casos graves se presentan en pacientes inmunodeprimidos y recién nacidos que han adquirido la infección congénitamente (Botero D & Restrepo M. 2003).

1.2.1 Clasificación taxonómica

Toxoplasma gondii es un protozoo patógeno intracelular obligado que fue descubierto y nombrado por Nicolle y Monceaux en 1908(Dubey J. 2009; Dubey J. 2007).La designación de especie se originó en el nombre del roedor del norte de África (Ctenodactylus gondi) de la que se aisló el parásito. El nombre del género se deriva de la palabra griega toxon, que significa "arco" y en referencia a la media luna forma del organismo (Pantoja A & Pérez L. 2001). *Toxoplasma* pertenece al phylum Apicomplexa, que consiste de parásitos intracelulares que tienen una estructura celular polarizada y citoesqueleto complejo, con una disposición de organelos en su extremo apical (Black & Boothroyd J.2000). Este parásito pertenece a:

Reino: Protista
Subreino: Protozoo
Phylum: Apicomplexa (Levine, 1970)
Clase: Conoidasida (Levine, 1988)
Subclase: Coccidiasina (Leuckart, 1879)
Orden: Eucoccidiorida (Léger and Duboscq, 1910)
Suborden: Eimeriorina (Léger, 1911)
Familia: Sarcocystidae (Poche, 1913)
Subfamilia: Toxoplasmatinae (Bicoca, 1957)
Género: *Toxoplasma* (Nicolle and Manceaux, 1909)
Especie: *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) (Gómez F, Gracia M. 2004; Ginorio D. 2001)

1.2.2 Biología del parásito

1.2.2.1 Morfología

T. gondii se presenta en tres etapas infectivas; los taquizoítos invasivos de rápida división (Fig.1), los bradizoítos de división lenta dentro de los quistes tisulares y una etapa ambiental, el esporozoíto, protegido dentro de un ooquiste (Gangneux F & Dardé M. 2012; Dubey J et al. 1998).

Las tres formas se pueden desarrollarse en el gato doméstico y otros felinos que son los huéspedes definitivos y que soportan tanto esquizogonia y gametogonia.
Sólo las formas sexuales, taquizoitos y quistes tisulares están presentes en otros animales, incluyendo los seres humanos y aves, que son los anfitriones intermediarios.
Tanto los taquizoitos y quistes tisulares son infecciosos por ingestión.

Taquizoitos: Estas etapas infectivas son células en forma de media luna, tienen un tamaño aproximadamente de 5 um de longitud y 2 um de ancho, con un extremo apical puntiagudo y un extremo posterior redondeado (Fig. 1 y 2.A).

Están limitados por una membrana compleja, llamada la película, estrechamente asociado con un citoesqueleto que participan en la integridad estructural y la motilidad de la célula. Estos poseen una pared celular y una membrana citoplasmática, un sistema apical constituido por un conoide heterogéneo, implicado en los procesos de invasión celular; las roptrias, las cuales son estructuras alargadas con una probable función secretora de enzimas líticas (Dubremetz J. 2007); los sarconemas; los gránulos lipídicos dispersos por todo el citoplasma; núcleo, con un gran cariosoma central (Mondragón M et al. 2005 & Nishi M et al. 2008); mitocondrias; vacuolas; retículo endoplasmático; aparato de golgi; y plástidos unidos a membranas multiples semejantes a un orgánulo llamado apicoplasto, el resultado de una posible adquisición

por el parásito a través de una endosimbiosis secundaria de un alga roja de vida libre (Roos DS, et al. 1999).

Taquizoítos, forma activa de replicación, responsable de la diseminación de la infección y de la destrucción tisular (**Uribarren T. 2007**). Se le encuentra en sangre y tejidos durante la infección aguda (Black & Boothroyd J.2000).

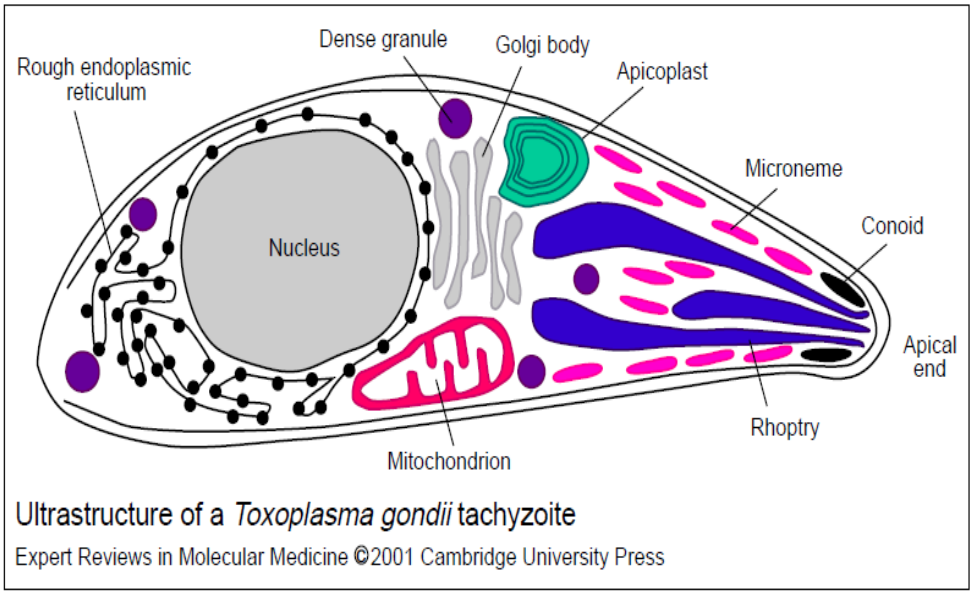


Figura 1. Ultraestructura del Taquizoito de *T.gondii*. Ajioka J, Fitzpatrick J and Reitter C. Expert Reviews in Molecular Medicine: **http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk**. 2001.

Bradizoítos: resultan de la conversión de los taquizoitos en una etapa de división lenta y forman los quistes tisulares (Fig. 2.B). Estos quistes son más o menos esferoide en las células del cerebro o alargados en las células musculares. Su tamaño varía entre 10um para los quistes más pequeños, que sólo contienen dos bradizoítos, hasta 100 um para los más grandes, que contienen cientos o miles de bradizoítos densamente empaquetados. La pared del quiste consiste en una membrana limitante presenta numerosas invaginaciones y una capa subyacente de material granular denso en electrones (Ferguson D. 2004). Bradizoítos tienen un metabolismo latente, adaptados a

largos periodos de supervivencia. Los quistes permanecen en forma intracelular durante toda su vida.

Esporozoítos: se encuentran dentro de los ooquistes maduros. Los ooquistes son estructuras ovoides de 12 a 13 um que después de esporulación contienen dos esporozoitos, cada uno contienen cuatro esporozoitos (Fig 2.C). La pared del ooquiste es una estructura extremadamente fuerte de múltiples capas que protege al parásito de daños mecánicos y químicos; permitiéndole al parásito sobrevivir durante largos períodos, hasta más de un año, en ambientes húmedos (Fig 2.C) (Mai K, et al. 2009).

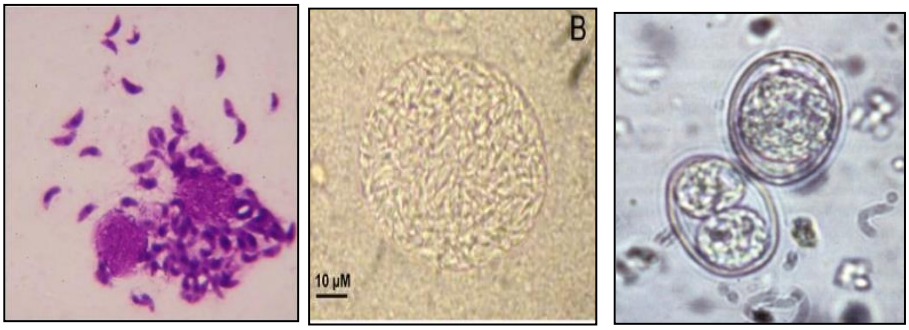


Figura 2. Estados Biológicos de *T. gondii*. A. Taquizoitos en muestras de lavado de fluido broqueoalveolar. B. Quistes en cerebro de ratones infectados. C. Ooquistes no esporulados y Ooquistes esporulados.

1.2.2.2 Ciclo de vida

T. gondii es un coccidio que forma quistes tisulares que funcionan en un sistema predador-presa que se alterna entre hospedadores definitivos (reproducción sexual) e intermediarios (reproducción asexual). Es único entre este grupo que puede ser transmitido no solo entre hospederos intermediarios y definitivos (ciclo sexual) sino también entre huspedes intermediarios a través de carnivorismo(ciclo a sexual) o incluso entre hospederos definitivos. Las fases de los ciclos sexuales y asexuales y la dinámica de transmisión en un ambiente determinado varían según las características

físicas y de acuerdo a las estructuras de ambas poblaciones de huéspedes intermediarios y definitivos (Alfonzo E et al. 2006).

La reproducción sexual sólo ocurre en los felinos (gatos domésticos y silvestres). Después de la ingestión de quistes presentes en los tejidos de los huéspedes intermediarios, la pared del quiste es destruida por enzimas gástricas. Los bradizoítos se establecen dentro de los enterocitos, donde son sometidos a un número auto-limitado de multiplicaciones asexuales, que se caracteriza por el desarrollo de merozoitos dentro de esquizontes (Fig. 3) (Dubey JP. 1998).Este primer paso es seguido por el desarrollo sexual, con la formación de gametos masculinos y femeninos (gametogonia)(Ferguson D. 2002).Después de la fertilización, los ooquistes formados dentro de los enterocitos son liberados por ruptura celular y son expulsados en formas no esporuladas en las heces de gato (Fig. 3). El proceso de esporogonia ocurre después de pocos días en el medio ambiente. Esto implica una reducción meiótica y cambios morfológicos que llevan a la formación ooquistes esporulados con dos esporocitos, cada uno contiene cuatro esporozoítos haploides. La liberación de ooquistes comienza de 3 a 7 días después de la ingestión de quistes tisulares y puede continuar hasta por 20 días. Los gatos infectados pueden liberar más de 100 millones de ooquistes en sus heces (Jones J, Dubey J. 2010; Dubey J, Frenkel J. 1972). Pueden infectar un amplio rango de huéspedes intermediarios, prácticamente todos los animales de sangre caliente, desde mamíferos a aves, cuando son ingeridos en los alimentos o agua. Los ooquistes también pueden ser infectivos en los gatos, aunque con menos eficiencia. Dentro de los huéspedes intermediarios, el parásito sufre solo desarrollo asexual. Después de la ingestión de ooquistes, los esporozoítos son liberados. Ellos penetran en el epitelio intestinal, donde se diferencian en taquizoítos. Los taquizoítos se replican rápidamente por endodiogenia dentro de cualquier tipo de célula y se diseminan por todo el organismo. A consecuencia de la conversión de taquizoítos a bradizoítos, los quistes tisulares se originan a partir de los 7 a 10 días pos infección y pueden permanecer durante toda la vida de los huéspedes, predominantemente en cerebro o musculo.

Tras la ingestión de estos quistes tisulares por un huésped intermediario a través del consumo de carne cruda o poco cocida, los quistes se rompen a medida que pasan a través del tracto digestivo, causando la liberación de bradizoitos. Los bradizoitos infectaran el epitelio intestinal de nuevos huéspedes y se diferenciaran nuevamente a estado de taquizoíto de rápida división para diseminarse a través del organismo (Figura. 3). Además, si durante el embarazo se produce la fase aguda, el parásito puede atravesar la placenta e infectar al feto (transmisión congénita).

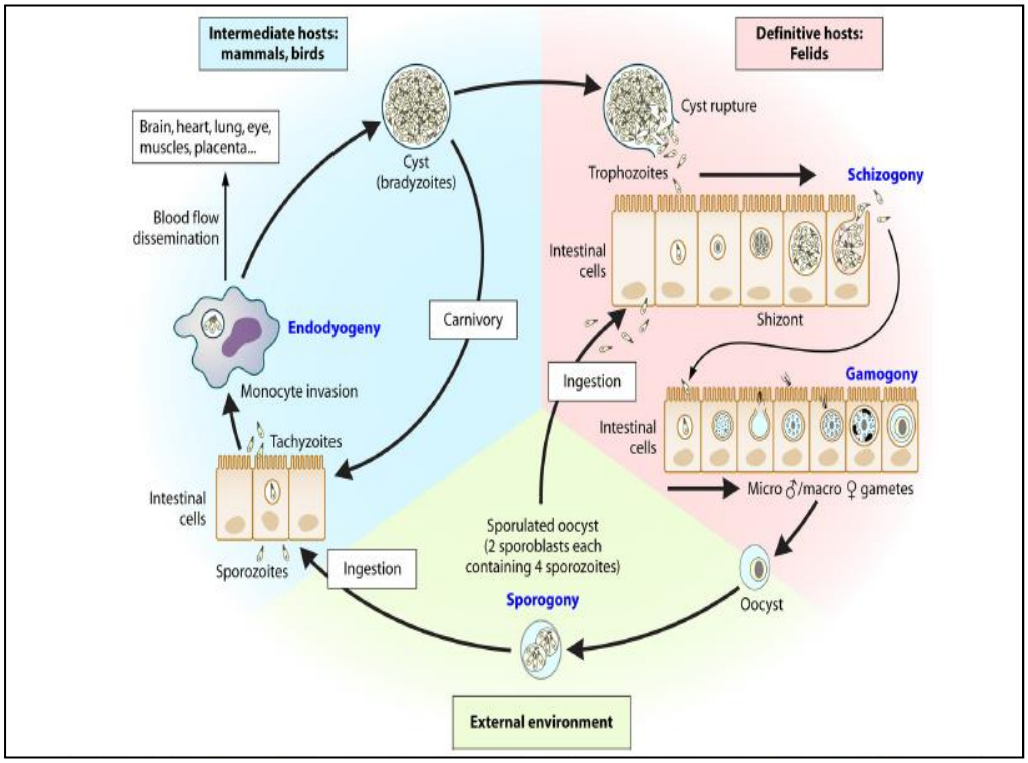


Figura 3. Ciclo de vida de *T. gondii*. Se muestra la biología, infección y replicación de los tres estados del parásito en sus respectivos. Gangneux F & Dardé M. Clin. Microbiol. Rev. 2012, 25(2):264.

1.2.2.3 Mecanismos de invasión celular

T. gondii es capaz de migrar a lo largo del cuerpo del huésped; atravesar barreras biológicas, entrar activamente al torrente sanguíneo, invadir células nucleadas y penetrar a sitos biológicos no permisivos como la barrera hematoencefálica, la

placenta, y las paredes del intestino (Barragan A & Sibley D. 2003). Al mismo tiempo, el parásito minimiza la exposición a la respuesta inmune del huésped, por su rápida entrada y salida de las células. Estas dos funciones comparten mecanismos comunes que dependen de la regulación de Ca^{2+} (Hoff E, Carruthers V. 2002).

A diferencia de muchas bacterias y virus, *T. gondii* entra activamente a la célula, por un mecanismo que es mediado por el citoesqueleto del parásito y regulado por la vía de secreción dependiente de calcio específica del parásito (Barragan A, Sibley LD. 2003; Black M, Boothroyd J. 2000).El proceso activo de invasión está basado en la motilidad y secreción de proteínas por parte de orgánulos secretores del parásito, tales como los micronemas, las rhoptries, y los gránulos densos.

La fijación a la membrana de la célula huésped es un paso previo a la invasión. El cual requiere de la secreción de adhesinas dependientes de calcio de los micronemas, tales como las proteínas de los micronemas MIC2, que reconocen los receptores de la célula huésped y promueven la reorientación y fijación del parásito. La invasión celular se basa en una compleja interacción entre la superficie de la célula huésped y el parásito, un proceso llamado motilidad por deslizamiento (gliding), este proceso es promovido por un sistema motor lineal intrincado promovido por interacciones actina-miosina y los reordenamientos dinámicos del citoesqueleto del parásito (Carruthers V, Boothroyd J. 2007).La entrada es proceso rápido (15 a 30 s) de los distintos eventos endocíticos actualmente conocidos del huésped. *Toxoplasma* forma una estrecha asociación entre su extremo apical y la membrana de la célula huésped, llamada unión en movimiento.Esta estructra se mueve desde el extremo apical a el extremo posterior del parásito, conduciendo a la internalización del parásito dentro de una vacuola parasitófora (PV). El establecimiento de esta unión en movimiento alrededor del parásito invasor requiere la distribución de un antígeno de membrana apical (AMA1) sobre toda la superficie del parásito, también secretado por los micronemas, y de la secreción de las proteínas del cuello de las roptrias (RONs), insertadas en la membrana de la célula huésped (Dubremetz J. 2007).La formación de la membrana naciente de la vacuola parasitófora (PVM) requiere de la secreción de proteínas de las roptrias. En los últimos años, se ha reconocido el papel importante de las proteínas de la familia ROP2. De estas proteína, ROP18 está asociada con la superficie citosólica de

la PVM y ejerce una actividad de proteína quinasa, la cual tiene un efecto profundo en el crecimiento y virulencia del parásito (El Hajj H, et al. 2007), y ROP16 que es capaz de manipular la expresión de los genes del huésped, afectando la secreción de interleucina (Laliberte J, Carruthers V. 2008).

Además de las proteínas de ROP, las proteínas de los gránulos densos también contribuyen a la formación de la PVM durante la primera hora después de la invasión.La mayoría de las proteínas transmembranas del huésped son eliminadas de la PVM durante el proceso de invasión; este proceso modifica las características bioquímicas de la PVM y evita la fusión con los lisosomas o cualquier vesícula citoplasmática. Las secreciones de los gránulos densos también apoyan el desarrollo de una compleja red de túbulos de membrana que se desarrollan desde la PVM y se extienden hacia el lumen vacuolar (Mercier C et al. 2005). Se cree que esta red cumple un papel en el desarrollo de intercambios entre el parásito y la célula huésped, transportando nutrientes desde el citosol de la célula huésped o exportando proteínas o lípidos desde el parásito hacia la PVM o la célula huésped. La PVM también está estrechamente relacionada con la mitocondria de la célula huésped, lo cual contribuye al metabolismo del parásito. Dentro de la PV, los taquizoítos se dividen durante un ciclo de 6 – 9 horas, por un proceso de endodiogenia, que conduce a la formación de dos células hijas dentro de cada célula madre. Ellos salen de la célula por lo general después haberse acumulado de 64 a 128 parásitos en la PV (Black M, Boothroyd J. 2000). Su salida de la célula es un proceso activo que depende de un aumento en la concentración de calcio luego de la liberación de los compartimientos intracelulares (Sibley LD. 2010).

1.2.3 Patogenia

La patogenia de *T.gondii* se debe a su multiplicación activa en los tejidos del hospedero durante la fase aguda de la infección; para ello los quistes y ooquistes ingeridos del parásito deben pasar la barrera natural del jugo gástrico y así dar lugar a la liberación de los bradizoitos y esporozoitos en la luz del intestino (Carrada T. 2005); después de su penetración en una célula, el parásito es separado del citoplasma celular por una

vacuola sintetizada conjuntamente por él y la célula hospedadora, en el interior de la cual los taquizoitos se multiplican formando clones o pseudoquistes; cuando el número de taquizoitos es muy elevado la célula se rompe, liberándolos al medio extracelular para invadir macrófagos y otras células nucleadas (Sandoval I et al.2003) gracias a sus movimientos y a la producción de hialuronidasas y lisozimas, de esta forma parasitan por vía linfohematógena una variedad de órganos particularmente tejidos linfáticos, músculo esquelético, miocardio, retina, placenta, y más frecuentemente, el sistema nervioso central (Sandoval I et al .2003).

Su multiplicación en los diferentes tejidos da lugar a pequeños focos de necrosis rodeados de células inflamatorias, especialmente mononucleares (Sandoval I et al .2003).Este período de proliferación corresponde a la fase aguda de la toxoplasmosis y es aquí donde el parásito es más vulnerable a los fármacos. La extensión de la necrosis tisular y la diseminación dependen de la eficacia de los mecanismos inmunológicos humorales y celulares del hospedero, incluso después de la respuesta inmunológica efectiva, no se erradican los microorganismos formándose algunos quistes tisulares que permanecen latentes toda la vida del huésped (Martín I & García S. 2003; Ospina, S. 1993).

En los pacientes VIH positivos cuando se produce depresión de su sistema inmune, la proliferación activa de los microorganismos puede causar la reactivación de la enfermedad local y su diseminación. La localización de los quistes se encuentra con preferencia en las células del sistema nervioso central, coriorretina y músculos (esquelético y miocardio). Ocasionalmente los quistes pueden romperse y dejar en libertad los bradizoitos; si son muchos los que se rompen se produce una reactivación de la enfermedad, que puede ser localizada o generalizada (Martín I & Garcia S et al 2003; De Miguel J et al .2002).

En el embarazo, mediante la diseminación hematógena, los taquizoitos llegan a la placenta, aquí se reproducen y forman acúmulos, tanto en el corión como en la decidua y aún en el cordón umbilical (Arias A. 2002). La transmisión al embrión o feto ocurre por

un mecanismo de pinocitosis, aunque se admite el paso a través del líquido amniótico por deglución fetal y sigue la secuencia: infección aguda, parasitemia materna, infección placentaria, parasitemia fetal (Nazan Dalgıç. 2008; Martín I & García S. 2003).

El curso de la infección de la toxoplasmosis en seres humanos y modelos animales puede verse afectado por el tamaño del inóculo, la virulencia del organismo, el sexo, y el estado inmunológico. Por otra parte, se ha reportado que el background genético cumple un papel importante en el aumento de la susceptibilidad a *T. gondii* en los seres humanos; y se ha sugerido que la HLA - DQ3 puede ser un marcador genético asociado con la susceptibilidad a desarrollar encefalitis toxoplasmica (Mack D et al 1999).

1.2.4 Vías de transmisión

Las principales rutas de transmisión del parásito *T. gondii* se presentan por vía horizontal y vertical, sin embargo, el mayor número de transplantes de órganos, y la transfusión de sangre o leucocitos hacen posible la transmisión (Biagi, F. 2004). Otras formas de entrada del parásito la constituye las vías respiratorias, mucosal (conjuntival) y cutánea siendo éstas menos frecuentes (Martín I. 2004).

1.2.4.1 Transmisión Horizontal

La mayoría de las transmisiones horizontales a los seres humanos se producen por la ingestión de carne cruda o poco cocida que contenga quistes tisulares, o por la ingestión de ooquistes excretados por las heces de gatos parasitados y madurados en el ambiente(Martín I. 2004). La contaminación de aguas u hortalizas por ooquistes, o la manipulación de tierra o plantas que estén en contacto con excrementos de gato, pueden facilitar la contaminación de los alimentos crudos o la transmisión por vía oral, a través de las manos (Conrada A et al. 2005) Una vez ingeridos, la pared externa de quistes y ooquistes se rompe por digestión enzimática y las formas infecciosas del

parásito son liberadas a la luz del intestino para invadir rápidamente las células colindantes (Black M & Boothroyd J. 2000).

1.2.4.2 Transmisión Vertical

Se produce en mujeres embarazadas cuando son afectadas por una infección primaria con los taquizoitos en fase de división rápida, circulando por el torrente sanguíneo; generalmente tiene lugar en el curso de una infección materna silenciosa o sin diagnosticar (Rorman E et al.2006).Diversos factores como el inóculo parasitario, la virulencia de la cepa y el estadio evolutivo de la placenta van a condicionar la posibilidad de una infección fetal que se incrementa con la edad de la gestación (De Miguel J et al .2002), siendo mayor durante el tercer trimestre. Por otra parte, el grado de afectación fetal es mayor cuando la infección se produce en las primeras semanas del embarazo (Gangneux F & Dardé M. 2012; Carrada T. 2005; Gagne S. 2001).

1.2.5 Respuesta inmune frente a *T.gondii.*

La respuesta inmune para la infección con *T.gondii* varía considerablemente dependiendo de la presentación clínica de la enfermedad. La respuesta inmune local y sistémica puede variar entre individuos y la respuesta inmune parece depender fuertemente del background y estado inmunológico del huésped (Suzuki Y, Remington JS ,1993). Teniendo en cuenta que la infección natural en los seres humanos en la gran mayoría de los casos pasa desapercibida o los signos y síntomas se desarrollan sólo semanas después de la infección, muy pocos estudios se han realizado para dilucidar respuesta inmune frente a *T. gondii* en humanos (Luft B, Remington J. 1992). La respuesta inmune contra este parásito, implica tanto la inmunidad humoral (anticuerpos) como la celular (linfocitos T y sus productos) (Pfaff A et al. 2007).

La respuesta inmune humoral en mucosas inicia con la producción de IgA en respuesta a la infección por el parásito a nivel de intestino. Este anticuerpo constituye más del 80% de anticuerpos en mucosas y ha demostrado ser indicador importante de la

infección y excelente modulador de la protección a reinfecciones. Puede ser detectada luego de dos semanas iniciada la infección, manteniendo títulos entre 5 días y 4 semanas (Schulthess et al., 2008) (Figura 4).

Si el parásito evade la respuesta inmune de las mucosas, se promueve rápidamente la producción de niveles detectables de IgM e IgG en suero, siendo estos de vital importancia en el diagnóstico de la toxoplasmosis en humanos (Waree, 2008). La evolución de anticuerpos inicia con niveles elevados de IgM que aparecen de 1 a 2 semanas post-infección, mantienen un pico durante aproximadamente 2 meses y descienden lentamente durante 6 a 9 meses. Los títulos de IgG aparecen de 1 a 2 semanas después de la aparición de la IgM, ascienden lentamente hasta alcanzar su pico (± 1000 UI/ml) a los 2 a 4 meses iniciada la infección para luego descender y permanecer positivos durante toda la vida del hospedero (Jenum & Stray-Pedersen, 1998) (Figura 4).

Los anticuerpos IgG específicos, al parecer, se dirigen contra determinantes antigénicos proteicos de la superficie del taquizoito; esto y su capacidad para la fijación del complemento resulta en un mecanismo de resistencia a la infección, puesto que los taquizoitos opsonizados son susceptibles a la destrucción por la vía lisosomal en las células fagocíticas (Munoz et al., 2011). A pesar de que la producción de anticuerpos promueve la opsonización, la fagocitosis y la activación del complemento, la inmunidad humoral no constituye el mecanismo efector más eficiente contra la replicación del parasito.

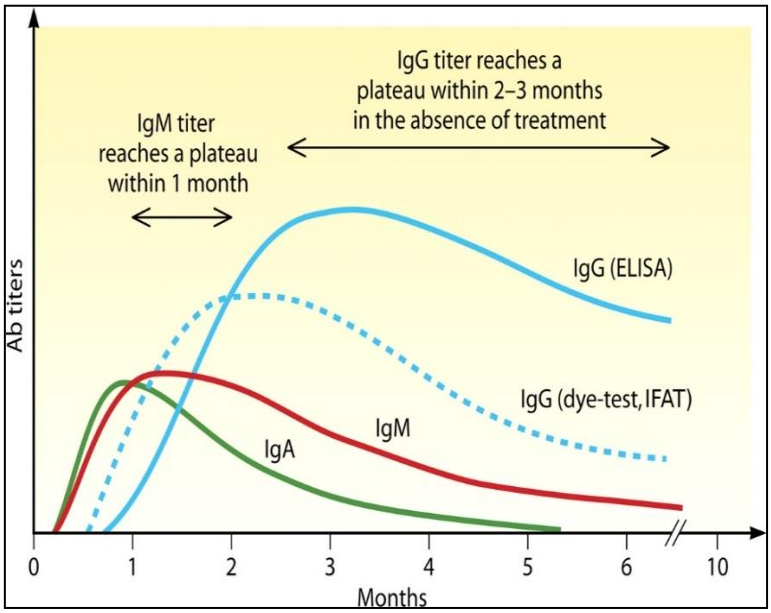


Figura 4. Cinética de los anticuerpos durante la infección por *T.gondii.* Gangneux F & Dardé M. Clin. Microbiol. Rev. 2012, 25(2):264.

La respuesta inmune celular inducida por *T. gondii* se caracteriza por limitar la replicación de taquizoitos durante la fase aguda de la infección y por promover el establecimiento de las formas latentes del parásito (Hunter & Sibley, 2012). Al ser estimulados por los taquizoitos, los macrófagos producen IL-12, la cual activa las células NK y los linfocitos T para producir IFN-γ; crucial para la resistencia contra el parásito. El IFN-γ y el TNF-α actúan sinérgicamente para mediar la eliminación de taquizoitos por parte de los macrófagos. La combinación de estas citoquinas resulta en una mayor producción de radicales libres y de óxido nítrico importantes en el control de la replicación de taquizoitos (Munoz, Liesenfeld, & Heimesaat, 2011; Waree, 2008). Los linfocitos T CD4+ y CD8+ son consideradas las principales células efectoras responsables de la protección contra *T. gondii*. Los linfocitos T CD8+ secretan IFN-γ y exhiben in vitro actividad citotóxica contra células infectadas. Los linfocitos Th1 producen IFN-γ e IL-2, la cual induce la activación de células NK y de linfocitos T que actúan de manera citotóxica contra células infectadas por *T. gondii*; mientras que los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10 asociadas con la regulación negativa de la inmunidad protectiva mediada por células (Filisetti & Candolfi, 2004; Munoz et al., 2011) (Figura. 5.A,B).

(A) (B)

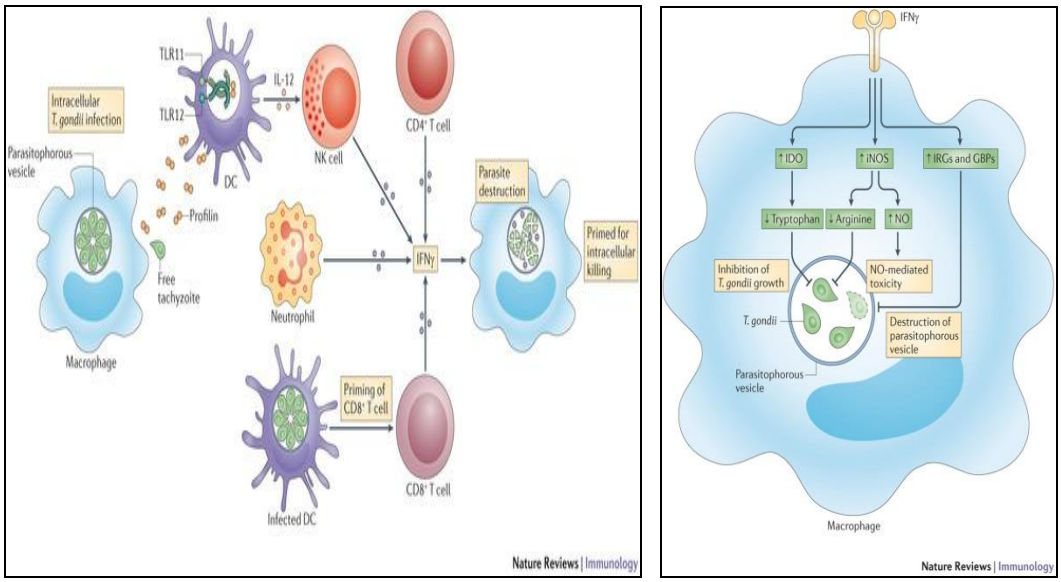


Figura 5. Respuesta immune imnata frente a *T.gondii*. A. Fuentes celulares de IFN-y durante la infección por *T.gondii*. B. Mecanismos efectores para la eliminación del parásito en las células infectadas mediado por IFN-y. **Yarovinsky** F. Nature Reviews Immunology; 2014:14,109–121.

1.2.6 Genética del parásito

El genoma de *Toxoplasma gondii* consta de tres componentes de ADN, los cuales se localizan en el núcleo, apicoplastos, y mitocondrias. El genoma nuclear es haploide para la mayoría de los estadíos, excepto por una breve fase diploide en el intestino del gato antes de la meiosis (Ajioka J et al. 2001). Este parásito posee un genoma nuclear de 65 Mb, constituido por 14 cromosomas, los cuales comprende un tamaño genético total de 592 cM y un promedio de unidades genéticas de 104 kb/cM (Figura. 6). *T. gondii* también posee un genoma mitocondrial de 6 kb y un genoma episomal de 35 kb conocido como plastidios (Khan A et al.2005).

El proyecto del genoma de *Toxoplasma* predice alrededor de 8000 genes con diferentes grados de confianza. A través del empleo de herramientas biológicas, como la proteómica y los EST (expressed sequence tag) han sido identificados cerca de un

tercio (2.252) del total de las proteínas del parásito (Dong Xia et al. 2008). Estudios han revelado la presencia de un gran número de genes que codifican para distintas proteínas del parásito, dentro este grupo de genes podemos mencionar la superfamilia de genes SRS de *T.gondii que* están relacionados estructuralmente con SRS29B (anteriormente SAG1), una adhesina de superficie que se une a la célula huésped y estimula la inmunidad del huésped. Los análisis genómico comparativo de las tres cepas de *Toxoplasma* identificaron 182 genes SRS distribuidos a través de 14 cromosomas en 57 loci del genoma (Figura. 6) (Wasmuth JD, et al. 2012).

Toxoplasma gondii posee una familia multigénica específica que solo está presente en este organismo, sin homólogos en otras especies: una familia denominada familia-específica de *Toxoplasma* (TSF). Esta familia se localiza en gran parte en las regiones cromosómicas sin similitud con *N. caninum* (regiones 3, 5 y 17) y varía en tamaño entre las cepas de *T. gondii*. Todos los diez miembros de TSF de *T. gondii* ME49 fueron expresados durante la etapa de taquizoitos.
Motivos ricos en lisina-arginina están sin embargo presente en secuencias que sugiere posibles señales de localización nuclear. Por ello, hemos llamado a esta familia rica en lisina-arginina de función desconocida (KRUF). Los genes KRUF parecen estar expandido grandemente en la cepa GT1 de *T. gondii,* con un máximo de veinte miembros (Gajria B et al.2008) y se expresan en niveles muy altos en las etapas de taquizoitos y bradyzoite.

La familia ApiAP2 representa el mayor grupo de factores de transcripción de los apicomplexas. Ellos han sido implicados, por ejemplo, en el control del ciclo de desarrollo intraeritrocítico (IDC) (Painter H et al. 2011) y el desarrollo de esporozoitos (Yuda M et al. 2010) En *Toxoplasma* estos genes son importantes para la regulación de la expresión de genes de invasión.

Los análisis en genética de población basados en RFLP indican que *T. gondii* presenta tres linajes clonales definidos: tipo I, tipo II y tipo III (Khan A et al. 2007; Lehmann T et al. 2006; Nowakowska D et al. 2006; Gallego D. 2005) que corresponde al análisis del

locus polimórfico del antígeno de superficie SAG2. El tipo I está más frecuentemente asociado con casos graves de toxoplasmosis congénita por su alta capacidad migratoria en la matriz extracelular (Su C et al. 2002); el tipo II se ha encontrado en casos de reactivación en pacientes con sida, debido al alto potencial de desarrollar bradizoitos que incrementan la formación de quistes cerebrales; el tipo III se ha aislado comúnmente de animales y, ocasionalmente, en casos humanos (Gallego D. 2005).

La publicación relativamente completa de conjuntos de datos de marcadores de secuencias expresadas (EST) al dominio público ha facilitado en gran medida una serie de estudios que permiten comparar las diferentes cepas de *T. gondii*. *Toxoplasma* tiene una estructura poblacional altamente clonal en Europa y Norteamérica (Grigg M et al. 2001; Sibley L & Boothroyd J.1992), mostrando comparativamente baja divergencia dentro de linajes y comparativamente alta divergencia entre el linaje [aproximadamente un 0,5% y el 5% a nivel del ácido nucleico, respectivamente (Grigg M et al. 2001; Oyle J et al.2006). Cuando los EST existentes de cada uno de los tres linajes fueron agrupados a un proyecto del genoma ME49, diferentes regiones del genoma, y eventualmente los cromosomas totales, mostraron el mismo patrón ancestral (Oyle J et al.2006) y proporcionó un fuerte apoyo a que una cepa de tipo II tuvo un progenitor de ambos tipo I y tipo III y que estos dos linajes dominantes emergieron de un número muy limitado de cruces genéticos (Oyle J et al.2006). Estos patrones han sido confirmados por análisis posteriores de datos de la secuencia completa del genoma. Por ejemplo, un aislado de *T. gondii* ugandés (TgUgCK2) se secuenció completamente utilizando pirosecuenciación 454, y basados en comparaciones de SNP de todo el genoma se encontró que se originaban de un cruce relativamente reciente entre los miembros de los linajes tipo II y tipo III (Adomako Y et al. 2012; Bontell I et al. 2009).

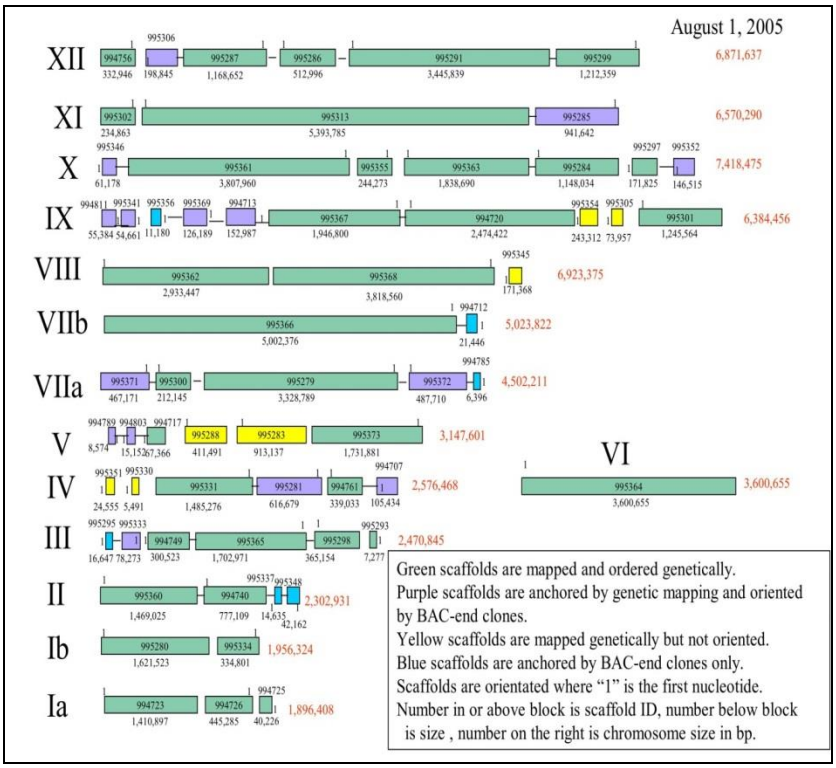


Figura 6. Representación esquemática del genoma de *T.gondii*. Khan A et al**.** Nucleic Acids Research, 2005;33(9):2980-2992.

1.2.7 Epidemiología

Estudios realizados sobre toxoplasmosis a nivel mundial han mostrado una variación en cuanto a la prevalencia e incidencia de la enfermedad, lo cual se ha relacionado con las diferentes condiciones geográficas, hábitos alimenticios y condiciones higiénico-sanitarias (Petersen E. 2007) ; es así como en Europa, la alta prevalencia de la infección ha sido atribuida al consumo de carne cruda o poco cocida, mientras que la alta prevalencia en América Central y otros países en vía de desarrollo ha sido atribuida al bajo estatus socioeconómico y la frecuencia de gatos callejeros en clima favorable para la supervivencia de los ooquistes de *T. gondii*. Además, se ha establecido que la infección es más frecuente en lugares de climas cálidos y de altitudes bajas que en regiones montañosas de clima frío y seco (Elsheikha H. 2008).

La prevalencia de la infección por *T. gondii* en mujeres embarazadas en Europa es de 7.7 a 45%; en países de África se han reportado prevalencias de 53,6 a 78%, en Asia de 10.9 a 75.2% (Chien-Ching H et al 2007), y en Latinoamérica 51–72% (Rorman E et al 2006).

En Colombia, de acuerdo con el Estudio Nacional de Salud realizado entre 1977 y 1980, la tasa de seroprevalencia en mujeres en edad fértil varió entre 42,5% y 54,4%, siendo mayor en las regiones Atlántica y Oriental y menor en las regiones Pacífica y Central (Rosso F et al. 2007). En los últimos años, se han realizado diversos estudios en diferentes regiones del país para establecer cifras de prevalencia e incidencia de la infección producida por *T. gondii* en embarazadas, es así como, se han reportado prevalencias del 60% en Quindío, 58% en Cesar, 46,2% en Valle del Cauca y 56% en el departamento de Sucre con una incidencia del 2% (Rosso F et al. 2007; Machado N et al. 2004).

1.2.8 Manifestaciones clínicas

En personas inmunocompetentes, sólo 10-20% de las infecciones son sintomáticas (Ginorio D. 2001). El curso suele ser benigno y autolimitado; generalmente se manifiesta por linfadenopatía cervical no dolorosa, sin supuración, acompañada o no por fiebre, faringitis, exantema maculopapular, mialgias, hepatoesplenomegalia y linfocitos atípicos (Carrada T. 2005).

1.2.8.1 Toxoplasmosis congénita

La transmisión al feto ocurre principalmente en mujeres que adquieren la infección primaria durante el embarazo (Montoya J & Remington J. 2008). La transmisión congénita, en raros casos, ha sido detectada en mujeres embarazadas con infección crónica cuya infección ha sido reactivada debido a su condición de inmunocomprometida (Garweg J et al. 2005; Liesenfeld O et al 1997).La transmisión

materno fetal se produce entre 1 y 4 meses después de la colonización de la placenta por parte de los taquizoítos. La placenta permanece infectada durante el embarazo, y por lo tanto sirve de depósito para el suministro de organismos viables al feto durante todo embarazo (Dubey J et al .2009; Cook A et al. 2000). La toxoplasmosis congénita clásica se caracteriza por la tétrada descrita por Sabin en 1942: coriorretinitis, hidrocefalia, calcificaciónes intracraneales y convulsiones (Paquet C et al. 2013) (Imagen 1. A y B).

Los recién nacidos infectados durante el primer trimestre de gestación, entre el 10 y 23% muestran signos clínicos de toxoplasmosis al nacer. Los signos clásicos de la toxoplasmosis (retinocoroiditis, calcificaciones intracraneales e hidrocefalia) se manifiestan en el 10% de estos recién nacidos, mientras que el otro porcentaje muestra una variedad de síntomas, que van desde alteración del SNC hasta síntomas no específicos de infección aguda (retinocoroiditis, convulsiones, hepatoesplenomegalia, fiebre, anemia, ictericia, linfoadenopatías, etc.). Aproximadamente, el 12 - 16% de estos recién nacidos mueren por la enfermedad. Los infantes sobrevivientes sufren de retraso mental progresivo u otras deficiencias neurológicas (J. Remington, McLeod, Wilson, & Desmonts, 2011; Tenter et al., 2000).

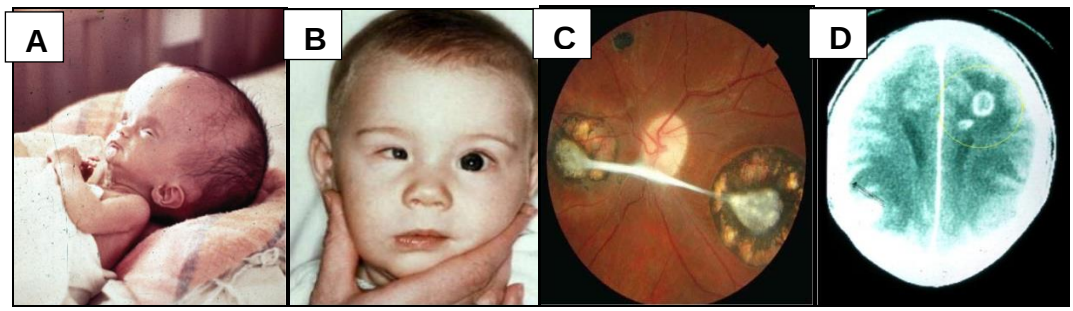
Cuando la transmisión congénita ocurre en estados tardíos del embarazo, los efectos en el feto son menos severos y más del 80% de neonatos que adquieren la infección durante el tercer trimestre de gestación desarrollan la enfermedad de manera asintomática. En aproximadamente el 60 – 80% de estos recién nacidos infectados prenatalmente, la infección es subclínica y puede ser diagnosticada principalmente por métodos serológicos (Rorman, Zamir, Rilkis, & Ben-David, 2006). Aunque estos infantes parezcan saludables al nacer, pueden desarrollar síntomas clínicos y deficiencias más tarde en la vida que afectan principalmente ojos (retinocoroiditis, estrabismo, ceguera), SNC (deficiencia psicomotriz, convulsiones, retardo mental) u oído (sordera) (Kieffer & Wallon, 2013; Kravetz & Federman, 2005; Solís, 2010).

1.2.8.2 Toxoplasmosis ocular

La toxoplasmosis ocular es una enfermedad producida por *T. gondii* a través de la rutas congénita y adquirida (Park Y & Nam H. 2013).Esta parasitosis afecta la retina y las coroides subyacentes, causando retinocoroiditis, la manifestación más común de la toxoplasmosis ocular (Smith & Cunningham, 2002). La retinocoroiditis se describe como lesiones maculares pigmentadas con un área central necrótica, las cuales se puede observar mediante el examen del fondo del ojo. En más de 50% de los casos de toxoplasmosis congénita ocular, las lesiones se encuentran en el polo posterior de la retina (Kaye A. 2011; Bonfioli & Orefice. 2005).

1.2.8.3 Toxoplasmosis cerebral

La toxoplasmosis cerebral resulta de un estado de inmunodeficiencia y constituye la infección más oportunista en pacientes con VIH- SIDA (López M. 2009).El cuadro clínico se debe a una reactivación latente del parásito, esta enfermedad se presenta con abscesos cerebrales múltiples, cuando la cuenta total de CD4 es menor de 200 células/mm^3 (Imagen 1.D). La infección del sistema nervioso por toxoplasmosis ocurre en el 40% de los pacientes con SIDA y es la enfermedad oportunista más frecuente del sistema nervioso central. La encefalitis toxoplásmica es la manifestación clínica más común y ocasiona a los pacientes síntomas como: cefalea, fiebre, deterioro de la conciencia (confusión mental, letargia), trastornos cognitivos y conductuales, focalidad motora, convulsiones focales, parálisis de los pares craneales, ataxia, trastornos cerebelosos, trastornos sensoriales, ceguera cortical y neuropatía periférica (Casanovao R et al.2002).



Imágen 1. Manifestaciones clinicas de la toxoplasmosis: A**. Hidrocefalia,** B**. Microglia**, C**. Retinal scars linked by vitreous strand in congenital toxoplasmosis.,** D. **Toxoplasmosis cerebral. Tomado de las pagina web: http://www.studyblue.com/notes/note/n/toxoplasma-gondii/deck/5152748 y del artículo de Commodaro A et al.Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009; 104(2):345-350.**

1.2.9 Técnicas de diagnóstico

Los métodos usados para el diagnóstico de la toxoplasmosis difieren en las distintas situaciones clínicas, según se quiera demostrar: infección adquirida en el inmunocompetente, toxoplasmosis en el inmunodeficiente, toxoplasmosis ocular o infección fetal. Dado que la mayor parte de las veces los síntomas no existen o son poco específicos, el diagnóstico se fundamenta en el estudio de los anticuerpos producidos contra el parásito y en la detección directa de éste. Varias técnicas de laboratorios son empleadas en el diagnóstico de la toxoplasmosis es decir, aislamiento, serología, análisis de proteínas y pruebas moleculares.

1.2.9.1 Aislamiento del parásito

El aislamiento de *Toxoplasma* de sangre u otros fluidos biológicos permite establecer el diagnóstico de infección aguda y puede realizarse por inoculación en ratones de laboratorio (Desmonts et al, 1985) o el cultivo celular en fibroblastos humanos (Hofflin & Remington, 1985). El inconveniente del primero radica en que es un método que consume mucho tiempo para obtener los resultados (3 a 6 semanas) y en el segundo

caso aparte del tiempo (4 a 15 días) son muy frecuentes las contaminaciones (Priya et al, 2002).

1.2.9.2 Pruebas serológicas

Existen varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos de *T. gondii* como DT (Sabin y Feldman, 1948), IFAT, la HAI (Jacobs y Lunde, 1957), CFT, MAT (Desmonts y Remington, 1980), LAT y DAT (Dubey y Desmonts, 1987;. Devada et al, 1998).

1.2.9.2.1 Prueba del azul de metileno (Dye Test)

Es la “gold standard” de las pruebas serológicas para la detección de los anticuerpos contra *T. gondii* en seres humanos. Mide preferentemente anticuerpos de tipo IgG, es una prueba serológica altamente específica y sensible, pero cuyas dificultades técnicas y su peligro al usar parásitos vivos, limitan su empleo a un reducido número de laboratorios especializados (Dubey, 1994). Necesita además un factor accesorio (complemento sérico humano), proveniente de personas sanas. Como antígenos se utilizan *Toxoplasmas* vivos, ya que estos pierden la capacidad de colorearse con azul de metileno al ponerse en contacto con sueros que contienen anticuerpos debidos a *Toxoplasma*, pudiéndose observar al microscopio corriente o con contraste de fase. Los parásitos alterados por la acción de los anticuerpos, no toman el colorante. Si el 50% o más se encuentran sin teñir la reacción es positiva. Se informa como título la última dilución del suero en la cual se encuentra la reacción positiva. Es un método de alta especificidad pues no hay reacción cruzada con otros protozoos o agentes infecciosos (Aguilar F. 1997).

1.2.9.2.2 Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Es una técnica específica, reproducible, simple, rápida y de fácil disponibilidad. Proporciona resultados en todas las fases de infección, pudiendo detectar anticuerpos

específicos contra *Toxoplasma* de tipo IgG, IgM o IgA. Se utilizan *Toxoplasmas* muertos por formol o liofilizados. La inmunoglobulina presente en el fluido biológico del paciente se adhiere a la pared del parásito, donde se ponen de manifiesto por medio de anti-inmunoglobulina humanas conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Necesita de un microscopio de luz fluorescencia. La lectura se facilita por una tinción con azul de Evans. Los títulos son tan altos como los de la prueba de Sabin Feldman. Es una prueba sensible y especifica pero puede dar algunas reacciones cruzadas (Aguilar F. 1997).

1.2.9.2.3 Prueba de aglutinación modificada (MAT)

Es sensible y específica. Los taquizoítos de *Toxoplasma* fijados en formol son adicionados a las placas de micro titulación y luego se adicionan las diluciones de los sueros problemas. Las muestras positivas producirán aglutinación, mientras que las muestras negativas producirán un "botón" de precipitados de taquizoitos en la parte inferior del pozo. La prueba es simple y fácil de realizar aunque se requieren cantidades relativamente grandes de antígeno (Sudan V et al. 2013).

1.2.9.2.4 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Utiliza antígenos crudos solubles fijados en las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación y la reacción antígeno-anticuerpo se aumenta por la adición de un anticuerpo secundario ligado a enzima, la reacción se puede evaluar objetivamente por cuantificación del color revelado por un lector de ELISA. El procedimiento es fácil de realizar, económico y fácilmente adoptable para uso en el campo (Anthony et al.1980; Spencer et al. 1980). La técnica ELISA ha sido una valiosa herramienta en el diagnóstico de enfermedades parasitarias ya que puede ser utilizada en la búsqueda de antígenos y anticuerpos en diferentes tipos de muestras. El Ensayo inmunoenzimático ha permitido la detección de anticuerpos antitoxoplásmicos, utilizando tres principios para la detección de estos anticuerpos: la inmunocompetencia, el método indirecto y la inmunocaptura (Martín I & García S. 2003).

1.2.9.3 Diagnóstico molecular

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método usado para sintetizar y amplificar secuencias específicas de ADN a partir de un ADN molde (Morel G et al.2003), ha sido aplicada como método de diagnóstico de diferentes enfermedades y consiste básicamente de tres etapas: desnaturalización del ADN, alineamiento de los primers y extensión de la nueva cadena por la acción de la enzima DNA polimerasa (Dennis Y et al. 2006).Estas etapas se repiten cíclicamente produciendo copias de ADN en forma exponencial.

Se han implementado variantes de la PCR convencional como son la PCR anidada, RT-PCR, PCR múltiple, PCR en tiempo real. Los avances tecnológicos para mejorar el rendimiento de termocicladores de PCR y la detección de la señal de fluorescencia en la década de 1990, permitió la introducción un método de PCR de segunda generación en 1996 que emplea la química TaqMan. Este método utiliza una sonda fluorescente etiquetada doblemente (sonda TaqMan) que se añade a la mezcla de reacción de PCR. La actividad 5´ exonucleasa de la ADN polimerasa desplaza y digiere la sonda TaqMan sobre la extensión del cebador. Esto provoca la liberación de la señal fluorescente del apagador (quenched), la cual es medida durante cada ciclo de PCR en un sistema de detección de tubo cerrado, de ahí el término tiempo real. Una cámara digital capta las señales de fluorescencia en tiempo real y los datos se almacenan en el ordenador del computador, todo el análisis post -PCR es computarizado. El monitoreo en tiempo real de la acumulación de productos de PCR conduce a sistemas de PCR totalmente cuantitativos que han sustituido a todos los métodos de PCR cuantitativos convencionales para aplicaciones de investigación (Pusterla N et al. 2006).

Recientemente, la PCR en tiempo real ha sido introducida en el diagnóstico molecular de enfermedades como la Toxoplasmosis por ofrecer mayor sensibilidad y especificidad en la detección del ADN del parásito (Switaj K et al.2005), esta técnica combina el diagnóstico y la cuantificación en muy pocos pasos, además mediante la detección fluorescente se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN

sintetizado (Higuchi R et al. 1993).Una de las ventajas de esta técnica sobre la PCR tradicional es su rapidez, al no necesitar ningún proceso adicional de detección, utilizar sistemas cerrados y que el riesgo de contaminación disminuye(Costa J.2004). La PCR en tiempo real utiliza la actividad 5´nucleasa de la Taq DNA polimerasa para cortar una sonda de hibridización con una región no extendible marcada con fluorecencia durante la etapa de extensión de la PCR(Lin M et al.2000).Esta herramienta se ha utilizado para detectar y cuantificar *Toxoplasma gondii* en diferentes muestras clínicas como sangre (Contini C et al.2005), líquido amniótico (Roman S et al. 2004), humor acuoso (Simon A et al. 2004) y líquido cefalorraquídeo (Reischl U et al. 2003). Además, se ha logrado estimar la carga parasitaria en muestras de sangre y fluido cefalorraquídeo de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y con diagnóstico clínico y serológico confirmado para toxoplasmosis.

Una PCR cuantitativa sensible (PCR-QC) basada en la amplificación de un fragmento no codificante de ADN de 529 pb que esta repetido de 200 a 300 veces en el genoma de *T. gondii* se ha descrito anteriormente (Homan et al. 2000). El ADN del parásito se detectó en el líquido amniótico de pacientes toxoplásmicas, así como en diversos tejidos de ratones infectados. El ensayo fue más sensible que la PCR B1 y permitió una estimación razonable de los números de quiste de cerebro. El QC- PCR se utilizó con éxito para cuantificar taquizoitos contenidos dentro de las muestras en un rango de 10^2 a 10^4 taquizoítos.

Nagy et al.(2006) compararon la PCR convencional, PCR fluorescente con el análisis de fragmento de ADN , la PCR cuantitativa en tiempo real con SYBRGreen I y con la detección de sonda de hibridación de transferencia de energía de fluorescente (FRET) y encontró que la PCR convencional junto con la PCR cuantitativa en tiempo real tiene un límite de detección de 1,000 parásitos, seguido por PCR fluorescente con un límite de detección de 10 a 100 parásitos, y, finalmente, la PCR en tiempo real utilizando sondas de hibridación de transferencia de energía de fluorescencia puede detectar un parásito.

La PCR es una técnica altamente sensible, específica y rápida para la detección de *T. gondii*. Sin lugar a dudas, los bioensayos murinos son más sensibles que la PCR con respecto al aislamiento de *T. gondii*, pero de hecho, el significado último de detección de la toxoplasmosis basado en la PCR es que la PCR puede detectar ADN del parásito incluso cuando los tejidos disponibles para las pruebas se encuentran en estado de descomposición; en contraste los bioensayos, sólo pueden detectar parásitos viables. Por otra parte, el tamaño de la muestra analizada es muy importante en la detección de incluso bioensayos y es muy posible que la etapa parásita en la muestra a ensayar se ha baja o escasa y muestre una distribución focal en los tejidos. En los bioensayos se perderá la detección en cualquiera de estos casos. Pero PCR dará amplificación incluso si el estado parasitario está muerto o en muy bajo número. PCR permite detectar incluso 0,1 pg de ADN, incluso muy pocos taquizoitos son suficientes para el diagnóstico exacto, no importa si están vivos o muertos (Sudan V et al. 2013).

Diversos estudios se han desarrollado para mejorar la sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real, por lo cual se han evaluado dos blancos específicos del genoma del parasito como el gen B1 de función desconocida, de copia única y conservado en todas las cepas del parasito (Kompalic A et al. 2007) y la secuencia de 529 pb recientemente estudiada RETg (Elemento repetido de *T. gondii*) repetida de 200-300 veces en el genoma (Edvison B et al. 2006; Homan W et al. 2000).También, se evaluó la sensibilidad y especificidad de la técnica en muestras de sangre y fluido cefalorraquídeo de pacientes con toxoplasmosis cerebral infectados con VIH encontrándose un 97% de sensibilidad y un 87% especificidad para el blanco de 529pb RETg, y valores de 87% y 97% de sensibilidad y especificidad respectivamente para B1, esta investigación demostró esta técnica puede ser una herramienta útil en el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral en pacientes con SIDA (Mesquita R et al. 2010).

1.2.10 Tratamiento

Son numerosos los medicamentos utilizados en el tratamiento de la toxoplasmosis, la mayoría de los cuales actúan sobre la vía del metabolismo del folato y en la síntesis de proteinas, destruyendo los taquizoitos y controlando su fase de proliferación, dentro de

este grupo se incluyen: pirimetamina, sulfonamidas, clindamicina y espiramicina (Remesar G & Carreras I. 2009;Pardo A et al. 2004). Otros fármacos como la azitromicina, y atovacuona actúan sobre los quistes titulares (Gómez J et al. 2002).

El esquema de tratamiento en la embarazada con infección por *T. gondii* debe incluir en el primer trimestre, la administración por vía oral de 2 ó 3 g de espiramicina por día, esta droga no es teratogénica, no trata la infección en el feto, es indicada para mujeres embarazadas con sospecha de haber adquirido la infección aproximadamente a las 18 semanas de gestación. El tratamiento con espiramicina se debe continuar hasta el parto en mujeres con baja sospecha de infección fetal o en embarazadas con resultados negativos tanto para PCR de líquido amniótico y ecografía. Durante el segundo y tercer trimestre, el tratamiento de esta parasitosis incluye dosis de pirimetamina 100 ó 200 mg el primer día y después 25 a 30 mg diarios con sulfadiazina 4 u 8 g diarios, complementada con ácido folínico (Montoya J & Remington J. 2008). En los niños con toxoplasmosis congénita se sugiere mantener un tratamiento durante 12 meses que consiste en el suministro de pirimetamina, sulfadiazina complementado con ácido folínico.

2. METODOLOGÍA

2.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente es un estudio transversal descriptivo, a través del cual se evaluó la utilidad de la técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita en muestras de sangre periférica de gestantes del departamento de Sucre con diagnostico serológico confirmado para pruebas IgG e IgM anti*Toxoplasma*.

2.2 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el departamento de Sucre, localizado en el norte del país, en la región de la llanura del Caribe; ubicado entre los 10°08’03” y08°16’46” de latitud norte y los 74°32’35” y 75°42’25” de longitud oeste.Posee una extensión territorial de 10.670km^2, distribuidos territorialmente en 26 municipios y cuenta con una población total de más de794.904 habitantes, 516.355 ubicados en cascos urbanos y los 278.549 restantes en zona rural (Figura 7). Las zonas bajo estudio fueron los municipios de Sincelejo, Corozal, Santiago de Tolú, San Marcos, Sampués y Ovejas pertenecientes al departamento de Sucre, Colombia, el cual registra una prevalencia de infección por *T. gondii* en gestantes del 56%, y una incidencia del 2% (Machado N et al. 2004).

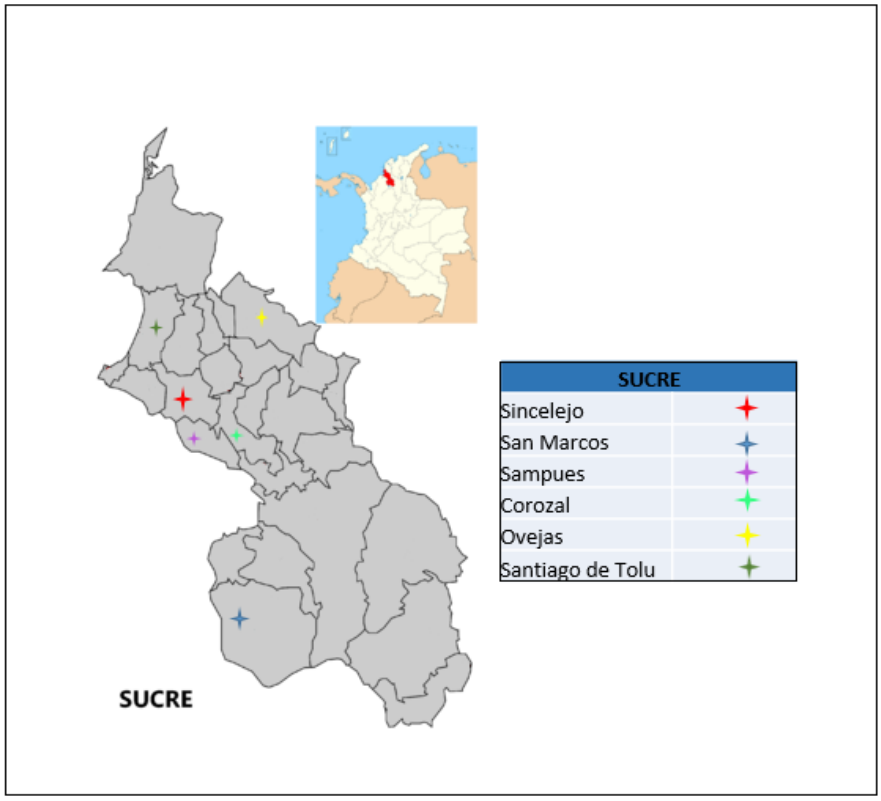


Figura 7. Área de estudio, Departamento de Sucre donde se indican los municipios de muestreo. Tomado de: https://www.google.com.co/search?q=mapa+sucre&.

2.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Estuvo representada por 220 mujeres embarazadas que asistieron a los programas de control prenatal en los centros de salud de los municipios en estudio, entre los meses de enero y diciembre de 2013. Las gestantes del estudio cumplían con los siguientes criterios de inclusión: residir en el departamento de Sucre, asistir a control prenatal, tener una edad gestacional comprendida entre los 2 y 8 meses de embarazo y no estar bajo ningún tratamiento que incluyera drogas inmunosupresoras.

Para realizar los ensayos de biología molecular, la población de estudio fue clasificada en tres grupos teniendo en cuenta el diagnóstico serológico como se observa en la Tabla 1.

Grupo	ELISA IgG e IgM anti*Toxoplasma*
Grupo I	Sospecha de infección aguda (gestantes IgG positivo e IgM positivo anti*Toxoplasma*)
Grupo II	Sospecha infección crónica (gestantes IgG positivo e IgM negativa)
Grupo III	Gestantes sin la infección(IgG negativa e IgM negativa anti*Toxoplasma*)

Tabla 1. Grupos establecidos a partir del diagnóstico serológico por prueba ELISA.

A cada una de las participantes le fue ofrecida una charla informativa sobre la toxoplasmosis y acerca de la investigación. Además, se solicitó el consentimiento informado para el procesamiento de las muestras (Anexo A) y se aplicó un formato tipo encuesta para determinar los posibles factores de riesgo que inciden en la aparición de la toxoplasmosis en mujeres embarazadas de este municipio (Anexo B).

El tamaño de la muestra fue determinada mediante el software Raosoft® y se tuvo en cuenta la población estimada de 15550 embarazadas en el departamento de Sucre para el año 2011 (Secretaria de Salud Departamental - Seccional Sucre), la seroprevalencia para toxoplasmosis en embarazadas de este municipio del 56% (Machado et al., 2004), un nivel de confianza de 95% y un error estándar de 8%.

2.4 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

2.4.1 Obtención de muestras

Personal calificado tomó aproximadamente 8 mL de sangre periférica de cada gestante por venopunción con sistema Vacutainer™ ´para las pruebas de diagnóstico de la toxoplasmosis; de los cuales, 4 ml de sangre se almacenaron en un tubo vacutainer

sin anticoagulante y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos con el fín de obtener el suero para realizar las pruebas de inmunoglobulina IgG e IgM anti*Toxoplasma.* Para los ensayos de PCR en tiempo real, 4 mL de sangre fueron almacenados en un tubo Vacutainer con heparina como anticoagulante.

Figura 8. Obtención de muestras. A. Centros de salud donde se realiza el control prenatal. **B.** Recolección de muestras de sangre periférica por venopunción con sistema Vacutainer.®.

2.4.2 Detección de anticuerpos IgG anti-*T.gondii* mediante la prueba ELISA automatizada.

La detección de anticuerpos IgG específicos para *T. gondii* se realizó a través de la prueba ELISA, a partir del suero obtenido luego de centrifugar las muestras de sangre a 5.000 rpm durante 5 minutos. La prueba de ELISA se llevó a cabo en un equipo automatizado Elisys Uno (Marca Human) (Figura. 9. A y B) y se utilizó la prueba cuantitativa Toxo IgG (Marca Human). Inicialmente, 100 uL de cada control: (Control negativo, control de cut-off, control positivo bajo, control positivo medio y control positivo alto) (Tabla 2) y 100 uL de cada muestra diluida 1:100 con buffer de dilución IgG (buffer fosfato [10 mmol/l], NaCl [8 g/l], Albúmina [10 g/l] a pH 6.5)) son adicionados a los pocillos de la placa en la cual están fijados los antígenos de *Toxoplasma gondii* y la placa fue incubada por 30 minutos a 17-25°C, posteriormente se realizaron cuatro etapas de lavado de los pozos con buffer de lavado (buffer Tris 10 mmol/l), NaCl 8 g/ml

a pH 7.2), y se llevó a cabo la reacción con el conjugado (Anti IgG humano, marcado con peroxidasa de conejo) durante un tiempo de incubación de 30 minutos a 17-25°C; transcurrido este tiempo la placa fue sometida nuevamente a 5 lavados para luego ser incubada a 17-25°C durante 15 minutos con 100 uL de una solución de reactivo de substrato (3,3', 5,5' Tetrametilbencidina TMB [1,2 mmol/l] y peróxido de hidrógeno [3mmol/l] a pH 3,7). Finalmente la reacción fue detenida con 100 uL ácido sulfúrico 0.5mol/L y se efectuó la lectura de la placa a 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm. Los resultados fueron expresados en UI/mL de acuerdo con los valores de referencia de los controles.

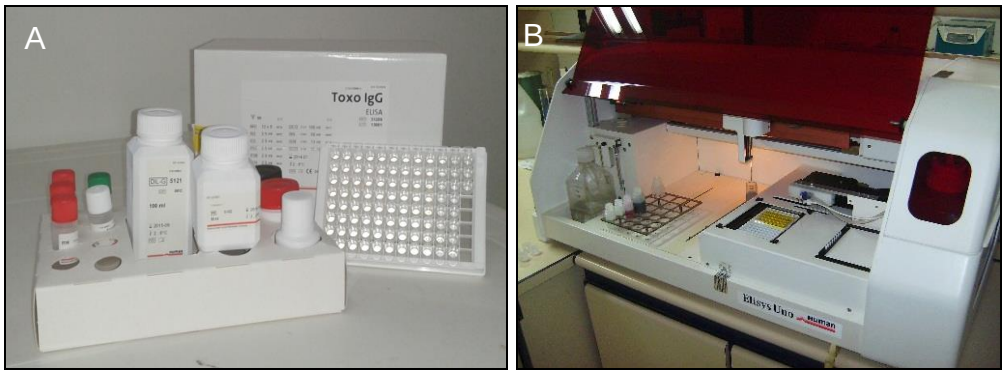


Figura 9. Prueba ELISA IgG Anti-*Toxoplasma gondii*. **A, Estuche cuantitativo Toxo IgG (HUMAN)** empleado para la detección de anticuerpos IgG anti-*T.gondii*; **B, equipo automatizado Elisys Uno (HUMAN),** en el cual se realiza la prueba Elisa IgG anti-*T.gondii.*

CONTROLES	CONCENTRACIÓN (UI/ml)
Control negativo	0.0
Control Cut-off	5
Control positivo bajo	30
Control positivo medio	100
Control positivo alto	200

Tabla 2. Controles incluidos en el estuche comercial cuantitativo Toxo IgG (HUMAN).

La interpretación de los resultados de las pacientes se obtiene por comparación con un valor de punto de corte (cut-off value) o por expresión en unidades HUMAN o por estimación cuantitativa en IU/ml basándose en una curva de calibración construida con el valor del control de punto de corte y 3 controles positivos (Tabla 3).

CONTROLES	CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS
No reactivo	0.0 UI/ml
Negativo	<4.2 UI/ml
Cut-off	5.7 UI/ml
Positivo	>5.7 - <200 UI/ml
Positivo alto	≥200 UI/ml

Tabla 3. Interpretación de los resultados del ensayo ELISA IgG anti-*T.gondii*. La prueba es considerada positiva para IgG anti- *T.gondii* si los rangos están por encima del valor Cut-off entre >5.7 - <200 UI/ml y ≥200 UI/ml, y se considera negativa si los rangos están por debajo del valor cut-off entre 0.0 UI/ml- <4.2 UI/ml.

2.4.3 Detección de anticuerpos IgM anti-*T.gondii* mediante la prueba ELISA de captura.

La prueba toxo IgM de captura se llevó a cabo en un equipo Elisys uno, mediante un estuche comercial específico para la detección de anticuerpos IgM anti- *Toxoplasma gondii* (Human) (Figura.10. A y B). Después de una etapa de incubación por una hora a 37°C, las IgM anti- *Toxoplasma* presentes en la muestra diluida a 1:100 con buffer fosfato son capturadas por anticuerpos de ratón anti-IgM humana fijados sobre la placa, posteriormente, se realizaron cuatro etapas de lavado con buffer fosfato (pH

7.2), y se llevó a cabo la reacción con el conjugado (Antígeno *Toxoplasma* marcado con peroxidasa) durante un tiempo de incubación de 30 minutos a 37°C. Luego de cuatro etapas de lavado fue revelada la reacción tras la incubación de la placa con substrato (3,3',5,5' Tetrametilbencidina TMB, Peróxido de Hidrógeno) durante 30 minutos a 17-25°C. Por último fue detenida la reacción con ácido sulfúrico y se efectuó la lectura de la placa a 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm. Los resultados fueron expresados en absorbancias teniendo en cuenta los valores de referencia del control positivo, control de punto de cohorte y control negativo (Tabla 4).

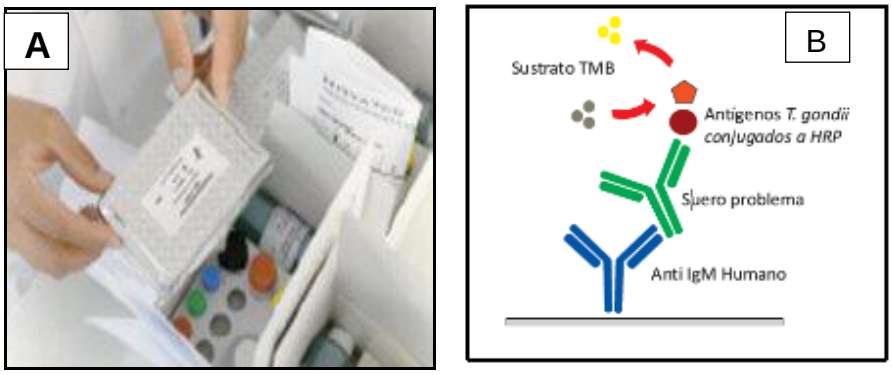


Figura 10. Prueba ELISA de Captura para la detección de anticuerpos tipo IgM anti-*T.gondii:* A Estuche comercial cuantitativo Toxo IgM (HUMAN)**, contiene la placa de ELISA, los controles y reactivos del ensayo;** B. Reacción de Elisa IgM**, durante esta reacción los anticuerpos anti IgM humanos fijados a la placa se une a los anticuerpos presentes en la muestra de suero problema, luego el anticuerpo de detección marcado con una enzima generalmente peroxidasa o fosfatasa alcalina se unirá a los antígenos que están a su vez unidos al anticuerpo de captura. Y por último la reacción es detenida por la adición del sustrato.**

CONTROLES	CONCENTRACIÓN (UI/ml)
Control negativo	0.0 - 0.150
Control de punto de corte Cut-off	> 0.200
Control positivo	>= 2.0

Tabla 4. Controles incluidos en el estuche comercial cuantitativo Toxo IgM (HUMAN)

2.4.4 Detección de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre periférica por PCR en tiempo real.

2.4.4.1 Extracción de ADN de *T. gondii*

Para la extracción de ADN total de las muestras de sangre de las gestantes se utilizó el estuche comercial de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit, de la siguiente manera: a 200 ul de sangre total se le adicionaron 20 ul de proteasa de Qiagen y 200 ul de buffer AL (clorhidrato de guanidina), esta mezcla fue llevada a un agitador tipo vortex para mezclar por 15 segundos e incubada a 56 °C por 10 minutos y centrifugada a 1000g por 30 segundos. Posteriormente, se le adicionaron 200 ul de etanol absoluto (96%), se mezcló por 15 segundos y luego se centrifugo a 1000g por 30 segundos. La mezcla se transfirió a columna de minispin con su respectivo tubo de colección de 2 ml y fue centrifugada a 8000rpm por 1minuto. La columna de minispin fue colocada en otro tubo de colección de 2ml para descartar el filtrado. Luego se abrió el tubo de mini spin y se adicionaron 500 ul de buffer de lavado AW1 (clorhidrato de guanidina). Se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto, se retiró el filtrado y luego se transfirió la columna de mini spin a otro tubo de colección de filtrado. Se agregaron 500 ul de buffer de lavado AW2 (azida sódica) y se centrifugo a 14000 rpm por 3 minutos. Seguidamente, se transfirió la columna de mini spin a un nuevo tubo de 2ml y se centrifugo a alta velocidad por 1 minuto. Después se transfirió la columna de mini spin a un tubo de 1,5 ml y se descartó

el tubo que contenia el filtrado. Se abrió la columna de mini spin y se adicionaron 200ul de buffer de elución AE de ADN (Contiene azida sódica), para ser incubada a temperatura ambiente de 15-25 °C por 5 minutos. Finalmente, se centrifugo a 8000 rpm por 1 minuto y el ADN extraído fue almacenado a – 20 °C.

2.4.4.2 PCR en tiempo real

220 muestras de sangre periférica de las gestantes, fueron procesadas por PCR en tiempo real con el fin de amplificar el ADN del parásito. Para el ensayo se emplearon los cebadores dirigidos hacia el Elemento Repetido de *T.gondii* (RETg; localizado entre los nucleótidos 270 y 334, Tabla 5), sintetizados por la casa Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), los cuales amplifican un fragmento dentro de la secuencia de 529pb del ER, repetida de 200- 300 veces en el genoma de *Toxoplasma gondii*. Además, se utilzó el estuche comercial TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix de la casa Applied Biosystems. Se emplearon dos controles negativos, agua ultrapura y ADN genómico de una muestra negativa para *T.gondii*. El estuche comercial AmpliRun® TOXOPLASMA GONDII DNA CONTROL (Vircell, ref. MBC047) se utilizó como control positivo para cuantificar el ADN del parasito presente en las muestras que resultaron positivas por PCR en tiempo real y establecer la curva estándar para *T.gondi*. Para la amplificación de ADN humano se usó como control endógeno el gen 18S del RNA ribosomal humano (Applied Biosystems, City, CA, USA).

Tabla 5. Cebadores y sondas que flanquean la región repetida lineal de 529 bp de ADN de *T.gondii* (GenBank acceso no. AF146527).

Secuencias de los Cebadores y Sondas	Longitud de los Cebadores y Sondas
Cebador Delantero RETg-F: 5'-GGCGAGGGTGAGGATGAG-3'	8pb
Cebador Reverso RETg-R: 5' CATCTTCTCCCTCTCCGACTCT-3'	22pb
Sonda TaqMan: 5'-FAM-TCGCTTCCCAACCACG-3'	16pb

Las condiciones de los ensayos de PCR fueron las descritas por Mesquita y cols. 2010, las amplificaciones se realizaron en un sistema de detección de secuencias ABI StepOne PCR en tiempo real (Applied Biosystems), y las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.4.4.3 Estimación de la carga parasitaria por PCR en tiempo real de las gestantes positivas para *Toxoplasma.*

Para determinar el límite de detección de PCR en tiempo real y establecer la curva estándar usada para la cuantificación, se realizaron diluciones seriadas del ADN de *Toxoplasma gondii* con una concentración de 500 a 0,05 taquizoitos para los análisis de PCR en tiempo real.

2.4.4.4. Estimación de la carga parasitaria por PCR en tiempo real de las gestantes positivas para *Toxoplasma.*

La carga parasitaria por PCR en tiempo real de las gestantes positivas por el parásito *Toxoplasma gondii* se estimó teniendo en cuenta, el valor del número de copias/reacción de la prueba PCR cuantitativa en tiempo real, este esta cuantificación fue utilizada para calcular el número de copias/mililitros en cada reacción de ADN. Para calcular el número de copias/ml, se tuvieron en cuenta los siguientes factores: el factor de dilución (DNA diluido o sin diluir, empleado como molde en la qRT-PCR); el factor de extracción de DNA (volumen original para extracción y volumen del buffer de elusión de DNA); y el volumen del molde de DNA usado en la reacción. Finalmente el número de copias/ml es dividido por el número de veces que esta repetido en el genoma del parasito en el fragmento amplicado de 529 pb del DNA *T.gondii* y los resultados son expresados en número de taquizoitos/ml, como representa en la siguiente forma matemática.

Carga parasitaria= (número de copias/ml de ADN de *T. gondii*)*/(*200 RE de *T.gondii*) = número de taquizoitos/ml.

2.5 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio hace parte del proyecto aprobado por Colciencias: “Papel de los subtipos de IgG contra antígenos recombinantes de *Toxoplasma gondii* como marcadores diagnósticos en la toxoplasmosis congénita: Estudio multicéntrico” con código 110349326210 y cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la universidad de Sucre y se plantea de acuerdo con los parámetros establecidos en la resolución Nº 008430 del 4 de octubre 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. A cada una de las gestantes seleccionadas se informó sobre el estudio, se solicitó la firma de un consentimiento informado (Anexo A) y se recolectó información mediante un formato de recolección de información el cual contenía datos de afiliación y variables a estudiar (Anexo B).

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los software estadísticos INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2013) y R (R Development Core Team, 2008) fueron usados para los análisis estadísticos de los resultados obtenidos en el estudio. Los datos y proporciones categóricas fueron comparados mediante pruebas Chi-cuadrado con corrección de Mantel-Haenszel en casos de tablas de contigencia 2x2, o usando el test exacto de Fisher’s.

La mediana de la cantidad de resultados positivos por PCR en tiempo real para la detección de ADN de *T. gondii* en sangre fue comparado por pruebas no paramétricas solamente con el grupo I, enfermos y los grupos II +III, no enfermos, respectivamente. Un nivel de confianza del 95% fue usado. Para estimar la carga parasitaria de las gestantes frente a Toxoplasma, se emplearon los análisis de regresión lineal, utilizados para la correlación entre las variables cuantitativas de la mediana de las concentraciones de parásitos en las muestras de sangre.

Para comparar las pruebas ELISA convencional y PCR en tiempo real, se calcularon algunos parámetros diagnósticos que permitieron establecer cuál de los ensayos utilizados ofrece mejores resultados. Entre estos parámetros se incluyeron eficiencia de rendimiento de la prueba, sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos (Gómez de la Cámara, 1998).

Se tomó como patrón de referencia los resultados obtenidos de un panel de sueros analizados por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica establecida como prueba Gold Standard para la detección de anticuerpos IgG Anti-*Toxoplasma*. Esta prueba fue realizada por el Instituto Nacional de Salud para confirmar la existencia de anticuerpos IgG contra Toxoplasma en cada una de las muestras seleccionadas (Anexo C).

Para determinar los factores de riesgo relacionados con la toxoplasmosis en gestantes del municipio de Sucre se realizó un análisis de las variables incluidas en la encuesta, las cuales fueron asociadas por separado con los resultados obtenidos por ELISA convencional IgG y PCR en tiempo real. Para esto se obtuvieron proporciones sobre la prevalencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* y la frecuencia de detección de ADN de *T.gondii*, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%, estratificados por variables como: localidad, edad (años), edad gestacional, frecuencia de abortos, tipo de agua consumida, tipo de carne consumida , material de la vivienda, piso de la vivienda, presencia de gatos domésticos, y manipulación de suelo. La comparación de proporciones para cada una de las variables se realizó mediante pruebas Chi-cuadrado (proporciones, diferencia de proporciones y homogeneidad de proporciones) con los software estadísticos INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2013) y R (R Development Core Team, 2008).

3. RESULTADOS

3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el período comprendido entre los meses de enero y diciembre de 2013, se colectaron en total 220 muestras de sangre de embarazadas que asistieron a control prenatal en distintos centros de salud del departamento de Sucre. De estas, 127 fueron captadas de los centros de salud del municipio de Sincelejo, 27 de Corozal, 27 de San Marcos, 15 de Sampués, 13 de Ovejas y 11 de Santiago de Tolú. Todas las gestantes incluidas en el estudio manifestaron residir permanentemente en estos municipios y aceptaron su participación en el estudio con la firma de consentimiento informado.

3.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

De las 220 gestantes del estudio, 178 habitaban las áreas urbanas de la región, lo que corresponde a una población urbana del 80,9% y 42 manifestaron vivir en las zonas rurales de estos municipios (19,1%) (Figura 11. A). La mayor parte de embarazadas del estudio tenían una edad comprendida entre los 14 y 22 años, lo que corresponde a un 52,7%, seguido del grupo con edad comprendida entre 23 y 31 años (Figura 11.B).La población de embarazadas presentaba un rango de edad gestacional entre los 2 y los 8 meses, encontrándose el 38,6% en el tercer trimestre de embarazo (Figura 11.C). Con respecto a los antecedentes ginecoobstétricos, el 56% de la población ha tenido entre 1 y 7 partos previos, donde predomina un único parto. El mayor número de embarazadas 74,1% (163 gestantes) manifestaron no haber presentado abortos previos a la gestación y solo 88 gestantes manifestaron haber tenido abortos antes de la gestación lo que corresponde a una frecuencia de abortos del 25,9%(Figura 11. D).

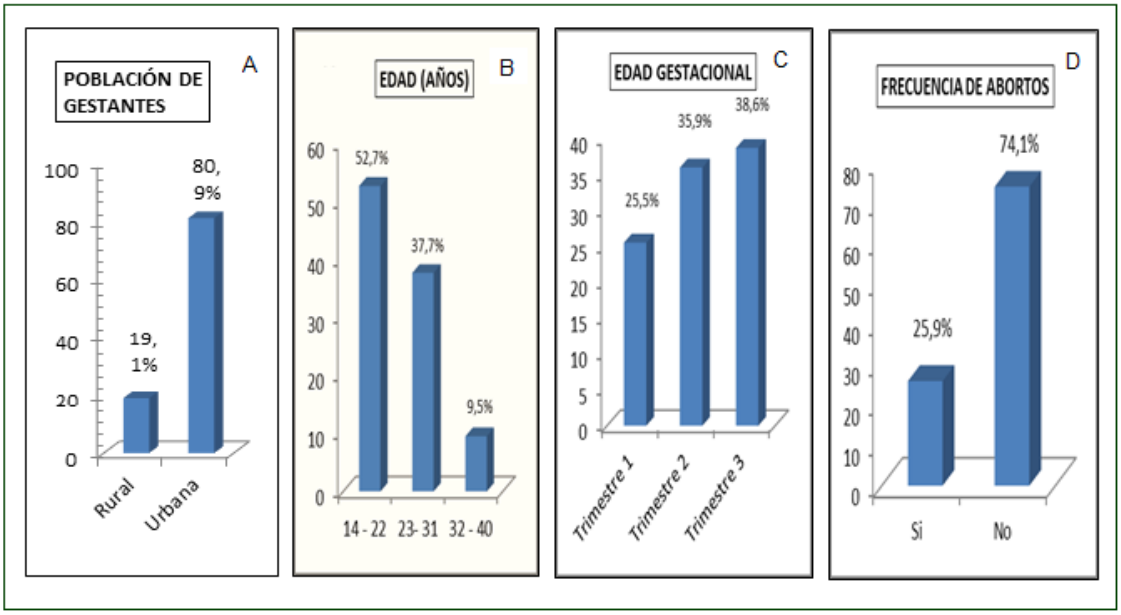


Figura 11. Características de la población de estudio: **A)** Población de gestantes del área rural y urbana, **B)** Frecuencia de edad de las gestantes, **C)** Frecuencia de edad gestacional de las gestantes, y **D)** Frecuencia de abortos previos de las gestantes.

En cuanto a los factores de riesgos asociados a la infección por *Toxoplasma*, el 81,4% de las gestantes del estudio manifestó no haber tenido contacto con gatos durante su gestación (Figura 12. A). Con relación a la convivencia con animales se observó que un 63,6% de las embarazadas manifestó haber tenido contacto con animales domésticos y el otro 36,4% manifestó no haber tenido contacto con estos animales; siendo el perro el animal doméstico más predomínate (22,7%), seguido de las aves con un 14,1% (Figura 12.B).

Con respecto a los hábitos alimenticios de las gestantes del estudio, el mayor porcentaje de las embarazadas consumían agua directamente del grifo (55,5%), aunque hubo un pequeño porcentaje de embarazadas que manifestó hervír el agua para su consumo (23,6%) (Figura 12.C). El 48,6% de las gestantes consumian todo tipo de carnes, sin embargo; un 24,1 % de ellas manifestó consumir carne de res, seguido por un 10,9% para la carne de pollo, un 7,7% para el consumo de pescado y en menor proporción un 1,8% para el consumo de la carne de cerdo (Figura 12.D).

Un 70% de las gestantes incluidas en el estudio residían en viviendas construidas con paredes de ladrillo y cemento, seguido de paredes de tipo artesanal. El piso de la

vivienda predominante fue el de cemento (51%), seguido de tierra (36,3%) y con menor frecuencia el piso de cerámica (12,7 %) (Figura 12.E).

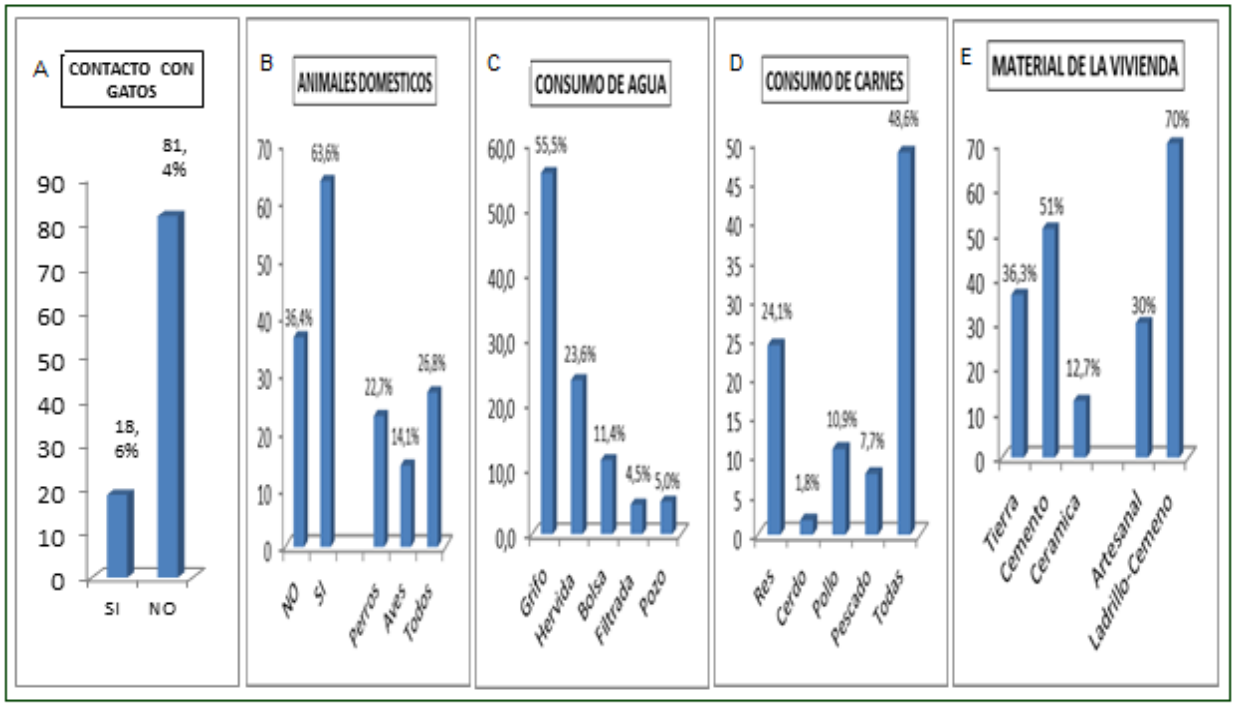
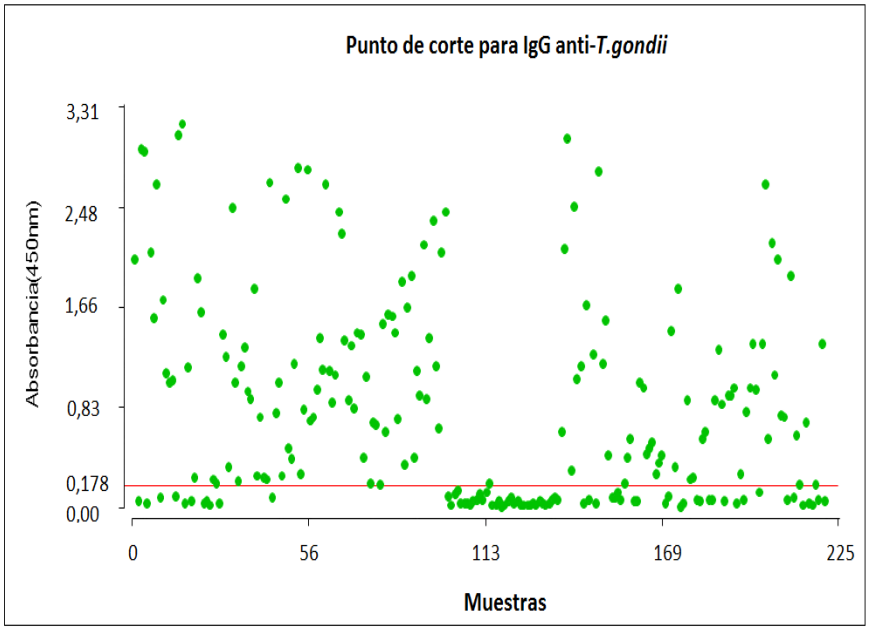


Figura 12. Factores de riesgos asociados a la posibilidad de adquirir la infección por *T.gondii:* A) Presencia de gatos encontrada en el estudio, **B)** Presencia de animales domésticos en las viviendas, **C)** Frecuencia del consumo de agua, **D)** Frecuencia del consumo de carnes, y **E)** Frecuencia del material de la vivienda de las gestantes.

3.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG ANTI-T. GONDII POR LA TÉCNICA ELISA

De la 220 muestras de suero procesadas mediante ELISA Toxo IgG, 145 presentaron anticuerpos específicos IgG anti*Toxoplasma* con valores superiores a 5 UI/ml, lo que corresponde a una seroprevalencia para la toxoplasmosis en mujeres embarazadas del departamento de Sucre de 66 % (IC 95%; 59,1-72,0). En las 75 embarazadas restantes (34%), los títulos de anticuerpos fueron inferiores a 4.2 UI/ml o estuvieron ausentes, por lo que fueron consideradas negativas para la infección por *T.gondii*. (Gráfica 1).



ABS (450nm): Absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 450 nm

Gráfica 1. Punto de corte establecido por el Kit cuantitativo Toxo IgG (HUMAN). En esta grafica se representan los valores de absorbancia de los anticuerpos IgG anti-*T.gondii* arrojados por las muestras analizadas mediante la prueba ELISA. Los valores de absorbancia de las muestras van desde 0.0 hasta 3.31 nm, considerándose positivas para el ensayo aquellas muestras que presentaron un punto de corte con una absorbancia de anticuerpos IgG anti-*T.gondii* superior a 0,178nm.

Del total de pacientes positivas, 41% presentó títulos de anticuerpos superiores a 200 UI/ml. Estas gestantes representan pacientes sospechosas de infección aguda por sus altos títulos de anticuerpos IgG. Los municipios en donde se registraron los títulos de anticuerpos IgG frente a *T.gondii* más altos fueron Sincelejo y San Marcos (Tabla 6). No se detectó la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* en 21% de las gestantes analizadas.

Municipios	IgG Anti-*T. gondii*	Concentración de Anticuerpos	N° de Gestantes	Total
Sincelejo	Positivo	Positivo	54	127
		Positivo alto	31	
	Negativo	Seronegativo	27	
		Negativos	15	
San Marcos	Positivo	Positivo	6	27
		Positivo alto	11	
	Negativo	Seronegativo	8	
		Negativo	2	
Tolú	Positivo	Positivo	4	11
		Positivo alto	1	
	Negativo	Seronegativo	3	
		Negativo	3	
Sampues	Positivo	Positivo	11	15
		Positivo alto	1	
	Negativo	Seronegativo	3	
		Negativo	0	
Ovejas	Positivo	Positivo	4	13
		Positivos alto	5	
	Negativo	Seronegativo	3	
		Negativo	1	
Corozal	Positivo	Positivo	11	27
		Positivo alto	6	
	Negativo	Seronegativo	5	
		Negativo	5	

Tabla 6. Concentración de anticuerpos IgG Anti-Toxoplasma en las gestantes por municipios. En esta tabla se muestra las concentraciones de anticuerpos IgG anti- *T.gondii* de las gestantes que participaron en el estudio. En los municipios de Sincelejo y San Marcos se registraron los títulos más altos de anticuerpos IgG (≥200 UI/ml) frente al parasito en las embarazadas.

Noventa y uno muestras presentaron títulos positivos (>5.7- <200 UI/mL) lo que corresponde a una frecuencia de detección de anticuerpos IgG frente a *T.gondii* del 41%. Por otra parte, 54 muestras mostraron títulos positivos altos (≥200 UI/mL) para la prueba IgG anti*Toxoplasma* correspondiente a un porcentaje de detección del 25 %, solo 75 gestantes mostraron resultados negativos frente a la infección por *Toxoplasma gondii*.(Figura 13).

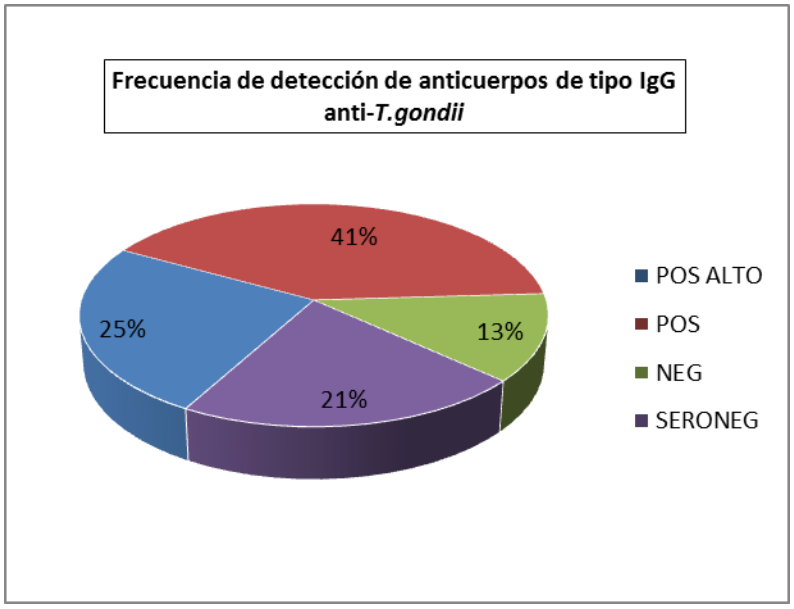
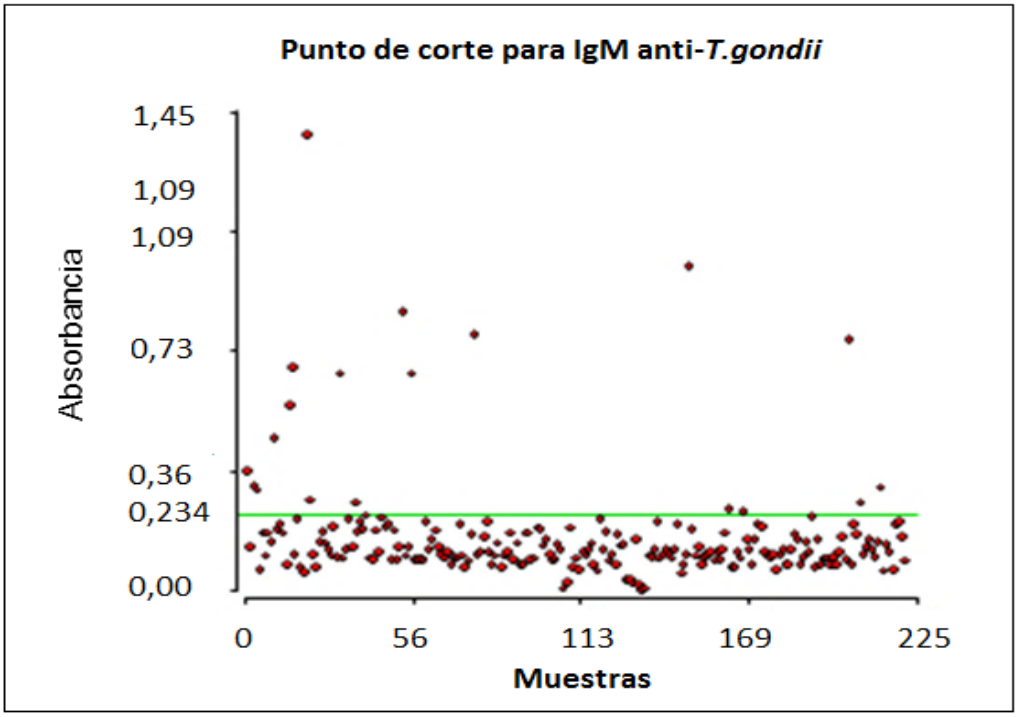


Figura 13. Frecuencia de detección de anticuerpos IgG anti-*T.gondii* encontrada en las gestantes del estudio. La representación gráfica, señala que un total de 54 muestras presentaron títulos positivos para la prueba ELISA IgM anti-Toxoplasma, lo que corresponde a una frecuencia de detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* del 41%; 91 muestras arrojaron títulos positivos altos para la prueba (25%) y el resto de las muestras arrojaron resultados negativos frente a la infección por el parásito.

3.4 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGM ANTI-T. GONII POR LA TÉCNICA ELISA

Del total de muestras de sueros de gestantes procesadas por la técnica ELISA IgM anti*Toxoplasma* (220), solo 17 muestras de sueros arrojaron resultados positivos para los ensayos de anticuerpos IgM, con valores superiores a 2UI/ml. (Gráfica 2).



Gráfica 2. Punto de corte establecido por el Kit cuantitativo Toxo IgM (HUMAN). En esta grafica se representan los valores de absorbancia de los anticuerpos IgM anti-*T.gondii* arrojados por las muestras analizadas mediante la prueba ELISA. Los valores de absorbancia de las muestras van desde 0.0 hasta 1.45nm, considerándose positivas para el ensayo aquellas muestras que presentaron un punto de corte con una absorbancia de anticuerpos IgM anti-*T.gondii* mayor a 0,234nm.

Las muestras que resultaron positivas para IgM anti-*T.gondii*, pertenecían a los municipio de San Marcos (8), Sincelejo (5), Corozal (2) y Sampués (2). Lo anterior, podría indicar una infección reciente en las gestantes del estudio. De acuerdo con esto, en el departamento de Sucre existe una frecuencia de infección por *T. gondii* correspondiente al 7,7% (IC 95%; 4,7-12,2). No se detectó anticuerpos de tipo IgM anti*Toxoplasma* en ninguna de las 203 muestras de sueros restantes (92,3%), los títulos de anticuerpos fueron inferiores a 2UI/ml o estuvieron ausentes (Figura 18).

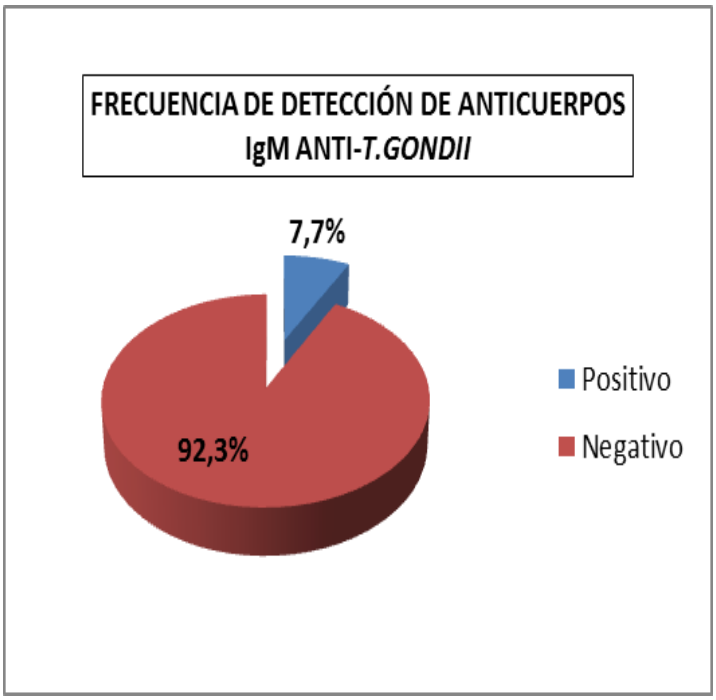


Figura 14. Frecuencia de detección de anticuerpos IgM anti-*T.gondii* encontrada en las gestantes del estudio. La representación gráfica, señala que un total de 17 muestras fueron positivas para la prueba ELISA IgM anti-Toxoplasma, lo que corresponde a una frecuencia de infección por *Toxoplasma gondii* del 7.7% y el resto de las muestras arrojaron resultados negativos para este ensayo (92.3%).

3.5 PRUEBA ELISA IGG ANTI*TOXOPLASMA* Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA TOXOPLASMOSIS EN EMBARAZADAS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE.

De las 220 muestras de sueros procesadas por Elisa IgG anti*Toxoplasma* incluidas en el estudio, 145 resultaron positivas mediante la técnica Elisa IgG, de las cuales 29 tuvieron contacto con gatos y 93 manifestaron tener contacto con animales domésticos, siendo el animal más predominante el perro el cual estaba presente en 33 viviendas. Además, 80 manifestaron haber consumido agua directamente del grifo durante el embarazo, 71 manifestaron consumir todos los tipos de carnes y 48 presentaron afecciones como gripa, cefalea, infección vaginal, fiebre entre otros (Anexo D).

Por otra parte, 75 gestantes resultaron negativas por Elisa IgG, de las cuales se encontró que 12 tuvieron contacto con gatos y 47 con otros animales, 42 manifestaron consumir agua directamente del grifo, 68 manipulaban carne cruda y 24 manifestaron haberse sentido enfermas durante el embarazo (Tabla 5).

En este estudio, no se encontró asociación significativa entre los resultados positivos de los ensayos por Elisa IgG anti*Toxoplasma* y el contacto de las gestantes con animales como el gato (X^2=0.52, con P=0.47, siendo P > 0.05) (Anexo E). De igual forma, no se halló asociación significativa entre hábitos alimenticios, el consumo de agua sin tratar (X^2= 0.01 y P= 0.90 con P> 0.05) y la manipulación de carne cruda (X^2= 0.02 y P= 0.89, P > 0.05) con los casos de infección por *T. gondii* (Anexo D).

Con respecto a las gestantes negativas por la técnica Elisa IgG anti*Toxoplasama* no se encontró relación significativa entre los resultados negativos y las variables estudiadas (Anexo D).

Al analizar las variables edad y edad gestacional de las gestantes con los resultados positivos obtenidos por la prueba Elisa IgG anti-*T.gondii,* no se encontró ninguna asociación estadística significativa (Anexo E).

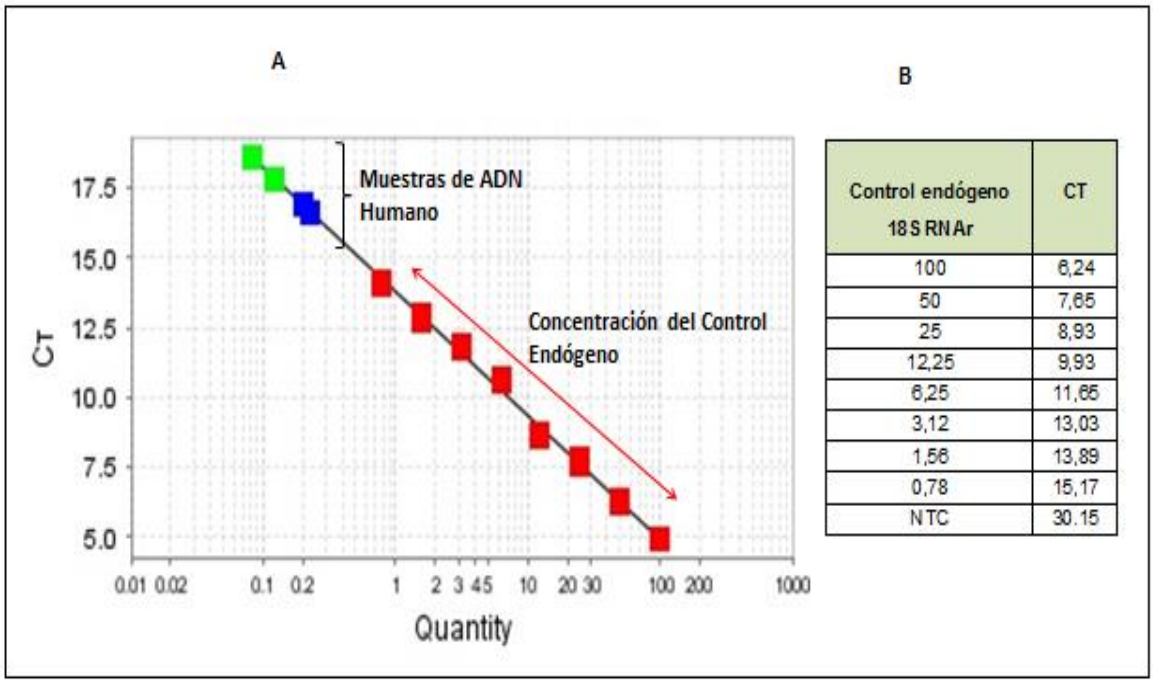
3.6 PCR EN TIEMPO REAL

Es necesario establecer la curva estándar del control interno, con el fin medir la eficiencia del protocolo de extracción de ADN y la curva estándar del control endógeno para determinar que el ADN a amplificar corresponda al parásito *T.gondii*.

3.6.1 Estandarización de la curva de calibración para el control Endógeno

Previo a la realización del PCR en tiempo real de las muestras de ADN, se realizó la estandarización de la concentración apropiada para el control de RNA ribosomal 18S utilizado como control endógeno, obteniéndose resultados con cantidades que van

desde 100 copias/ml (CT: 6,24) hasta 0,11 copias/ml (CT: 19,03) de ADN humano. Este control fue capaz de detectar ADN humano en todas las muestras evaluadas por PCR en tiempo real (Grafica 3).



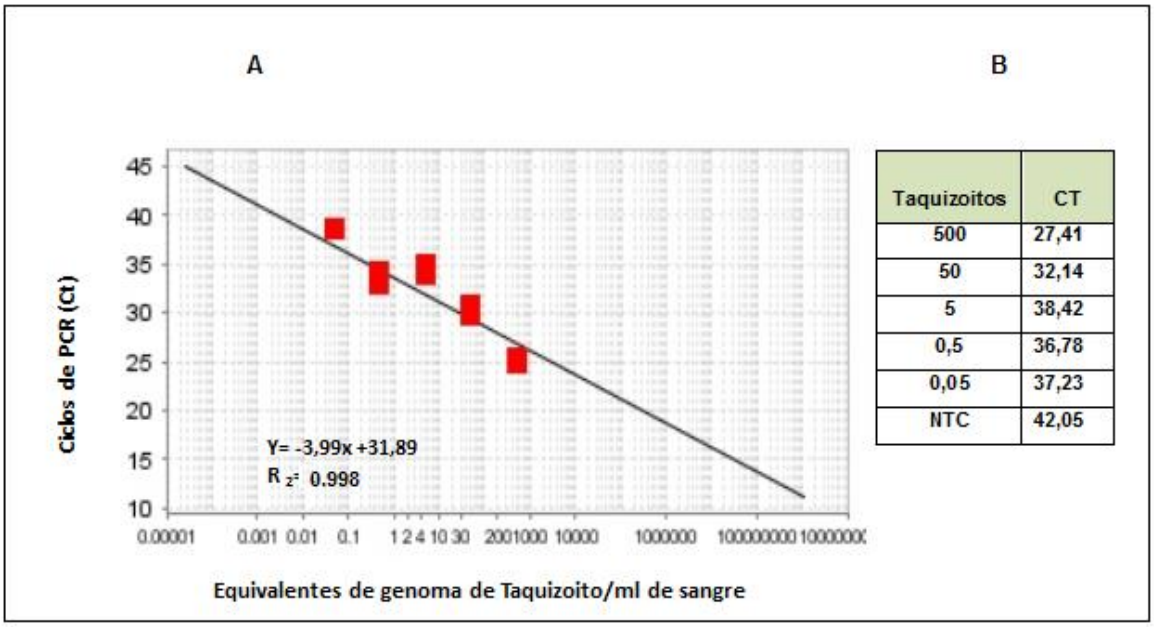
Control endógeno 18 S RNAr	CT
100	6,24
50	7,65
25	8,93
12,25	9,93
6,25	11,65
3,12	13,03
1,56	13,89
0,78	15,17
NTC	30.15

Gráfica 3. Curva estándar para el control endógeno 18s RNA ribosomal. Diluciones seriadas del ADN de humano extraido a partir de las muestras de sangre periférica de las gestantes, series de 100 a 0,11 copias/ml de ADN humano. (A) Valores de CT vs log (cantidad de ADN humano). (B) valores de CT para todos los puntos graficados. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes. NTC, no fue amplicado para el experimento.

3.6.2 Estandarización de la Curva para el control positivo específico para *T.gondii*

El ensayo fue capaz de detectar el fragmento de ADN de 529pb del elemento repetido de *Toxoplasma,* el cual está presente de 200-300 veces en el genoma del parásito a una concentración baja de 0,05 taquizoitos (CT: 37,23) en un volumen de 30 ul de reacción.

La curva estándar muestra un rango lineal alrededor de 5 concentraciones logarítmicas de DNA con un coeficiente de correlación de 0.998 y una eficiencia de amplificación del 99,8% (Grafica 4).

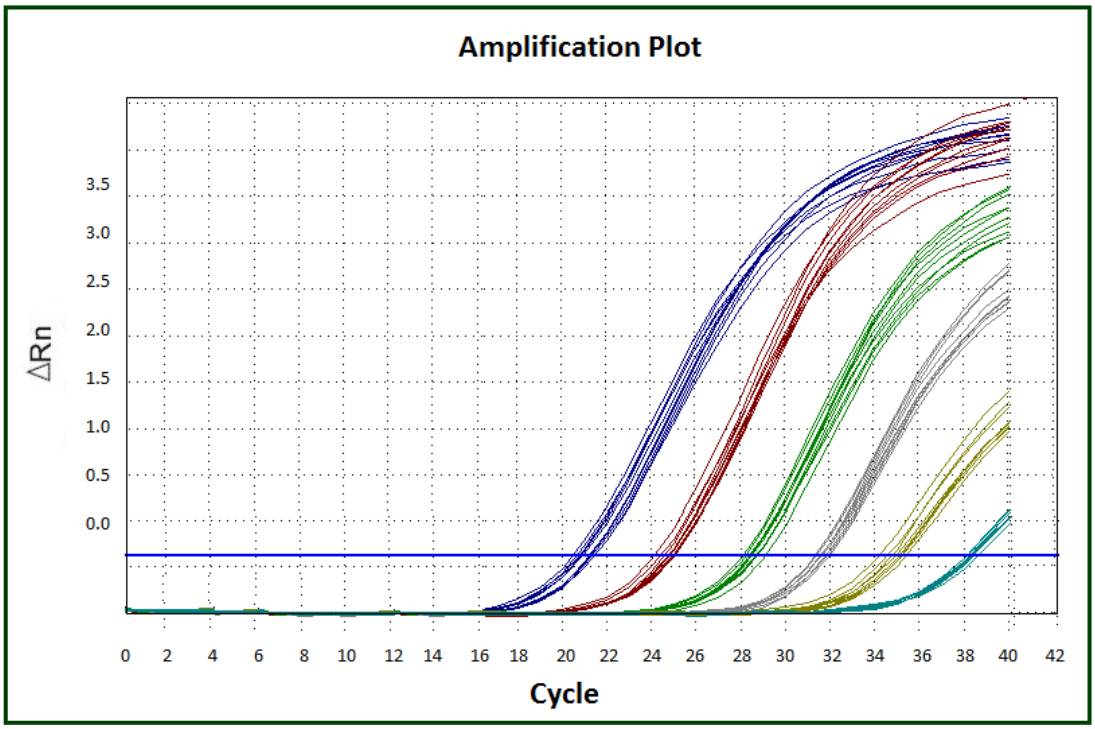


Taquizoitos	CT
500	27,41
50	32,14
5	38,42
0,5	36,78
0,05	37,23
NTC	42,05

Gráfica 4. Establecimiento de la curva estándar para la cuantificación de ADN *T.gondii*. Diluciones seriadas del ADN de T.gondii, series de 500 a 0,05 taquizoitos, fueron usadas como templado para los análisis de PCR en tiempo real (A) Valores de CT vs log (cantidad de taquizoitos). (B) valores de CT para todos los puntos graficados, el NTC, no fue amplicado para el experimento.

3.6.3 Detección de ADN de *T.gondii* mediante PCR en tiempo real

Del total de las muestras de sangre periférica de gestantes (220) procesadas por PCR en tiempo real, solo fue posible amplificar el ADN del parásito en 23 muestras de ADN de las gestantes, las cuales tenían un rango de edad gestacional entre el segundo y tercer trimestre (Grafica 5).Estos resultados indican una frecuencia de detección de ADN de *T.gondii* del 10.5% (Figura 15), estas muestras al ser analizadas por triplicado siempre fueron positivas y los controles negativos siempre fueron negativos.



Gráfica 5. Amplificación de las muestras positivas por *Toxoplasma* mediante PCR en tiempo real. Solo 23 muestras resultaron positivas para *T.gondii.* Las muestras de las gestantes fueron consideradas positivas solo cuando el fragmento amplificado mostraba un valor de CT menor de 40 ciclos de amplificación detectado luego de realizar la fase exponencial del PCR en tiempo real.

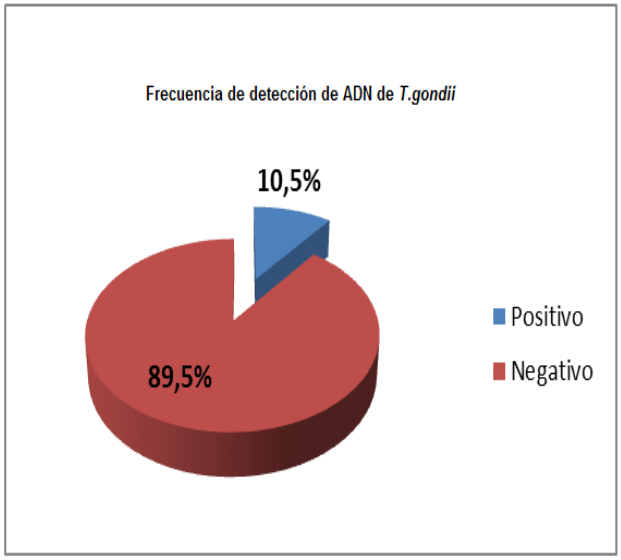


Figura 15. Frecuencia de detección de ADN de *T.gondii* encontrada en las gestantes del estudio positivas mediante PCR en tiempo real.

Al analizar las muestras de ADN de las gestantes evaluadas por PCR en tiempo real para determinar la presencia de infección reciente por *Toxoplasma*, el municipio que más resultados positivos por PCR tuvo fue Sincelejo (10 de 127), seguido por los municipios de San Marcos (5 de 27) y Corozal (4 de 27). El resto de las 197 (89,5%) muestras procesadas por PCR en tiempo real arrojaron resultados negativos para la presencia del parasito en sangre periférica (Tabla 7).

Detección de ADN de *T.gondii* mediante PCR en tiempo real			
Municipios	**PCR**		
	Positivo	Negativo	Total
Sincelejo	10	117	127
San Marcos	5	22	27
Tolú	1	10	11
Sampués	1	14	15
Ovejas	2	11	13
Corozal	4	23	27
Total	23	197	220

Tabla 7. Resultados prueba PCR en tiempo real por municipios

3.6.4 Cuantificación y estimación de la carga parasitaria en gestantes positivas por PCR en tiempo real

El PCR cuantitativo en tiempo real para el elemento repetido de *Toxoplasma gondii* fue capaz de detectar y cuantificar el ADN del parasito en mínimas cantidades (desde 0.04 hasta 1,63 copias/ml en 23 muestras), permitiendo de este modo estimar así la carga parasitaria de las gestantes positivas que van desde 0.06 hasta 3 taquizoitos/ml de *Toxoplasma gondii* en 5 ul de ADN de las gestantes en un volumen de reacción de 30

ul. El gen constitutivo del RNAr 18s fue correctamente amplificado en cada fase (media de Ct=30,59), indicando una uniformidad en la cantidad de ADN para todos los niveles de detección y la ausencia de agentes inhibidores en todas las muestras analizadas (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación y estimación de la carga parasitaria en gestantes positivas por PCR en tiempo real.

Detección y cuantificación de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre periférica por la técnica PCR en tiempo real				
Muestras	Control endógeno: CT	RETg de 529pb de ADN de T.gondii: CT	Cuantificación T.gondii: Copias/ml	Carga parasitaria T.gondii: Taq/ml
1[S]	30.76	35.85	0.154	0.25
2[S]	30.89	36.68	0.06	0.1
3[S]	31.05	37.23	0.05	0.084
4[S]	31.53	38.15	0.08	0.14
5[S]	31.56	39.8	0.13	0.13
6[S]	35.94	37.55	0.06	0.06
7[S]	32.98	35,5	1.63	3.00
8[S]	19.33	34.5	0.92	2.00
9[S]	30.49	35.4	0.55	1.00
10[S]	30.69	36.6	0.33	0.55
11[SM]	33.45	37.8	0.04	0.067
12[SM]	23.63	35.06	1.28	2.13
13[SM]	32.14	37.33	0.06	0.09
14[SM]	26.11	36.9	0.05	0.08
15[SM]	30.44	37.57	0.04	0.07
16[SP]	29.37	37.83	0.65	1.08
17[T]	28.23	39.99	1.09	1.09
18[C]	37.3	39.05	0.15	0.25
19[C]	37.09	35.58	0.11	0.18
20[C]	33.81	35.3	0.123	0.123
21[C]	32.08	37.0	0.725	0.725
22[O]	24.12	37.5	0.06	0.1
23[O]	32.23	38.3	0.45	0.74

S: Sincelejo, S.M: San Marcos, S.P: Sampues, T: Tolú, C: Corozal, O: Ovejas

3.6.5 Prueba PCR en tiempo real y factores de riesgo asociados con la toxoplasmosis en embarazadas del departamento de sucre.

De las 220 muestras de ADN procesadas por PCR en tiempo real procedentes de las gestantes incluidas en el estudio, fue posible detectar ADN del parasito *Toxoplasma gondii* en 23, de las cuales 2 tuvieron contacto con gatos, 13 manifestaron tener contacto con animales domésticos, 14 manifestaron haber consumido agua directamente del grifo durante el embarazo, 15 manifestaron consumir todos los tipos de carnes y 6 voluntarias presentaron afecciones como gripa, cefalea, infección vaginal, fiebre entre otros. Con respecto al tipo de vivienda habitada por las voluntarias infectadas, 6 manifestaron vivir en casas construidas de ladrillo y cemento con piso de cemento (Anexo F).

Por otro lado, 197 gestantes resultaron negativas por PCR en tiempo real y se encontró que 39 tuvieron contacto con gatos, 127 manifestaron tener contacto con otros animales, 42 manifestaron consumir agua directamente del grifo, 92 manifestaron consumir cualquier tipo de carne y 66 manifestaron haberse sentido enfermas durante el embarazo (Anexo F).

Con respecto al tipo de vivienda habitada 60 manifestaron vivir en casas construidas de ladrillo y cemento con piso de cemento. En este estudio, el contacto de las mujeres embarazadas con los gatos no está asociado significativamente con los resultados positivos por PCR en tiempo real (X^2=1.67, con P= 0.19, siendo P > 0.05) (Anexo F).

Asimismo, los hábitos alimenticios, el consumo de agua sin tratar (X^2= 0.30 y P= 0.58 con P> 0.05) y el consumo de carnes rojas y blancas, (X^2= 2.83 y P= 0.09, P > 0.05) no presentaron asociación significativa al correlacionarlos con los casos de infección por *T. gondii* (Anexo F).

Con respecto a las gestantes negativas por la técnica PCR en tiempo real no hubo relación significativa entre los resultados negativos y las variables estudiadas (Anexo

F). Al analizar las variables edad y edad gestacional de las gestantes con los resultados positivos obtenidos por la prueba PCR en tiempo real no se encontró ninguna asociación estadística significativa (Anexo G).

3.6.6 Correlación entre los resultados obtenidos por ELISA IgG e IgM anti-*T.gondii* y PCR en tiempo real.

Para los estudios de biología molecular fueron evaluadas 220 muestras de sangre periférica de las gestantes del estudio, estas muestras fueron clasificadas en tres grupos controles obtenidos de los resultados de las pruebas serológicas realizadas. 17 pacientes (7,73%) presentaban IgM e IgG positiva frente a T.gondii y fueron clasificados como grupo I(infección aguda); grupo II representado por 128 pacientes IgM negativa e IgG positiva (58,18%), individuos con sospecha de infección crónica y 75 casos negativos (34,1%) que fueron incluidos en el grupo III y constituyen individuos sin infección por *T.gondii* (Tabla 9).

Grupos controles	IgM	IgG	Número de pacientes
Grupo I	+	+	17
Grupo II	-	+	128
Grupo III	-	-	75

Tabla 9. Distribución de las 220 gestantes de acuerdo a la producción de anticuerpos específicos contra *T.gondii.*

Con respecto a los resultados obtenidos por la técnica PCR en tiempo real, solo fue posible detectar el ADN del parásito en un total de 23 muestras distribuidas en los 3 grupos. En las pacientes que presentaron toxoplasmosis reciente (grupo I), la presencia

del DNA de *Toxoplasma* fue detectada en 12 de 17 lo que corresponde a una sensibilidad diagnóstica del 70,58%, mientras un 4,6 % de positividad fue encontrado en el grupo de infección crónica (6/128, grupo II). El tercer grupo compuesto de individuos con resultados negativos para ambos IgM e IgG anti-*T.gondii*, el ensayo fue positivo en el 6,6% de los casos (5/75).

Los análisis estadísticos revelaron que la probabilidad de que una paciente IgM positivo presente parasitemia detectada por el ensayo TaqMan fue de 13,02 (odds ratio value) mayor que en un individuo IgM negativo ($p<0.05$). De acuerdo con los datos obtenidos en ambos grupos IgM negativos, la PCR en tiempo real mostró que el 97,45% de las muestras fueron negativas para la infección por *T.gondii*, mostrando una alta especificidad calculada usando el grupo I como grupo enfermo (IgM +) y el grupo II + III como grupo no enfermo (IgM-) (Tabla 10).

Detección de anticuerpos IgG e IgM anti*Toxoplasma*

Detección de ADN de T. gondii	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Total
PCR(+)	12 (70,58%)[1]	6	5	23
PCR(-)	5	122 (61,92%)[2]	70(35,53%)[2]	197
Total	17	128	75	220

Grupo I: infección aguda (IgG^+ e IgM^+); Grupo II: infección crónica (IgG^+ e IgM^-); Grupo III: gestantes sin infección (IgG^- e IgM^-). [1] Sensibilidad diagnóstica: 70,58%.[2] Especificidad diagnóstica: 97,45%.

Tabla 10. Asociación entre la presencia ($TaqMan^+$) o ausencia ($TaqMan^-$) del DNA de *T.gondii* y los grupos serológicos preestablecidos. En 12 muestras pertenecientes al grupo I, se detectó ADN de *T.gondii* por PCR en tiempo real, lo que corresponde a una sensibilidad del 70.58%; mientras que para el grupo II, solo 6 muestras fueron positivas para el parásito (4,6 %) y solo en 5 muestras del grupo III, el ensayo resulto positivo (6.6%). De acuerdo con los datos obtenidos en ambos grupos IgM negativos, la PCR en tiempo real mostró una alta especificidad del 97,45%.

Al asociar los resultados obtenidos a través del ensayo de PCR con los grupos serológicos preestablecidos, se observó una asociación positiva entre los valores de densidad óptica del ensayo serológico desarrollado para IgM y el número de parásitos en pacientes agudos (X^2= 71,16 y P= 0.0001, P > 0.05).

Al calcular los valores predictivos positivos para el ensayo PCR en tiempo real (TaqMan+), estos demuestran que el 52,17% de las gestantes presentaron DNA de *T.gondii* en sangre y también presentaron la enfermedad (IgM positiva:12/23). Los valores predictivos negativos revelaron que en el 89,54% de las embarazadas no se detectó el ADN del parásito y no presentaron la enfermedad (IgM negativa: 192/197).

4. DISCUSIÓN

La toxoplasmosis es una de las infecciones parasitarias más frecuentes del mundo; con 300 millones de personas infectadas, reportándose seroprevalencias en países desarrollados de clima templado que varía entre 10 y 50 %, y en países subdesarrollados del trópico hasta más de 80 % (Kaplan et al, 2009). En este estudio, en 145 muestras de sueros de gestantes del departamento de Sucre fue posible detectar títulos de anticuerpos tipo IgG anti*Toxoplasma* (>5.7- ≥200 UI/mL) a través de la prueba serológica ELISA, lo que corresponde a una frecuencia de detección de anticuerpos de IgG frente a *T.gondii* del 66%, lo cual demuestra que las participantes del estudio habían sufrido un episodio de infección por *Toxoplasma*. El resto de las 75 participantes resultaron ser negativas frente a la infección por *T.gondii*; sin embargo, en 28 gestantes negativas se detectaron títulos muy bajos de anticuerpos IgG anti*T.gondii* (<5,7 UI/ml), estos pudieron deberse a lo reportado por Spalding y otros, quienes refieren que las encuestas serológicas han permitido estimar que más de 10 % de la humanidad ha tenido contacto con este parásito, por lo que la prevalencia de anticuerpos en la población sana es elevada; a su vez plantea que la relación existente entre el clima caluroso y húmedo aumenta la frecuencia de esta enfermedad (Spalding et al, 2005). Por otra parte la alta seroprevalencia de toxoplasmosis encontrada en el departamento de Sucre, confirma la frecuente circulación del parásito en esta zona, adicionalmente, establece la importancia de construir y ejecutar programas de prevención de la infección en la población susceptible a primoinfectarse con el parásito, es decir, el grupo de embarazadas cuya prueba de detección de anticuerpos tipo IgG anti-*T. gondii* resultó seronegativa (0.0 UI/ml).

Para determinar el momento aproximado de la infección en las gestantes seropositivas a IgG se estudiaron los anticuerpos IgM específicos. Su presencia aparece en la primera semana de la infección y es un marcador de fase aguda de la enfermedad. En el transcurso de varios meses desaparece y su ausencia indica una infección de más de 6 meses de evolución (Holland et al, 2006; Montoya et al, 2002). En esta

investigación solo 17 gestantes resultaron positivas para la prueba IgM anti*Toxoplasma*; lo que podría indicar una infección reciente en las gestantes del estudio. De acuerdo con esto, en el departamento de Sucre existe una alta incidencia de infección por *T. gondii* correspondiente al 7,7%. Estos datos permiten informar a los entes encargados del sector salud, acerca de la importancia que tiene la confirmación y seguimiento de estas voluntarias con diagnóstico de toxoplasmosis congénita, para así instaurar el tratamiento oportuno en estas gestantes y poder reducir las secuelas de esta enfermedad en los neonatos.

Al correlacionar los resultados positivos por ELISA IgG e IgM anti*Toxoplasma* con las variables del estudio se encontró que la convivencia con gatos, no tuvo asociación estadística, a pesar de que 3 de las 17 gestantes con resultados positivos para la detección de anticuerpos IgG e IgM frente a *T.gondii* manifestaron convivir con gatos en sus viviendas y tener visita de gatos callejeros. Con referencia al consumo de agua, se encontró que 9 gestantes con Elisa IgG e IgM positivo tomaban agua directamente del grifo y 2 gestantes tomaba el agua de fuentes sin tratar como pozos acuíferos. Aunque este estudio no mostró que el beber agua directamente del grifo estuviera asociado con el riesgo de infección, tampoco demuestra lo contrario debido a que 4 gestantes que manifestaron consumir agua tratada de bolsa y 2 gestantes que consumían agua hervida resultaron positivas para la detección de anticuerpos tanto IgG e IgM anti*Toxoplasma*.A pesar de que muchos autores consideran que las principales formas de infección es a través de la ingestión de ooquistes excretados por el gato y el consumo de carne mal cocida de animales infectados con quistes de *T. gondii* (López C et al.2005), en este trabajo no se encontró una asociación estadísticamente significativa al correlacionar los resultados positivos por ELISA IgG e IgM anti*Toxoplasma* con las variables del estudio; sin embargo, no se descarta la posibilidad de una infección adquirida en las gestantes por el consumo de alimentos fuera de la vivienda. Aunque este estudio no mostró que el material de la vivienda y el piso de la vivienda estuviera asociado con el riesgo de infección, tampoco se demuestra lo contrario debido a que 5 gestantes que resultaron positivas por ELISA IgG e IgM anti*Toxoplasma* manifestaron vivir en viviendas artesanales con pisos de

tierra, y no se descarta que estas gestantes se encontraran expuestas al contacto directo con ooquistes presentes en la tierra.

El diagnóstico de laboratorio de la toxoplasmosis está lejos de ser 100% conclusivo usando el arsenal de metodologías disponibles en estos días. La serología desarrollada con las técnicas sensitivas más avanzadas trae la posibilidad de resultados positivos por IgM sin representación de la fase activa de la enfermedad. Al contrario, la detección de anticuerpos corresponde a las IgM residuales que se pueden presentar incluso años después de un episodio agudo. La prueba molecular que permite detectar la presencia de parásitos circulantes podría ser de extrema aplicación en este escenario. Un resultado serológico positivo es solamente indicativo de infección, mientras la detección directa de *T.gondii* en sangre u otras muestras clínicas categóricamente confirman la presencia del parásito importante para el diagnóstico de toxoplasmosis primaria, reactivada o crónica (Basten, 2002).

Al evaluar las muestras de sangre periférica de las gestantes por PCR en tiempo real, solo fue posible dectectar la presencia de ADN de *T.gondii* en 23 muestras de 220 embarazadas, lo que corresponde a una frecuencia de detección de ADN del parasito del 10,5%, estos resultados confirman un diagnóstico de infección reciente frente a *T.gondii*. Este hecho refleja la gran sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real en la detección temprana de casos de toxoplasmosis. Por otra parte esta técnica fue capaz de detectar ADN del parásito en pequeñas cantidades (Ponce N & Gomez J. 2003) como fue demostrado en este estudio, donde se logró amplificar y cuantificar ADN de *T. gondii* a una concentración de 0,05 copias/reacción en un volumen de reacción de 35 ul. La alta sensibilidad de la PCR también se explica por el empleo de cebadores dirigidos a la amplificación de un segmento de ADN de 529pb del elemento repetido de *Toxoplasma*, el cual se encuentra altamente repetido de 200 a 300 veces en el genoma del parásito (Jones C et al. 2000). Estos resultados aportaron información valiosa que permitió suministrar tratamiento oportuno a las gestantes para disminuir las secuelas en los recién nacidos.

Los resultados positivos por PCR en tiempo real en muestras negativas por ELISA IgG anti*Toxoplasma* demuestran la presencia de parásitos en sangre, lo cual indica que se está frente a una infección reciente en la cual no se ha producido una respuesta inmune referente a la producción de anticuerpos IgG anti*Toxoplasma*, desarrollándose una respuesta inmune innata con la producción de citocinas y la activación de células fagocíticas la cual sería suficiente para controlar la infección; por lo que se recomienda evaluar cuatro semanas más tardes los títulos de IgG para determinar seroconversión en las gestantes. De acuerdo a estos resultados se demuestra la utilidad de la prueba de PCR en tiempo real en el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis congénita.

Los resultados positivos por ELISA IgG e IgM y negativos por PCR demuestran que el período de circulación de *Toxoplasma gondii* en sangre es muy corto, debido a que el parásito después de la fase aguda se enquista en diferentes órganos, particularmente retina, músculo esquelético, miocardio, tejido linfático, placenta y más frecuentemente en el sistema nervioso central (Martín I & García S.2003). Adicionalmente, los resultados negativos por PCR no excluyen una infección reciente por *T. gondii* debido a posibles variaciones en la manipulación durante el proceso de extracción de ADN; además, es probable que después de extraer el ADN persistan agentes inhibidores que influyan en los resultados del PCR.

Los resultados del presente estudio demuestran la importancia del monitoreo serológico en mujeres durante el embarazo, especialmente en las gestantes seronegativas debido a que estas podrían adquirir la infección por *Toxoplasma gondii* en cualquier etapa de la gestación, como fue demostrado en este estudio donde fue posible detectar, por PCR en tiempo real, infección reciente en 5 de 47 gestantes con prueba Elisa IgG anti*Toxoplasma* seronegativa durante el segundo y tercer trimestre de gestación, períodos durante los cuales el riesgo de infección por *Toxoplasma gondii* es mayor una vez el parásito atraviese la placenta y las manifestaciones clínicas en el niño son tardías ó asintomáticas (Nimri Let al, 2004). Esto equivale a una frecuencia de detección de ADN de *T. gondii* del 10,63% en gestantes seronegativas, datos similares a los reportados por Blanco P et al (2011), en donde se reportó una frecuencia de

detección del parásito en muestras de sangre de gestantes seronegativas para la prueba ELFA IgG anti-*T.gondii* del 12% (12/100).

Las muestras analizadas fueron evaluadas por pruebas serológicas, debido a la sospecha clínica de la toxoplasmosis, lo que podría traer un sesgo en la positividad global; sin embargo, la distribución observada fue similar a la de estudios previos, considerando que el 66% de las muestras (17 del grupo I y 128 del grupo II, en un total de 220 gestantes) reveló la detección de inmunoglobulinas en suero, lo cual es indicativo de infección aguda o latente. La positividad no tan alta encontrada entre las muestras IgM positivas (70,58%) podría deberse al uso de capaz leucocitarias como material clínico para la extracción de ADN. El procedimiento usado para recuperar la capa leucocitaria podría interferir con la sensibilidad del PCR, y la posibilidad de que los parásitos puedan ser sedimentados junto con eritrocitos no puede ser excluida (Hitt and Filice 1992). Es sabido que la capa leucocitaria no representa un material ideal para analizar la presencia de T. gondii en casos agudos si uno considera la alta preferencia del protozoo por otros tejidos. Otro factor que podría explicar la proporción de 29,4% de las muestras que revelaron resultados de PCR negativo y serología reactiva para IgM es la probabilidad de encontrar pacientes con IgM residuales detectadas durante periodos prologados de tiempo, incluso después del final de un episodio agudo y la consecuente erradicación de la parasitemia (Ho- Ye et al ,1992; Cantos et al, 2001). Además de la sensibilidad inherente de diversos ensayos relacionados hasta ahora, la distribución no uniforme de *Toxoplasma* en muestras clínicas que contienen sólo unos pocos parásitos también puede explicar los hallazgos discordantes. Guy & Joynson (1995), usando un formato de PCR convencional encontró solo un 53% de pacientes positivos hasta 5 semanas después de infección, sugiriendo que un resultado no excluye un episodio de infección reciente.

Más relevante fue el resultado obtenido con los otros dos grupos IgM negativos, teniendo en cuenta que, al menos teóricamente, estos corresponden a muestras de individuos sin la parasitemia. En este sentido una alta especificidad del 97,45% fue encontrada usando el grupo I como grupo enfermo (IgM +) y grupo II + III como grupo

no enfermo (IgM -). La detección de ADN de *Toxoplasma* en 6 de 128 gestantes con infección crónica es sorprendente, ya que es conocido que pacientes con toxoplasmosis latente presenten parasitemia intermitente baja carga parasitaria. Estudios previos han descrito PCR positivo en individuos IgM negativo, provocando sospecha de falsos positivos o alternativamente, considerando que la parasitemia puede ser más prevalente de lo esperado en la fase crónica de la enfermedad (Grob et al , 1992; Johnson et al 1993; Guy & Joynson 1995). Wong & Remington (1993) sugieren la posibilidad que los bradizoitos de *T.gondii* pueden ser liberados de quistes de tejidos e invaden células vecinas, eventualmente culminando con parásitos circulando en infecciones crónicas. Pelloux et al (1997) encontró PCR positivos en sangre de pacientes inmunodeficientes sin encefalitis toxoplásmica. Algunos autores discuten la posibilidad de transmisión vertical en mujeres embarazadas infectadas crónicamente en casos de reactivación (Romand et al. 2004). Estos hallazgos conducen a la interpretación que las infecciones de toxoplasmosis crónica son capaces de promover resultados positivos por PCR cuando el parásito se encuentra en circulando.

Sin embrago, los 5 casos seronegativos del grupo III (IgG e IgM negativos) que fueron positivos en los ensayos moleculares son intrigantes. Una posible explicación es que estas voluntarias no son capaces de producir anticuerpos específicos representando un estado de inmunodeficiencia. O alternativamente, podría corresponder a una infección muy reciente al momento del ensayo serológico, ocasionando una insuficiente producción de inmunoglobulinas no detectadas por serología. Por otra parte, estas muestras fueron obtenidas de embarazadas con riesgo de presentar primoinfección por *T.gondii,* una vez que la prueba serológica fue ordenada por sospecha clínica. Estos resultados confirman la importancia que tiene el monitoreo serológico en las gestantes seronegativas para IgG anti-*T.gondii* debido al alto grado de exposición frente a este parásito (Blanco P et al, 2011).

La probabilidad de tener un PCR en tiempo real positivo fue de 13,02 mayor en las gestantes con infección aguda que en las gestantes con contacto pasado con el

protozoo- toxoplasmosis crónica, ó en aquellas que presentaron serología negativa-sin infección. Estas diferencias fueron reportadas como estadísticamente significativa ($p<0.05$). En este estudio también se evidencio diferencias considerables con respecto a la carga parasitaria en las muestras con infección aguda (n=12) comparado con aquellas del grupo de gestantes no enfermas, con IgM negativa (n=11) ($p<0.01$). Estos hallazgos expresan un incremento en el número de parásitos en las muestras serológicamente identificadas como toxoplasmosis aguda. Los datos estadísticos también demostraron una correlación positiva entre los valores de densidad óptica de la prueba serológica IgM y el número de protozoos circulando en gestantes con toxoplasmosis reciente ($p<0.0001$). El protocolo TaqMan muestra una alta capacidad para detectar las muestras verdaderas negativas, considerando que 89,54% de los pacientes que no pueden ser detectados no eran realmente enfermos (IgM -, grupo II +III).

Al analizar los resultados positivos por PCR en tiempo real con las variables del estudio se encontró que la convivencia con gatos, no tuvo asociación estadística, a pesar de que 2 de las 23 gestantes manifestaron convivir con gatos en sus viviendas y tener visita de gatos callejeros. Con respecto al consumo de agua, se encontró que 14 del total de gestantes con PCR positivo tomaban el agua directamente del grifo. Aunque este estudio no mostró que el beber agua directamente del grifo estuviera asociado con el riesgo de infección, tampoco demuestra lo contrario debido a que 6 gestantes que manifestaron consumir agua hervida y 2 gestantes que consumían agua tratada o de bolsa resultaron positivas por PCR. En este trabajo no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las variables consumo de carnes y tipo de vivienda con los resultados positivos por PCR; sin embargo, no se descarta la posibilidad de una infección adquirida en las gestantes por el consumo de alimentos fuera de la vivienda y el contacto directo con ooquistes presentes en la tierra. Al analizar los resultados obtenidos entre las gestantes negativas por la técnica Elisa IgG e IgM anti*Toxoplasma* y PCR en tiempo real no hubo una relación significativa entre los resultados negativos y las variables estudiadas.

Este estudio demuestra la importancia de la combinación de la técnica de PCR en tiempo real con las pruebas serológicas para establecer un diagnóstico más certero y oportuno, al momento de reportar posibles casos de toxoplasmosis congénita, y la posibilidad de incluirlas como herramientas diagnósticas dentro de los programas de vigilancia epidemiológica de la toxoplasmosis en el país.

5. CONCLUSIONES

Se confirma la utilidad de la técnica de PCR en tiempo real en la detección de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre periférica de gestantes con diagnóstico de infección reciente, infección crónica y en gestantes sin la infección, aportando de este modo información oportuna para el suministro del tratamiento a las gestantes con el fin de reducir las secuelas de la enfermedad en los recién nacidos.

La frecuencia de detección de ADN de *T. gondii* del 10,5% mediante la técnica de PCR en tiempo real demuestra que la toxoplasmosis congénita sigue siendo un problema de salud pública en Colombia, de ahí la importancia de desarrollar programas de prevención y seguimiento a embarazadas susceptibles de adquirir la infección.

La PCR en tiempo real por ser una técnica de diagnóstico molecular cuantitativa, logró cuantificar pequeñas cantidades de ADN de *T. gondii* (0,05 copias/reacción) y de este modo permitió estimar la carga parasitaria de las gestantes para así evaluar los niveles de parásitos en sangre periférica luego de ser suministrado el respectivo tratamiento a las gestantes del estudio. La alta sensibilidad de la PCR también se explica por el empleo de primers dirigidos a la amplificación de un segmento de ADN de 529pb del elemento repetido de *Toxoplasma*, el cual se encuentra altamente repetido de 200 a 300 veces en el genoma del parásito. (Jones C et al. 2000).

Los valores de sensibilidad (70,58%) y especificidad (97,45%) diagnóstica encontrados entre los grupos de gestantes con infección reciente y los grupos de gestantes sin infección por PCR en tiempo real demuestran la reproductividad y confiabilidad del ensayo.

6. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta, la alta prevalencia de la toxoplasmosis registrada en las gestantes del departamento de Sucre (66%), y la frecuente circulación del parásito en esta zona, se sugiere desarrollar programas de prevención y monitoreo serológico en gestantes del departamento, principalmente en gestantes susceptibles de adquirir la infección por *Toxoplasma gondii*.

Implementar nuevas técnicas serológicas para la detección de infección por *Toxoplasma gondii*, debido a que las pruebas comerciales comúnmente utilizadas podrían estar arrojando resultados falsos positivos y falsos negativos, que interfieren en el adecuado manejo y tratamiento de la toxoplasmosis congénita y podrían poner en riesgo la salud de fetos en gestación.

Se sugiere un seguimiento clínico completo a los niños producto de madres con resultados positivos por la técnica de PCR anidado para determinar la severidad de la infección e instaurar un tratamiento oportuno.

Se hace necesario desarrollar nuevas investigaciones que ayuden a aclarar los mecanismos de regulación inmunológica desarrollados en gestantes positivas por PCR en las que no se demostró producción de anticuerpos tipo IgG.

REFERENCIAS

Abdul-Ghani R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. Parasitol Res. 2011;108(3):505-12.

Adomako Y, Wier G & Boyle J. Beyond the genome: recent advances in *Toxoplasma gondii* functional genomics. Parasite Immunology, 2012: (34); 80–89.

Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E.Transmission of Toxoplasma gondii in an urban population of domestic cats (Felis catus). Int. J. Parasitol, 2006; 36:1373– 1382.

Aguilar F. Parasitología Medica. 3ra ed. Guatemala: Litografía Delgado, SA; 1997. p:281-92.

Ajioka J, Fitzpatrick J and Reitter C.*Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Exp.Rev. Mol. Med.2001:1- 19.

Anthony R, Christensen H, Johnson C. Micro enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of new world leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1980; 29(2):190-4.

Arias A.Toxoplasmosis en la embarazada. Argentina. 2002 http://www.webmedicaargentina.com.ar.

Barragan A & Sibley D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers.Trends in Microbiology, 2003; 11(9): 426- 430.

Basten P. Molecular diagnosis of Toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg; 2002, 96:S205-S215.

Biagi, F. Toxoplasmosis, en: Enfermedades Parasitarias, 2004; El Manual Moderno; 173-186.

Black M & Boothroyd J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii.* Microbiology and Molecular Biology,2000; 64(3): 607-623.

Blanco P, Assia Y, Montero & Orozco K. ELFA IgG anti-*Toxoplasma* y PCR anidada para el diagnóstico de la toxoplasmosis en gestantes de Sincelejo (Sucre), Colombia. Revista de la Asociación Colombiana de Infectiología, 2011; 15(4):255-260.

Bonfioli A & Orefice F.Toxoplasmosis. Seminars in Ophthalmology, 2005: 20(3), 129-141.

Bontell I, Hall N, Ashelford K, et al. Whole genome sequencing of a natural recombinant Toxoplasma gondii strain reveals chromosome sorting and local allelic variants. Genome Biol, 2009; 10: R53.

Botero D & Restrepo M. Toxoplasmosis, en: Parasitosis Humana. 4ta edición, 2003;Corporación para investigaciones biológicas, 262-279.

Boye K, Holfels E, Roizen N. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. Obstet Gynecol 2005; 1:564-571.

Burg J, Grover C, Pouletty P, Boothroyd J. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, Toxoplasma gondii, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol,1989, 27:1787-1792.

Burg J, Perelman D, Kasper L, Ware P, Boothroyd J. Molecular analisys of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii.* J Inmunonol,1988; 141: 3584-3591.

Carrada T. Toxoplasmosis:parasitosis reemergente del nuevo milenio. Revista mexicana de patología clínica, 2005; 52(3): 151-162.

Carruthers V, Boothroyd J.Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. Curr.Opin. Microbiol, 2007; 10:83– 89.

Casanovao R, Casanova Carrillo P & Casanovao C. Toxoplasmosis cerebral durante la infección por el virus de inmunodeficiencia humana. Revista Cubana de Medicina, 2002; 41(5): 1-9.

Chien-Ching H, Chia-Kwung F, Kua-Eyre S, Fung-Chang S, Hung-Yi Ch, Vilfrido G, Carvalho J,Cruz C, Yu-Kuan L, Lian-Fen T, Ke-Yun S, Wen-Cheun Ch, Hung-Shue L & Shing-Hsien Ch. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in the democratic Republic of Sao Tome and Principe. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2007; 101(2): 134-139.

Conrada M, Millerb C. Kreudera E, Jamesd J, Mazeta H, Dabritza D, Jessupb F, Gullandc M, Griggd P. Transmission of Toxoplasma: Clues from the study of sea otters as sentinels of Toxoplasma gondii flow into the marine environment. International Journal for Parasitology, 2005: 35;1155–116.

Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A & Picot S. Evaluation of a real time PCR based assay using the ligthcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradizoite gene in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. Int Parasitol, 2005; 35: 275- 283.

Cook A, Gilbert R, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum P, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case- control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ 2000;321(7254):142–7.

Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004;22: 299-305.

Dannemann B, Vaughan W, Thulliez P, Remington J. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii.* J. Clin. Microbiol, 1990; 28(9):1928-1933.

De Miguel J, Cavero A & Montero J, Toxoplasmosis: principales problemas materno-fetal. Actualidad Obstétrico Ginecológica, 2002; 14(1): 45-51.

Dennis Y, Chiu R & Allen K. Methods in Molecular Biology Clinical Applications of PCR. 2da edición, 2006; Humana Press, 1-18.

Desmonts G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Lancet. 1985;1:500– 504.

Desmonts G, Remington J. Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: Method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol, 1980; 11(6):562-568.

Devada K, Anandan R, Dubey J. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras. Indian J. Parasitol, 1998;84(3):621-622.

Dong X, Sanya J Sanderson A, Jones R, Prieto H, Yates J, Bromley E, Tomley F, Lal§ K, Sinden§ R, Brunk B, Roos D and MWastling J. The proteome of *Toxoplasma*

gondii: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. 2008.

Dubey J, Desmonts G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Vet. J. 1987; 19(4):337-339.

Dubey J, Frenkel J. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J. Protozool. 1972; 19:155–177.

Dubey J, Lindsay D & Speer C. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of tissue Cysts. Clinical Microbiology Reviews, 1998; 11(2): 267-299.

Dubey J, Lindsay D, Lappin M. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2009;39(6):1009–34,v.

Dubey J. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. Int. J. Parasitol. 1998, 28:1019 –1024.

Dubey J. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma gondii*. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Academic Press, 2007; pp. 1-17.

Dubey J. Toxoplasmosis of Animals and Humans. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2010; pp 313.

Dubey J. Toxoplasmosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1994, 205:1593-1598.

Dubey J.History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int. J.Parasitol. 2009a; 39 (8), 877-882.

Dubremetz J. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. Cellular Microbiology, 2007; 9(4): 841-848.

Edvison B, Lappalainen & Evergand B. Real- Time PCR targeting a 529-Pb repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin Microbiol Infect, 2006; 12: 131-136.

Eida O, Eida M & Ahmed A. Evaluation of polymerase chain reaction on amniotic fluid for diagnosis congenital toxoplasmosis. J Egypt Soc Parasitol, 2009; 39: 541-550.

El Hajj H, et al. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of Toxoplasma gondii. PLoS Pathog, 2007; 3:e14.

El-On, J. & Peiser J. Toxoplasma and toxoplasmosis. Harefuah, 2003; 142(1): 48-55, 77.

Elsheikha H. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. Public Health, 2008; 122(4): 335-353.

Estrada A, Lemus G, Portillo D. Determinación serológica de anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii* en mujeres en edad fértil que habitan en varias comunidades del departamento de Zacapa de febrero a julio del año 2011. Tesis de Pregrado. Universidad San Carlos de Guatemala. 2012:1-83.

Ferguson D.Toxoplasma gondii and sex: essential or optional extra? Trends Parasitol, 2002;18:355–359.

Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of Toxoplasma gondii in both the intermediate and definitive host. Int. J. Parasitol, 2004;34:347–360.

Ferrandiz J, Mercier C, Wallon M, Picot S, Cesbron-Delauw MF, Peyron F. Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii,* for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. Clin. Diagn. Lab. Immunol, 2004; 11(6):1016-1021.

Figueiredo J, Silva D, Cabral D & Mineo J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the indirect haemaglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the region of Uberlândia, Brazil. Mem. Inst. Osvaldo Cruz, 2001; 96:687-692.

Filisetti, D., & Candolfi, E. (2004). Immune response to Toxoplasma gondii. Ann Ist Super Sanita, 40(1), 71-80.

Gagne S. Toxoplasmosis. Primary Care Update for OB/GYNS, 2001; 8(3): 122- 126.

Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, et al. ToxoDB: an integrated Toxoplasma gondii database resource. Nucleic Acids Res, 2008; 36: D553–556.

Gallego D. Caracterización molecular de aislamientos de *Toxoplasma gondii:* asociación entre virulencia y su importancia epidemiológica. Memorias del XII congreso colombiano de parasitología y Medicina Tropical Bogotá-Colombia. Revista Biomédica del Instituto Nacional de Salud, 2005; 25 (supl.1): 70-73.

Gangneux F & Dardé M. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Rev. 2012, 25(2):264.

Garweg J, Scherrer J, Wallon M, Kodjikian L, Peyron F. Reactivation of ocular toxoplasmosis during pregnancy. BJOG 2005;112(2):241–2.

Ginorio D. *Toxoplasma gondii*, en:Microbilogía y Parasitología Médicas, Llop A, Valdés-Dapena M & Zuazo J [eds]. 2001; Ciencias Médicas, 141-149.

Gómez F, Gracia M. Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alturgell, parte I.TesisDoctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Biología Animal, 2004; 1-46.

Gómez J, Montoya M & Castaño J. A maternal Screening program for congenital in Quindío-Colombia and applications of mathematicals models to estime Incidences Using Age- Stratified Data. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1997; 57(2): 180-186.

Gómez J. Tratamiento de la toxoplasmosis: Esquemas para la forma congénita y en el inmunosuprimido. Revista de Salud Pública, 2002; 4 (Supl.1): 35-42.

Grigg M, Bonnefoy S, Hehl A, Suzuki Y & Boothroyd J. Success and virulence in Toxoplasma as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science 2001; 294: 161–165.

Hassl A, Muller W, & Aspock H. An identical epitope in Pneumocystis carinii and Toxoplasma causing serological cross-reactions. Parasitol. Res,1991;73:351-352.

Hide G, Gerwash O, Morley E, Williams R, Hughes J, Thomasson D, Elmahaishi M, Elmahaishi K, Terry R, & Smith J. Does vertical transmission contribute to the prevalence of toxoplasmosis?. Parasitologia, 2007; 49(4): 223-226.

Higuchi R, Fokler C, Dollinger G & Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology 1993;11: 1026-30.

Hoff E, Carruthers V. Is Toxoplasma egress the first step in invasion? Trends Parasitol 2002; 18:251–5.

Hofflin J, Remington J & Sharma S. In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1985 Dec;135(6):4160–4163.

Holland G. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment Part I: epidemiology and course of disease. American Journal of Ophthalmology, 2003; 136(6): 973-988.

Holland GN, O'Connor GR, Belfort Jr R, Remington JS. Toxoplasmosis. En: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR, editors. Ocular infection and immunity. St Louis: Mosby Year-Book; 2006. p. 1183-223.

Homan W, Vercammen M, De Brekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 pb DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR .Int T Parasitol, 2000;30: 69-75.

Hunter C & Sibley L. Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. Nat Rev Microbiol, 2012;10(11), 766-778.

Jacobs L, Lunde M.A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasitol, 1957; 43(2):308-314.

Jenum P & Stray B. Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary Toxoplasma gondii infection in pregnant women. J Clin Microbiol, 1998; 36(10),2907-2913.

Jiménez, M., Acosta, K., Guzmán, E., Puerto, M., & Ortega, A. (2012). Toxoplasmosis: A relevant zoonotic food borne disease in tropical conditions. African Journal of Microbiology Research, 6(12), 2956 - 2964.

Jones C, Okhravi N, Adamson P, Tasker S & Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2000; 41(3): 634-644.

Jones J, Dubey J. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. Exp. Parasitol, 2010; 124:10– 25.

Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H, et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV- infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep. 2009;58(RR-4):1-207.

Kaye A. Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants.Journal of Pediatric Health Care, 2011; 25 (6): 354-364.

Khan A, Fux B,SU C, Dubey J, Darde M, Ajioka J, Rosenthal B & Sibley L. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. PNAS, 2007;104 (37): 14872-14877.

Khan A, Taylor S, Su C, Mackey A, Boyle J, Cole R, Glover D, Tang K, Paulsen L, Berriman M, Boothroyd J, Pfefferkorn E, Dubey J, Ajioka , Roos D, Wootton J & Sibley L. Composite genome map and recombination parameters derivedfrom three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Research, 2005; 33(9): 2980-2992.

Kompalic A, Frotta C, Suárez M, Fernandez O, Britto C.Evaluation of real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. Parasitol Res, 2007;101:619-625.

Laliberte J, Carruthers V. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. Cell.Mol. Life Sci, 2008;65:1900 –1915.

Lehmann T, Marcet P, Graham D, Dahl E & Dubey J. Globalization and population structure of *Toxoplasma gondii*. PNAS, 2006; 103(30):11423-11428.

Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. J Clin Microbiol 1997;35(1):174–8.

Lin M, Chen T, Kuo T, Tseng Ching-Chung & Tseng Ching –PingReal -Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. Journal of Microbiology, 2000; 38(11): 4121-4125.

López C, Díaz J & Gómez J. Factores de riesgo de mujeres embarazada infectadas por Toxoplasma gondii en Armenia-Colombia. Revista de Salud Pública, 2005; 7(2): 180-190.

López –Meza. Reporte de un Caso Clínico Toxoplasmosis Cerebral. A S Sin. 2009; 3(3):63-64.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis 1992;15:211–222.

Machado N, Manrique E, Ruiz B & Blanco P. Alta frecuencia de seroconversión toxoplásmica en gestantes de Sincelejo-Sucre. Infectio,2004; 8(4): 263-266.

Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, Roberts CW, Estes RG, David C, et al. HLA- class II genes modify outcome of Toxoplasma gondii infection. Int J Parasitol 1999; 29:1351-1358.

Mai K, et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2009; 104:281–289.

Martín I & García S. Toxoplasmosis en el hombre. Bioquímica, 2003; 28(3):19-27.

Martín I. Toxoplasmosis congénita: una mirada al problema. Revista Biomédica, 2004; 15(3):181-190.

Meireles L, Galisteo A, Pompeu E, Andrade H.*Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. Trop. Med. Int. Health, 2004; 9(8):876-881.

Menotti J, Garin Y, Thulliez P, Sérugue M,Stanislawiak J, Ribaud P et al. Evaluation of a new 5´- nuclease real time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. Clin Microbiol Infect, 2010; 16: 363-368.

Mercier C, Adjogble K, Daubener W, Delauw M. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? Int. J. Parasitol,2005; 35:829–849.

Mesquita R, Ziegler A, Hiramoto R, Vidal J, & Pereira V. Real time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human inmunodeficiency virus infected patients.Journal of Medical Microbioloy, 2010; 59: 641-647.

Mondragón M, González S, González M & Mondragón R. Extrusión del conoide en taquizoitos de *Toxoplasma gondii*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Departamento de Bioquímica. México. 2005, 1-2.

Montoya J, Remington J. Management of Toxoplasma gondii infection during pregnancy. Clin Infect Dis 2008;47(4):554–66.

Morel G & Raccurt M. Methods in visualization by PCR, RT-PCR in situ light and electron microscopy, 2003; CRC Press, 87-108.

Munoz, M., Liesenfeld, O., & Heimesaat, M. M. (2011). Immunology of *Toxoplasma gondii*. Immunol Rev, 240(1), 269-285.

Nagaty I, Ibrahim K, Abdel-Tawab A, Hassan A. Diagnosis of Toxoplasma gondii by ELISA and PCR in mothers and their infants. J Egypt Soc Parasitol, 2009; 39(2):625-32.

Nagy B, Ban Z, Beke A, Nagy GR, Lazar L, Papp C, Toth-Pal E, Papp Z. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. Clin. Chim. Acta, 2006; 368(1-2):131- 137.

Nazan Dalgıç.Congenital *Toxoplasma gondii* infection.Marmara Medical Journal 2008;21(1);089- 101.

Nestor C, Basto N, Parra B, Zea A, Pardo C, Bonelo A & Gómez E. detection of Toxoplasma DNA in the peripheral blood of HIV- Positive Patients with Neuroopportunistic Infections by a Real –Time PCR Assay. Journal of Neuroparasitology, 2011; 2:1-6.

Nimri L, Peloux H & Elkhatib L. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA and specific antibodies in high risk pregnant women. The American Society of Tropical Medicine and hygiene, 2004; 71 (6): 831-835.

Nishi M, Hu K, Murray J & Roos D. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. Journal of Cell Science, 2008; 121(9): 1559-1568.

Nowakowska D, Colon I, Remington J, Grigg S, Golab M, Wilczynski E, Sibley J, L D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide- based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. Journal of Clinical Microbioliology, 2006; 44(4): 1382-1389.

Ospina, S. Toxoplasmosis, en: Clinica y complicaciones de las parasitosis. Londoño M [ed]. Universidad de Antioquia;1993, 591-611.

Oyle J, Rajasekar B, Saeij J, et al. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii.* Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 10514–10519.

Painter H,Campbell T,Llinas M. The Apicomplexan AP2 family: integral factors regulating Plasmodium development. Mol Biochem Parasitol, 2011; 176: 1–7.

Pantoja A & Pérez L. Reseña histórica acerca de las investigaciones relacionadas con la toxoplasmosis. Revista cubana de medicina tropical, 2001; 53(2): 111-117.

Paquet C, Trois Q, Yudin M, Toronto O. Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment. J Obstet Gynaecol Can 2013;35(1):78–79.

Pardo A, Callizo J & Valldeperas X. Revisión de la prevención y tratamiento de la toxoplasmosis ocular. Annals d'Oftalmología, 2004; 12(1): 11-20.

Park Y& Nam H. Clinical Features and Treatment of Ocular Toxoplasmosis, 2013.

Petersen E. Toxoplasmosis. Seminars in Fetal Neonatal Medicine, 2007; 12 (3): 214-223.

Pfaff A, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M & Candolfi E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. Parasitology, 2007; 134(Supl.13): 1895- 1902.

Praga G. Toxoplasma y embarazo: Tamisaje Universal. Acta Médica Colombiana, 1998;23:271-274.

Priya J, Calderon MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting Toxoplasmic encephalitic in patients with AIDS. J Clin Microbiol 2002; 40:4499-4503.

Ponce N & Gómez J. Estandarización y validación clínica de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH. Infectio, 2003; 7(1): 8-14.

Pujol I, Amondarain I, Danes C & Valls M. Utilidad de la PCR en el diagnóstico de lesiones cerebrales focales en pacientes infectados por el VIH. Journal of Clinical Microbiology,1999; 17(1): 29-35.

Pusterla N, Madigan J & Leutenegger C. Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Molecular Diagnostic Tool for Equine Infectious Diseases. J Vet Intern Med, 2006;20:3–12 J Vet Intern Med 2006;20:3–12.

Reischl U,Bretagne S, Kruger D, Ernault P & Costa J. Comparision of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infectious Diseases, 2003; 3(7): 1-7.

Remesar G & Carreras I. Tratamiento de la toxoplasmosis durante el embarazo. Med Clin (Barc).2009; 133(19):763–765.

Rodríguez M, Rodríguez D, Ginorio D, Martínez R, Casanova P, Fraga J & Cox R. Primoinfección por *Toxoplasma gondii* durante el embarazo Revista Panamericana de Infectología, 2006;8(3): 43-46.

Roman S, Chosson M, Frank J, Wallon M, Krieffer F & Kaiser K. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with Toxoplasma gondii.Am J Obst Gynecol, 2004; 190:797-802.

Roos D, et al.Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid.Curr.Opin. Microbiol,1999; 2:426–432.

Rorman E, Stein Ch, Rilkis I & Ben-David H. Congenital toxoplasmosis- Prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. Reproductive Toxicology, 2006; 21(4): 458-472.

Rosso F, Agudelo A, Isaza A & Montoya J. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo.Colombia médica, 2007;38(3): 316- 337.

Sabin A, Feldman H.Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). Science, 1948; 108:660-663.

Sager H, Gloor M, Tenter A, Maley S, Hassig M, Gottstein B. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA.Parasitol. Res, 2003; 91(2):171-174.

Sandoval I, Juares E & Rojas E. Mecanismos de transmisión de algunos protozoos parásitos heterogénicos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología,2003; 23(2):175-182.

Savva D, Morris J, Johnson J, Holliman R. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. J Med Microbiol, 1990; 32:25-31.

Schulthess J,Fourreau D,Darche S,Meresse B,Kasper L,Cerf-Bensussan N, & Buzoni-Gatel, D.Mucosal immunity in Toxoplasma gondii infection.Parasite; 2008:15(3),389-395.

Sibley L & Boothroyd J. Virulent strains of Toxoplasma gondii comprise a single clonal lineage.Nature, 1992; 359: 82–85.

Sibley L. How apicomplexan parasites move in and out of cells.Curr.Opin.Biotechnol, 2010; 21:592–598.

Simon A, Labatette P, Ordinaire I, Frealle E, Dei-Cas E, Camus D & Delhaes L. Use of fluorecense resonance energy transfer hybridization probes to evaluated quantitative real-time PCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis.J Clin Microbiol, 2004; 42: 3681- 3685.

Smith J & Cunningham E.Atypical presentations of ocular toxoplasmosis.Current Opinions in Ophthalmology, 2002:13(6), 387-392.

Spalding SM, Amendoeira M, Klein CH, Ribeiro L.Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop.2005;38:173-7.

Spencer H, Allain D, Sulzer A, Collins W. Evaluation of the micro enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to *Trypanosoma cruzi.* Am. J. Trop. Med. Hyg, 1980; 29(2):179-82.

Sroka, S., Bartelheimer, N., Winter, A., Heukelbach, J., Ariza, L., Ribeiro, Liesenfeld, O. Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg, 2010: 83(3), 528-533.

Su C, Howe D, Dubey J, Ajioka J, Sibley L & David L. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. PNAS, 2002;99(16):10753-10758.

Sudan V, Jaiswal A and Shanker D. Review Recent trends in the diagnosis of toxoplasmosis. Clinical Reviews and Opinions,2013; 5(2), pp. 11-17.

Suzuki Y, Remington JS.Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. Res Immunol, 1993;144:66–67.

Switaj K, Master A, Skrzypczak M & Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 170- 176.

Tenter A, Heckeroth A, Weiss L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol, 2000; 30, 1217–1258.

Uribarren T.Toxoplasmosis.Universidad Nacional de México,2007;1-7.http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiología/parasitología/protozoos/toxo plasmosis.php.

Vinueza C. PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular. Revista electronica de Veterinaria, 2009; 10(2):1-13.

Wahab T, Edvinsson B, Palm D, Lindh J. Comparison of the AF147527 and B1 repeated elements, two real time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol, 2010;48:591-592.

Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissoud C, peyron F, Garcia P, Kieffer F et al. Accuracy of real time polymerase chain reaction for Toxoplasma gondii in amniotic fluid. Obstetgynecol,2010;115:727-733.

Waree, P. Toxoplasmosis: Pathogenesis and immune response. Thammasat Medical Journal, 2008;Vol. 8(No. 4), 487 - 496.

Yamamoto M, Standley D, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, et al. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. J Exp Med, 2009; 206: 2747–2760.

Yap G, Sher A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-γ- and tumor necrosis factor (TNF)-a- dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. J Exp Med, 1999; 189:1083–1092.

Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I. Transcription factor AP2-Sp and its target genes in malarial sporozoites. Mol Microbiol, 2010; 75: 854–863.

ANEXOS

Anexo 1. Autorización y vinculación de las gestantes al estudio.

“PAPEL DE LOS SUBTIPOS DE IgG CONTRA ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Toxoplasma gondii* COMO MARCADORES DIAGNÓSTICOS EN LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA: ESTUDIO MULTICÉNTRICO”

Investigador responsable: Pedro Blanco Tuirán.

Estimada señora:

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por un parásito, que infecta a una variedad de animales y al hombre, puede ser transmitida a las personas por el consumo de agua, vegetales y carnes contaminadas con el parásito expulsado en las heces de gatos infectados. En caso de adquirir la infección durante el embarazo, el parásito puede ser transmitido al feto y ocasionar abortos y problemas de aprendizaje, problemas visuales, retardo en el crecimiento, e hidrocefalia en el niño. Queremos invitarla a participar en este estudio, dado que la Universidad de Sucre está interesada en buscar métodos para prevenir y mejorar el diagnóstico de esta enfermedad. Para su participación, necesitamos su autorización.

A continuación le contamos de qué se trata el estudio y la forma en que usted podría participar. En caso de tener alguna duda, por favor pregúntenos para aclararle.

1. En qué consiste el estudio: Queremos prevenir la ocurrencia de la infección por este parasito y mejorar las pruebas empleadas en el diagnóstico de esta enfermedad a través de un monitoreo o control trimestral realizado a partir de una muestra de sangre a la cual se realizará varias pruebas para detectar casos de infección.

2. Cómo sería su participación en el estudio: Si usted lo autoriza, se le tomará una muestra de sangre cada tres meses para el respectivo control prenatal. En caso de haber ocurrido infección durante el embarazo se le realizará un control a su bebé a partir de muestras de sangre tomadas durante los tres primeros meses de vida y luego a los seis, nueve y doce meses de vida.

3. Riesgos de su participación en el estudio: No hay riesgo para usted, ni para su bebé, si decide participar en el estudio.

4. Beneficios de su participación en el estudio: Los resultados obtenidos lo beneficiarán a usted y a su bebé porque con el control realizado mediante la aplicación de pruebas de diagnóstico, ofrecidas en este estudio de carácter gratuito, podremos detectar oportunamente casos de infección para disminuir los daños causados en el niño mediante un tratamiento clínico adecuado, así como promover programas de prevención y control de la enfermedad.

5. Derechos de los participantes: Su participación en este estudio es voluntaria y gratuita. Si usted decide rechazar esta invitación a participar o retirarse voluntariamente del estudio en cualquier momento, puede hacerlo.

Si usted ahora o en cualquier momento tiene cualquier pregunta, relacionada con esta investigación puede dirigirse al investigador principal Pedro Blanco Tuirán, Universidad de Sucre, Tel. Cel.: 3008033174.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO: Si usted autoriza su participación y la de su bebé en este estudio, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.

Yo, _____ (Nombre completo de la gestante) declaro que se me han leído y explicado detalladamente los objetivos, los procedimientos y todos los aspectos relacionados con este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.

Acepto voluntariamente mi participación en el estudio y sé que estoy en libertad de retirarme cuando lo desee.

Nombre, firma y documento de identidad de la gestante.

Nombre: _____

Firma: _____

Cédula de Ciudadanía N°._____ De: _____

Fecha: Día (____) Mes (_____) Año (_____)

Nombre, firma y documento de identidad del investigador.

Nombre: _____

Firma: _____

Cédula de Ciudadanía N°._____ De: _____

Fecha: Día (____) Mes (_____) Año (_____)

Nombre, firma y documento del testigo 1.

Nombre: _____

Firma: _____

Cédula de Ciudadanía N°._____ De: _____

Fecha: Día (____) Mes (_____) Año (_____)

Nombre, firma y documento del testigo 2.

Nombre: _____

Firma: _____

Cédula de Ciudadanía N°._____ De: _____

Fecha: Día (____) Mes (_____) Año (_____)

Anexo 2. Formato de colección de información tipo encuesta para la determinación de los factores de riesgo asociados a la toxoplasmosis en embarazadas del municipio de Sincelejo.

“EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA PCR EN TIEMPO REAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN GESTANTES DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE”.

Encuesta N°: _____Fecha: _____/_____/_____

1. Datos personales:

Nombre:_____

CC.:_____ Edad: _____ Teléfono: _____

Dirección de residencia: _____ Barrio: _____

Entidad de salud: _____

Centro de atención (IPS): _____

2. Antecedentes Gineco-obstetricos:

N° de partos: _____N° de abortos: _____Edad gestacional actual: ____(semanas)

3. Vivienda actual:

Material de la vivienda: Madera: ___ Bahareque: ___ Ladrillo-cemento: ___ Plástico: ___ Cartón: ___ Otro: ___ ¿Cuál?: _____

Piso de la vivienda: Ceramica: ___ Cemento: ___ Tierra: ___

4. Contacto con gatos:

Tiene gatos en la casa: Si: ___ No: ___ Cuantos gatos tiene: _____

Hace cuánto tiempo: _____ Tenia gatos: ___

Tiene contacto con el gato/los gatos: Si: ___ No: ___

5. Otros animales domésticos tiene en su vivienda: _____

_____

6. Hábitos alimenticios:

Que carne consume con mayor frecuencia: Res: ___ Cerdo: ___ Pollo: ___ Pescado: ___ otra: ___ ¿Cuál?: _____

Consume la carne: Bien cocida: ___ A medio cocer: ___ Cruda: ___

Consume el agua: Directamente del grifo: ___ Hervida: ___ Filtrada: ___ En bolsa: ___ De pozo: ___

7. Otros:

Manipula suelo: Si: ___ No: ___

Manipula carne cruda: Si: ___ No: ___

Anexo 3. Formulas empleadas para el cálculo de eficiencia diagnostica, sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos e índice de concordancia Kappa de Cohen.

TÉCNICA A EVALUAR	*PRUEBA DE REFERENCIA*		TOTAL
	Positivos	Negativos	
Positivos	VP	FP	Total positivos
Negativos	FN	VN	Total negativos
Total	Total de enfermos	Total de no enfermos	**Total muestras analizadas**

Dónde:

VP: Verdaderos positivos
VN: Verdaderos negativos
FP: Falsos positivos
FN: Falsos negativos

- Eficiencia diagnostica:

$$ED = \frac{VP + VN}{Total\ muestras} * 100$$

- Sensibilidad:

$$S=\frac{VP}{Total\ de\ enfermos}=\frac{VP}{VP+FN}*100$$

- Especificidad:

$$E=\frac{VN}{Total\ de\ no\ enfermos}=\frac{VN}{VN+FP}*100$$

- Valor predictivo positivo:

$$VP\ pos=\frac{VP}{Total\ de\ positivos}=\frac{VP}{VP+FP}*100$$

- Valor predictivo negativo:

$$VP\ neg=\frac{VN}{Total\ de\ negativos}=\frac{VN}{VN+FN}*100$$

Anexo 4. Relación entre factores de riesgo y positividad para toxoplasmosis por la técnica de Elisa IgG en la población de estudio**.**

Factores de riesgo	N° de Casos	N° de Casos Positivos	N° de Casos Negativos	Prevalencia %	IC 95%	x^2 (p-value)
Contacto con gatos	41	29	12	70,73	54,2- 83,3	0.52 (0.47)
No contacto con gatos	179	116	63	64,80	57,2-71,6	0.53 (0.46)
Consumo de agua de grifo	122	80	42	65,57	56,3-73,7	0.01 (0.90)
Consumo de agua hervida	52	36	16	69,23	54,7-80,8	0.33 (0.56)
Consumo de agua filtrada	10	5	5	50	23,6-76,3	1.18 (0.27)
Consumo de agua de bolsa	25	16	9	64	42,6-81,2	0.05 (0.83)
Consumo de agua pozo	11	8	3	72,72	39,3-92,6	0.24 (0.62)
Consumo de carne de pescado	17	11	6	64,70	38,6-84,7	0.01 (0.91)
Consumo de carne de res	53	38	15	71,69	57,4-82,8	1.04 (0.30)
Consumo de carne de pollo	24	13	11	54,16	33,2-73,8	1.65 (0.19)
Consumo de carne de cerdo	4	4	0	100	39,5-100	2.11

						(0.14)
Consumo de carne de aves, res, pescado y cerdo	107	71	36	66,35	56,4-75,0	0.02 (0.89)
Presencia de aves, perros y otros animales	59	38	21	64,40	50,8-76,1	0.08 (0.77)
Presencia de animales: perros	50	33	17	66	51,1-78,4	2.4E-04 (0.98)
Presencia de animales: aves	31	22	9	70,96	51,7-85,1	0.41 (0.52)
No presencia de otros animales	80	52	28	65	53,4.75,1	0.05 (0.82)
Material de la vivienda: ladrillo-cemento	154	101	53	65,58	57,4-72,9	0.01 (0.93)
Material de la vivienda:artesanal	66	44	22	66,66	53,8-77,4	0.02 (0.87)
Material del piso : cerámica	28	15	13	53,57	34,2-71,9	2.17 (0.14)
Material del piso: cemento	112	74	38	66,07	56,4-74,5	2.7E-03 (0.95)
Material del piso: tierra	80	56	24	70	58,5-79,4	0.94 (0.33)

Anexo 5. Relación de las variables edad y período de gestación con resultados positivos por la técnica de Elisa IgG anti*Toxoplasma* en la población de estudio.

Variable	N° de Casos	N° de Casos Positivos	N° de Casos Negativos	Prevalencia %	IC 95%	x^2 (p-value)
Edad de las gestantes: 14-22	116	75	41	64,65	55,1-73,1	0.17 (0.67)
Edad de las gestantes: 23-31	83	57	26	63,85	52,5-73,9	0.45 (0.50)
Edad de las gestantes: 32-40	21	13	8	61,9	38,6-81,0	0.17 (0.68)
Edad gestacional: 1trimestre	56	42	14	75	61,3-85,1	2.76 (0.09)
Edad gestacional: 2trimestre	79	48	31	60,75	49,1-71,3	1.25 (0.22)
Edad gestacional: 3trimestre	85	55	30	64,70	53,5-74,5	0.09 (0.76)

Anexo 6. Relación entre factores de riesgo y positividad para toxoplasmosis por la técnica de PCR en tiempo real en la población de estudio.

Factores de riesgo	N° de Casos	Casos Positivos	Casos Negativos	Prevalencia %	IC 95%	x^2 (p-value)
Contacto con gatos	41	2	39	4,87	0,84 -17,80	1.67 (0.19)
No contacto con gatos	179	21	158	11,73	7,57-17,58	1.96 (0.16)
Consumo de agua de grifo	122	14	108	11,47	6,64-18,8	0.30 (0.58)
Consumo de agua hervida	52	6	46	11,53	4,77-2,41	0.09 (0.77)
Consumo de agua filtrada	10	0	10	0	0-34,4	1.18 (0.27)
Consumo de agua de bolsa	25	2	23	8	1,39- 2,75	0.18 (0.67)
Consumo de agua pozo	11	1	10	9	0,4- 42,8	0.02 (0.87)
Consumo de carne de pescado	17	1	16	5,88	0,30- 30,76	0.41 (0.52)
Consumo de carne de res	53	3	50	5,66	1,47-16,62	1.71 (0.19)
Consumo de carne de pollo	24	2	22	8,33	1,45- 28,47	0.13 (0.71)
Consumo de carne de cerdo	4	0	4	0	6,31-15,47	0.48 (0.49)
Consumo de carne de aves, res, pescado y	107	15	92	14,01	8,31-22,383	2.83 (0.09)

cerdo						
Presencia de aves, perros y otros animales	59	5	54	8,47	3,16- 19,41	0.34 (0.56)
Presencia de animales: perros	50	4	46	8	2,59 -20,11	0.42 (0.51)
Presencia de animales: aves	31	4	27	10,05	6,31- 15,47	0.23 (0.63)
No presencia de otros animales	80	10	70	12,5	6,48- 22,23	0.56 (0.45)
Material de la vivienda: ladrillo-cemento	154	17	137	8,33	3,10-19,11	0.57 (0.45)
Material de la vivienda:artes anal	66	6	60	9,09	3,74-19,38	0.19 (0.66)
Material del piso de la vivienda: cerámica	28	4	24	14,28	4,67- 33,56	0.50 (0.47)
Material del piso de la vivienda: cemento	112	12	100	10,71	5,90- 18,32	0.02 (0.89)
Material del piso de la vivienda: tierra	80	7	73	8,75	3,88-17,74	0.39 (0.53)

Anexo 7. Relación de las variables edad y período de gestación con resultados positivos por la técnica de PCR en tiempo real en la población de estudio.

Variable	N° de Casos	Casos Positivos	Casos Negativos	Prevalencia %	IC 95%	x^2 (p-value)
Edad de las gestantes: 14-21	116	14	102	12,06	6,9-19,7	0.68 (0.40)
Edad de las gestantes: 22-31	83	9	74	10,84	5,38-20,0	0.02 (0.88)
Edad de las gestantes: 32-40	21	0	21	0	0-19,2	2.71 (0.09)
Edad gestacional: 1trimestre	56	5	51	8,92	3,3-20,3	0.19 (0.66)
Edad gestacional: 2trimestre	79	8	71	10,12	4,78-19,4	0.01 (0.90)
Edad gestacional: 3trimestre	85	10	75	9,62	5,43-16,2	0.25 0. 61)