

**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Departamento de Parasitología**

**Aplicación de herramientas moleculares para la detección y
caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en muestras de
pacientes con sida**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en
Ciencias de la Salud**

Autora: Yenisey Alfonso Fernández Mr.C.

La Habana, 2012

**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Departamento de Parasitología**

**Aplicación de herramientas moleculares para la detección y
caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en muestras de
pacientes con sida**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en
Ciencias de la Salud**

Autora: Yenisey Alfonso Fernández Mr.C.

Tutor: Alberto Juan Dorta Contreras Dr.C.

Asesor: Jorge Fraga Nodarse Mr.C.

La Habana, 2012

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más profundo a todos mis profesores de pregrado y posgrado, a quienes debo en gran medida mi formación profesional.

A mi tutor, por las enseñanzas transmitidas, por su disposición para ayudarme y por ser un ejemplo de investigador incansable.

A mi asesor, quien siempre tendrá un lugar especial en mi vida profesional pues ha estado vinculado a mi superación desde mis estudios de pregrado y ha sido participe de todo cuanto he logrado. Tuve la enorme dicha de contar con su tutoría en mi tesis de Diploma y Máster en Parasitología. De igual forma, hoy aspiro a este grado científico gracias a su experiencia y sabiduría.

A la profesora Dominique Soldati-Favre quien gentilmente donó la mayoría de las cepas para realizar esta investigación y contribuyó significativamente a mi desarrollo profesional.

A la Dra. Lianet, quien aún sin estar directamente vinculada con este trabajo, ha sido un importante motor impulsor para su culminación y ha brindado su ayuda incondicional en todo momento.

A los médicos, enfermeras, investigadores y técnicos que cooperaron en la obtención de muestras clínicas, especialmente al Dr. Narciso, siempre dispuesto a ayudar y la Dra Zhaily quien trabajó en la obtención de un grupo considerable de muestras de sangre y orina.

A Yainay, por la ayuda brindada en la obtención del ADN para muestras de orina.

A todos los investigadores que gentilmente revisaron el documento, especialmente al Dr. Fonte y la Dra. Hilda, por la meticulosa revisión realizada, sus oportunas sugerencias y el tiempo invertido para ayudarme a mejorar la redacción.

A la Dra. Ana Margarita por asesorarme siempre que lo necesité, sobre todo en los temas formales.

A los compañeros de Microbiología, en especial a Yinet, Alex y Susel, quienes brindaron su asesoramiento y ayuda incondicional para lograr la culminación de este trabajo.

A mis amigos, Marley, Lianet y Ricardo, quienes han vivido a diario todas las alegrías y angustias de 7 años de trabajo. Su amistad y cariño han sido imprescindibles para llegar hasta aquí

Finalmente, mi agradecimiento más profundo a mi familia, en especial a mi mamá, mi abuela y mi inigualable esposo. Sin la ayuda, confianza y apoyo incondicional de ustedes no hubiera podido lograrlo.

DEDICATORIA

A mi pequeño Güilbi

SÍNTESIS

Con el objetivo de contribuir al diagnóstico y caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en pacientes con sida, se aplicaron herramientas moleculares para la detección e identificación de los genotipos de este parásito, directamente a partir de muestras clínicas. De esta forma, se optimizaron tres protocolos de PCR y PCR anidada para el gen B1 de *T. gondii*, se evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN para muestras de LCR, sangre y orina; y se identificaron los protocolos más eficientes para ser utilizados en cada uno de los fluidos evaluados. Un análisis integral de los protocolos evaluados y las muestras clínicas utilizadas, evidenció que la PCR (B22-B23) empleando muestras de LCR, es una estrategia simple, rápida, específica y suficientemente sensible para confirmar el diagnóstico de ET en pacientes con sida. La evaluación adicional de muestras de sangre y orina demostró que en términos de sensibilidad diagnóstica, la utilidad de muestras de sangre puede considerarse superior a muestras de orina. Sin embargo, la utilización de estas últimas resultó altamente específica en relación a las muestras de sangre. Finalmente, el empleo de la técnica de PCR-RFLP para los marcadores B1 y SAG2 permitió identificar por primera vez en Cuba la variabilidad genética de *T. gondii* a partir de muestras de sangre y LCR de pacientes con ET. Los resultados obtenidos arrojaron una alta prevalencia del genotipo I del parásito, siendo poco frecuente el hallazgo de cepas correspondientes a los genotipos II, III o combinaciones de estos.

ABREVIATURAS

A

A: Base nitrogenada Adenina

B

BLAST: Herramienta para búsqueda de alineamientos básicos locales

C

C: Base nitrogenada Citosina

CD4+: Células T CD4+

CD8+: Células T citotóxicas

CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio

E

EEM: Electroforesis de enzimas multilocus

ET: Encefalitis por *Toxoplasma*

G +

G: Base nitrogenada Guanina

I

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleuquina

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

IC: Intervalo de confianza

L

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LABCEL: Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo

N

NTx: Neurotoxoplasmosis

PCR anidada: Segunda reacción de amplificación de PCR

P

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

R

RAPD: Amplificación al azar de ADN

RFLP: Polimorfismo de los fragmentos de restricción

RMI: Resonancia magnética imageneológica

S

Sida: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC: Sistema nervioso central

STAT: Proteínas traductoras de señales y activadoras de la transcripción

T

T: Base nitrogenada Timina

TAC: Tomografía axial computarizada

TARGA: Terapia antirretroviral de gran actividad

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA

TE: Tampón Tris-EDTA

Th1: Células T cooperadoras tipo 1

Th2: Células T cooperadoras tipo 2

TNF: Factor de necrosis tumoral

V

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

INDICE

	Pag.
I.INTRODUCCIÓN	
I.1. Introducción	2
I.2. Hipótesis	5
I.3. Objetivos	6
I.3.1. Objetivo general	6
I.3.2. Objetivos específicos	6
I.4. Novedad científica	7
I.5. Valor Teórico	7
I.6. Valor Práctico	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
II.1. Breve historia del descubrimiento de <i>T. gondii</i>	9
II.2. Clasificación Taxonómica	9
II.3. Estadios de desarrollo	10
II.4. Ciclo de vida	13
II.5. Transmisión	14
II.6. Patogenia	15
II.7. Algunos elementos de la respuesta inmune a <i>T. gondii</i>	16
II.8. Enfermedad Clínica	18
II.8.1. Toxoplasmosis en el paciente inmunocompetente	18
II.8.2. Toxoplasmosis ocular	19
II.8.3. Toxoplasmosis congénita	19
II.8.4. Toxoplasmosis en el paciente inmunodeficiente	20
II.9. Epidemiología	23

II.10. Diagnóstico de neurotoxoplasmosis en pacientes con sida.	24
Utilidad de herramientas moleculares	
II.10.1. Diagnóstico de neurotoxoplasmosis en pacientes con sida	24
II.10.2. Utilización de herramientas moleculares para la detección de <i>T. gondii</i> . Algunas consideraciones importantes	27
II.11. Estructura poblacional de <i>T. gondii</i> , asociación de los genotipos con infecciones humanas y métodos para establecer el genotipaje	30
II.11.1. Estructura poblacional de <i>T. gondii</i> y asociación de los genotipos con infecciones humanas.	30
II.11.2. Métodos para establecer el genotipaje de <i>T. gondii</i>	32
II.12. Tratamiento.	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1. Tipo de estudio, universo y datos obtenidos de cada paciente	36
III.1.1. Tipo de estudio y universo	36
III.1.2. Datos obtenidos de las historias clínicas de los pacientes	36
III.1.3. Criterios de inclusión y exclusión	37
III.2. Cepas de referencia. Obtención del ADN genómico, verificación de su calidad, concentración y pureza	38
III.2.1. Obtención de los taquizoitos de <i>T. gondii</i>	38
III.2.2. Extracción y purificación del ADN genómico de las cepas de referencia de <i>T. gondii</i>	38
III.2.3. Determinación de la calidad del ADN purificado	39
III.2.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN purificado	39
III.3. Protocolos a evaluar y normalización de los componentes de la PCR y PCR anidada	40
III.3.1. Protocolos a evaluar	40
III.3.2. Normalización de los componentes de la PCR y PCR anidada	43

III.3.3. Reproducibilidad de los protocolos de PCR y PCR anidada	44
III.3.4. Sensibilidad analítica de cada protocolo	44
III.3.5. Especificidad analítica de cada protocolo	45
III.4. Evaluación de la eficacia de métodos convencionales y comerciales para la extracción de ADN de <i>T. gondii</i> a partir de muestras de LCR, sangre y orina	45
III.4.1. Eficacia de cada protocolo de extracción de ADN	45
III.4.2. Descripción de los métodos de extracción de ADN	46
III.5. Validez y Seguridad diagnóstica de los protocolos de PCR y PCR anidada a partir de muestras de LCR, sangre y orina.	48
III.5.1. Evaluación de los protocolos de PCR y PCR anidada en muestras de LCR, sangre y orina. Determinación de la validez y seguridad diagnóstica	48
III.5.1.1. Extracción del ADN a partir de las muestras de LCR, sangre y orina	48
III.5.1.2. Evaluación de los protocolos de PCR y PCR anidada	48
III.5.1.3. Validez y Seguridad diagnóstica de los protocolos de PCR y PCR anidada	49
III.6. Identificación de los genotipos de <i>T. gondii</i> en cepas de referencia y muestras clínicas, mediante la técnica de PCR- RFLP	50
III.6.1. Amplificación de los fragmentos específicos para los marcadores B1, SAG2 y CB21 utilizando protocolos de PCR y PCR anidada	50
III.6.2. Purificación de los fragmentos amplificados para los marcadores B1, SAG2 y CB21	52
III.6.3. Digestión de los fragmentos purificados.	52

III.7. Consideraciones éticas.	54
IV. RESULTADOS	
IV.1. Universo y clasificación de los pacientes.	56
IV.2. Normalización de los protocolos de PCR y PCR anidada para cada juego de cebadores	57
IV.3. Comparación de métodos de extracción de ADN para muestras de LCR, sangre y orina	61
IV.4. Validez y seguridad diagnóstica de la PCR y PCR anidada a partir de muestras de LCR, sangre y orina	63
IV.5. Aplicación de la técnica de PCR-RFLP para la identificación de los genotipos de <i>T. gondii</i> en cepas de referencia y muestras clínicas	67
V. DISCUSIÓN	
V.1. Normalización de los protocolos de PCR y PCR anidada. Elección de muestras, marcadores y cebadores	76
V.2. Comparación de métodos de extracción de ADN a partir de muestras de LCR, sangre y orina	80
V.3. Comparación de tres protocolos que amplifican regiones diferentes en el gen B1 de <i>T. gondii</i> . Validez y seguridad diagnóstica de la PCR y PCR anidada para muestras de LCR, sangre y orina	82
V.4. Aplicación de la PCR-RFLP para la identificación de los genotipos de <i>T. gondii</i> en cepas de referencia y muestras clínicas	87
VI. CONCLUSIONES	91
VII. RECOMENDACIONES	93
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
IX. AUTOBIBLIOGRAFÍA	
X. ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

La toxoplasmosis, causada por el protozoo parásito *Toxoplasma gondii*, es una de las infecciones más comunes en humanos (Tenter *et al.*, 2000). Aunque generalmente esta parasitosis se comporta de forma asintomática, la reactivación de una infección latente en individuos inmunocomprometidos puede conllevar a una encefalitis por *T. gondii* (ET) o neurotoxoplasmosis (NTx), (Montoya y Liesenfeld., 2004), que constituye un evento casi exclusivo de pacientes con sida. Aún después de la introducción de la Terapia Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA), la ET emerge como una de las principales infecciones oportunistas del Sistema Nervioso Central (SNC) en pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Nissapatorn *et al.*, 2004).

Aunque el diagnóstico definitivo de ET requiere la demostración de taquizoitos del parásito en biopsias de cerebro o necropsias, el tratamiento específico se inicia de forma usual ante el diagnóstico presuntivo, según hallazgos serológicos, clínicos y radiológicos. Sin embargo, ninguno de estos criterios es específico de una NTx. Desde el punto de vista clínico, los síntomas que se manifiestan pueden estar relacionados con los provocados por otros microorganismos. De igual forma, para otras enfermedades pueden obtenerse imágenes similares a las observadas en la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y los resultados serológicos tienen poco valor en pacientes inmunocomprometidos. Adicionalmente, una vez impuesto el tratamiento empírico, se requiere de siete a diez días para notar una mejoría clínica y establecer la confirmación del diagnóstico. De esta forma, la terapia anti-*Toxoplasma* empírica podría emplearse en forma excesiva, y el paciente pudiera exponerse de manera innecesaria a los efectos adversos de los fármacos que se emplean en el tratamiento, lo que llevaría a una demora para establecer la terapia específica de otras enfermedades (Porter *et al.*, 1992; Renold *et al.*, 1992; Raffi *et al.*, 1997). En países como Francia donde la seroprevalencia para el parásito en población adulta oscila

entre 60 y 80%, se demostró que la terapia empírica para *T. gondii* es innecesaria en al menos 40% de los casos que presentan clínica e imagen radiológica compatible con la enfermedad (Raffi *et al.*, 1997).

La introducción de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) en el diagnóstico molecular de la toxoplasmosis, conllevó a una mejoría significativa para establecer la confirmación diagnóstica de un grupo importante de casos. Sin embargo, no existe un consenso de la estrategia o metodología óptima a seguir para la detección del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de *T. gondii*. Indistintamente se emplean muestras de Líquido Cefalorraquídeo (LCR), sangre y orina, que son evaluadas para la detección de fragmentos correspondientes a más de diez marcadores moleculares, para los cuales están diseñados varios juegos de cebadores (Burg *et al.*, 1988; Cazenave *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 1997; Feng y Milhausen, 1999; Homan *et al.*, 2000). Entre los marcadores que se utilizan, el gen B1 se destaca por su alta conservación, repetibilidad y la frecuencia de evaluación con otros marcadores en términos de sensibilidad diagnóstica (Hierl *et al.*, 2004; Calderaro *et al.*, 2006; Cassaing *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2010a; Okay *et al.*, 2009; Wahab *et al.*, 2010). Adicionalmente, los métodos de extracción de ácidos nucleicos, elemento que tiene gran influencia en los resultados de la prueba, difieren entre los laboratorios. La unión de estos elementos y los escasos estudios comparativos que han sido publicados, ha hecho imposible definir la sensibilidad exacta de la prueba (Bastien *et al.*, 2002).

Por otro lado, no solo es importante identificar la presencia del parásito a partir de muestras biológicas sino también, determinar los genotipos causantes de la enfermedad, que puedan facilitar estudios de relación genotipo-sintomatología y permitan establecer un posible pronóstico de la enfermedad. De esta forma, a los métodos moleculares que detectan el ADN del parásito, se suman otras herramientas que estudian su variabilidad genética. Entre estas se encuentran el análisis de isoenzimas (Darde *et al.*, 1992), el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) (Dubey *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2011; Herrmann *et al.*, 2011; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011), el análisis de microsatélites (Ajzenberg *et al.*, 2002a; Dumetre *et al.*, 2006; Ajzenberg *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011;

Demar *et al.*, 2011; Pomares *et al.*, 2011), la amplificación al azar de ADN (RAPD, siglas en inglés) (Guo *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2004), entre otras. Por su fácil ejecución y accesibilidad, la técnica de PCR-RFLP constituye una herramienta ideal para la caracterización genética de *T. gondii* y múltiples marcadores moleculares se emplean para analizar aislamientos o muestras clínicas (Zakimi *et al.*, 2006). Entre estos se destacan por su amplia utilización los marcadores SAG 2, B-tubulina, GRA6, B1, SAG3, CB21, entre otros (Ferreira *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2010 a,b; Dubey *et al.*, 2011; Frazão-Teixeira *et al.*, 2011).

El empleo de estas herramientas de caracterización define que la inmensa mayoría de los aislamientos caracterizados hasta el momento pertenece a uno de los tres linajes clonales conocidos como I, II y III (Howe y Sibley, 1995; Ajzenberg *et al.*, 2002 a,b) lo que confiere a este parásito una estructura poblacional clonal. Sin embargo, estos últimos fueron en su mayoría aislados de humanos y animales provenientes de Europa y América del Norte. Una extensión de los estudios epidemiológicos a lo largo de un amplio rango geográfico y teniendo en cuenta datos obtenidos de diferentes hospederos, revela un mayor nivel de variación y recombinación entre algunas poblaciones del parásito (Ajzenberg *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006; Belfort-Neto *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2010a; Dubey *et al.*, 2011; Frazão-Teixeira *et al.*, 2011). De esta forma, cepas mixtas y genotipos atípicos se identifican, principalmente en América del Sur (Khan *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007b; Frazão-Teixeira *et al.*, 2011).

En nuestro país, se desconocen los genotipos de *T. gondii* circulantes en cualquiera de los grupos de riesgo de la enfermedad, por ello una investigación al respecto aportaría datos sobre el comportamiento epidemiológico de *T. gondii* y permitiría posteriormente realizar estudios genotipo-sintomatología con la evaluación de un posible pronóstico de la enfermedad desde sus etapas iniciales. La unión de todos los elementos expuestos, evidencia la necesidad de evaluar métodos rápidos y confiables, que permitan introducir nuevas herramientas para establecer el diagnóstico, caracterización genética de este parásito y futuros estudios genotipo-sintomatología, aplicados a partir de fluidos biológicos que puedan obtenerse de forma menos invasiva que la realización de una biopsia cerebral.

I.2. Hipótesis

Tomando como diana el gen B1 de *T. gondii* es posible lograr un protocolo eficiente que permita la detección del genoma del parásito en diversas muestras clínicas y realizar una caracterización molecular del mismo”.

I.3. Objetivos

I.3.1. Objetivo general

- 1- Aplicar herramientas moleculares para la detección y caracterización genética de *T. gondii* en pacientes con sida.

I.3.2. Objetivos específicos

- 1- Establecer las condiciones óptimas de tres protocolos que amplifican regiones específicas en el gen B1 de *T. gondii* y determinar su sensibilidad y especificidad analítica.
- 2- Determinar la eficacia en la extracción del ADN de *T. gondii* de métodos convencionales en relación a sistemas comerciales empleando muestras de LCR, sangre y orina.
- 3- Determinar la validez y seguridad diagnóstica de tres protocolos que amplifican regiones específicas en el gen B1 de *T. gondii*, para establecer el diagnóstico de NTx utilizando muestras de LCR de pacientes con sida.
- 4- Determinar la utilidad de muestras de sangre y orina para establecer el diagnóstico de NTx en pacientes con sida, según el protocolo con mayor sensibilidad diagnóstica en muestras de LCR.
- 5- Identificar los genotipos de *T. gondii* causantes de NTx en pacientes con sida utilizando los marcadores B1 y SAG 2 y CB21.

I.4. Novedad científica

El empleo de sistemas simulados a partir de muestras de LCR, sangre y orina, permitió determinar la eficiencia en la extracción de ADN por métodos convencionales y comerciales, no existiendo antecedentes en el contexto de la ET para muestras de LCR y orina.

Se comparó por primera vez en Cuba, la utilidad diagnóstica de muestras de LCR, sangre, y orina para establecer el diagnóstico de NTx en pacientes con sida. A su vez, se evaluó por primera vez la eficacia diagnóstica de tres protocolos que utilizan cebadores para amplificar regiones diferentes dentro del gen B1 de *T. gondii*, donde se incluyen algunos para los que no existía ninguna evaluación diagnóstica previa.

Se identificaron por primera vez en Cuba los genotipos de *T. gondii* causantes de NTx en pacientes con sida, lo cual aportó resultados a la comunidad nacional e internacional y contribuyó a los escasos estudios reportados en la literatura para la identificación genética de *T. gondii* en pacientes con sida. La incorporación de estos resultados a estudios posteriores donde se evalúe un número mayor de pacientes, permitirá estudiar una posible relación genotipo-sintomatología.

I.5. Valor teórico

La metodología utilizada constituye una referencia para estudios posteriores cuyo fin sea la introducción de herramientas moleculares con fines diagnósticos. A su vez, los métodos propuestos pueden constituir herramientas para el diseño de estrategias de trabajo en la evaluación diagnóstica de muestras clínicas y caracterización genética de otros parásitos.

I.6. Valor práctico

La utilización de herramientas moleculares posibilita confirmar de forma rápida el diagnóstico de NTx en pacientes con sida, permitiendo instaurar de forma segura la mejor opción terapéutica, lo cual contribuye a una mejor calidad de vida.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Breve historia del descubrimiento de *T. gondii*

T. gondii se descubrió y nombró por Nicolle y Manceaux en 1908, cuando aislaron del hígado y el bazo de un roedor salvaje africano (*Ctenodactylus gundi*), un parásito intracelular (Nicolle y Manceaux, 1908). Al inicio se confundió con *Leishmania*, pero un año más tarde le denominaron *T. gondii* por su forma arqueada (del griego taxón: arcos) y por el nombre vulgar del roedor en que se halló, el gundi (Nicolle y Manceaux, 1909). De esta fecha a la actualidad, numerosas son las investigaciones que se publican en nuestro país y en el resto del mundo, para profundizar en el estudio de la toxoplasmosis y de su agente causal.

II. 2. Clasificación Taxonómica

T. gondii forma parte del Reino Protista, Sub-reino Protozoo, Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoasida, Sub-clase Coccidia, Orden Eucoccidiorida, sub-orden Eimeria, familia Sarcocystidae, género *Toxoplasma*, especie *gondii* (Atias, 1994). Es un parásito intracelular obligado, móvil, gram negativo, sin hospedero específico (eurixeno). Tiene forma arqueada, semilunar y carece de flagelos, pese a lo cual tiene autonomía de movimientos de rotación helicoidales, en los que participa toda la célula gracias a las fibrillas dispuestas sobre su superficie (Figura 1). Su tamaño varía según el órgano de donde procedan, entre 2-12 x 1.5-4 μm (Figura 2) (Flores, 1991; Dubey *et al.*, 1998).

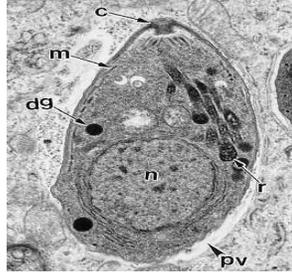


Figura 1 Taquizoito de *T. gondii*. Microscopía electrónica de un taquizoito intracelular. PV: Vacuola parasitófora alrededor del taquizoito; Organos del taquizoito visibles en la foto: conoide (c), micronemas (m), gránulos densos (dg), núcleo (n) y roptrias. Tomado de: Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *T. gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2):267-99.

I.3. Estadios de desarrollo

T. gondii se encuentra en tres formas diferentes:

Taquizoítos: Son la forma activa de replicación, responsable de la diseminación de la infección y de la destrucción tisular (Figura 2). Como parásitos intracelulares obligados, no permanecen mucho tiempo fuera de la célula y se multiplican en su interior a través de un proceso llamado endodiogenia (Goldman *et al.*, 1958). Residen en vacuolas y al dividirse pueden provocar la lisis celular con la consecuente liberación de los taquizoítos, o dar lugar a quistes tisulares (Dubey *et al.*, 1998).

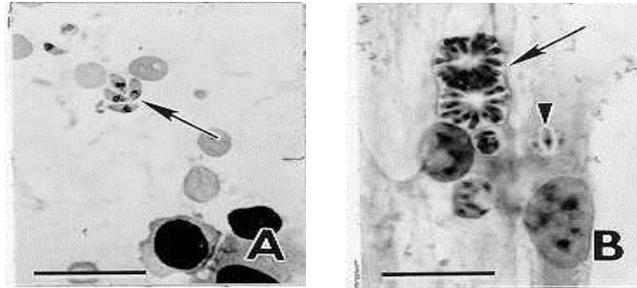


Figura 2. Taquizoítos de *T. gondii*. (A) Extracelular. Tinción con Giemsa. (B) Intracelular en cultivos celulares. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal específico contra taquizoítos. Bar= 20 μ m. Tomado de: Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *T. gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2):267-99.

Bradizoítos y quistes tisulares: El término bradizoito describe el estado del parásito enquistado en los tejidos y desde el punto de vista morfológico son semejantes a los taquizoítos, pero con una reproducción más lenta (Figura 3) (Dubey *et al.*, 1998). Pueden además reconvertirse a taquizoítos (Skariah *et al.*, 2010). Los quistes, son formas de resistencia, pueden llegar a alcanzar un tamaño entre 10 a 200 μ m y se encuentran en cualquier tejido u órgano, fundamentalmente en SNC y tejido muscular (corazón y músculo estriado esquelético), donde persisten en forma latente toda la vida (Dubey y Beattie, 1988).

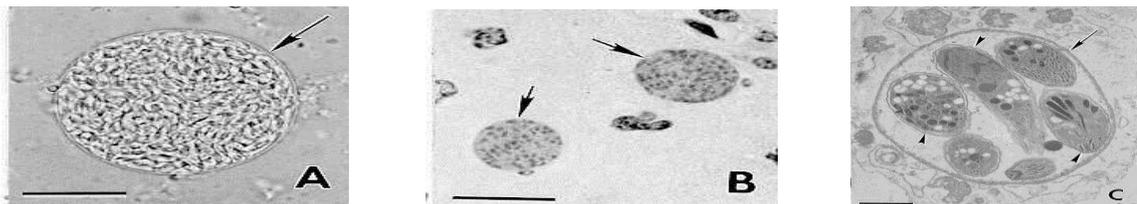


Figura 3. Quistes de *T. gondii*. (A) Quiste tisular en cerebro de ratón. No teñido. Nota: Dentro hay cientos de bradizoítos. Bar= 20 μ m (B) Dos quistes tisulares en corte de cerebro. Tinción con hematoxilina y eosina. Bar= 20 μ m. (C) Microfotografía electrónica de un quiste tisular pequeño que engloba 6 bradizoítos. Bar= 1 μ m. Tomado de: Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *T. gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2):267-99.

Ooquistes: Son ovoides, miden de 10 a 12 μm y son eliminados (hasta 10 millones en un solo día) por un período de una a tres semanas con las heces de los felinos que padecen la infección aguda. En el momento en que se eliminan son inmaduros, no esporulados (Figura 4 A) y en condiciones favorables (medio ambiente) alcanzan su estado infeccioso al día siguiente o durante los cinco días posteriores. Cada ooquiste esporulado, contiene dos esporoquistes y cuatro esporozoitos (Figura 4B). Una vez que se encuentran en esta forma y si las condiciones son favorables, pueden permanecer viables en el suelo durante un año o más. (Dubey y Beattie, 1988; Dubey *et al.*, 1998; Pereira, 2002). Esta forma del parásito puede infectar a todos los vertebrados de sangre caliente y está relacionada con diferentes brotes epidemiológicos en humanos (Burnett *et al.*, 1998; Palanisamy *et al.*, 2006; de Moura *et al.*, 2006; Balasundaram *et al.*, 2010).

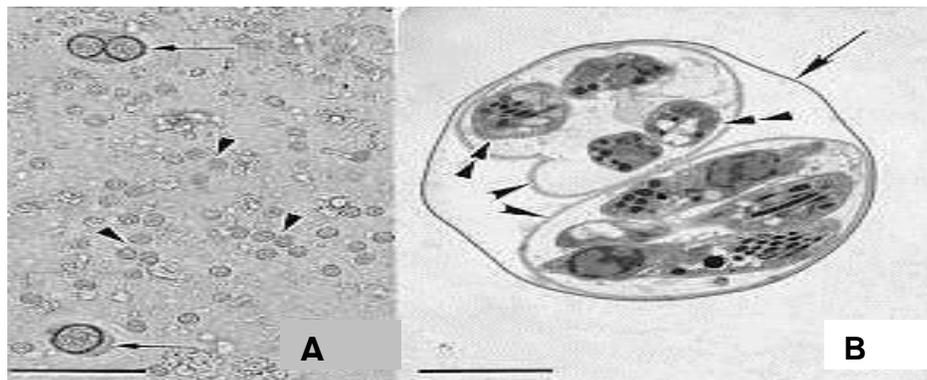


Figura 4. Ooquistes de *T. gondii*. (A) Ooquiste no esporulado en heces de gato (punta de flecha). Bar = 65 μm . (B) Ooquiste esporulado. Microscopía electrónica. 2 esporoquistes (punta de flecha) y 4 esporozoitos (doble punta de flecha). Bar = 2,25 μm . Tomado de: Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *T. gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2):267-99.

II.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* se describió en 1970 cuando se descubrió que los hospederos definitivos del parásito eran los miembros de la familia Felidae, incluido el gato doméstico (Frenkel *et al.*, 1970; Dubey y Beattie, 1988). *T. gondii* tiene un ciclo de vida en el hospedero definitivo conocido como esporogónico o enteroepitelial (fase sexual). En hospederos intermediarios, el parásito hace un ciclo incompleto denominado esquizogónico (fase asexual), donde realiza invasiones extraintestinales a músculos y al SNC, ciclo que puede ocurrir, además, en el hospedero definitivo (Dubey y Beattie, 1988). Este último, adquiere la infección a través de la ingestión de cualquiera de los tres estados infecciosos del parásito: taquizoítos, bradizoítos que forman parte de los quistes tisulares y ooquistes que se encuentra en las heces. Los cambios en la infección y el período pre-patente (el tiempo entre infección y la eliminación de ooquistes) varían en dependencia del estado de *T. gondii* ingerido. Menos del 50 % de los gatos elimina ooquistes después de ingerir taquizoítos u ooquistes. Sin embargo, todos eliminan ooquistes después de ingerir quistes tisulares (Dubey y Beattie, 1988; Dubey, 1995; Dubey, 2001; Hill y Dubey, 2002).

Cuando el hospedero definitivo ingiere carnes que contienen quistes tisulares, los mismos se disuelven por la acción de las enzimas proteolíticas del estómago y el intestino delgado, con la consecuente liberación de los bradizoítos. Estos penetran en las células epiteliales del intestino delgado, e inician la formación de numerosas generaciones asexuales por esquizogonias sucesivas. Posteriormente, ocurre la formación de macro y microgametocitos que pasan a gametos. Después de la fecundación, aparecen los ooquistes, los cuales se excretan en las heces en un estado no-esporulado y no son infectantes (Rojas *et al.*, 1989; Dubey *et al.*, 1998). El gato elimina los ooquistes con las heces sólo por un período breve de tres a quince días y al adquirir inmunidad cesa la producción de ooquistes, que puede reanudarse si se quiebra la resistencia que ha adquirido. En hospederos intermediarios no-felinos, como humanos o ratones, el ciclo extraintestinal es similar al del gato. Sin embargo, los estadios sexuales se generan solo en el hospedero definitivo (Dubey *et al.*, 1998).

Al mismo tiempo en que algunos bradizoítos entran a las células epiteliales del intestino delgado y se multiplican para producir ooquistes, otros penetran la lámina propia y comienza su multiplicación a taquizoítos. Después de algunas horas posteriores a la infección, los taquizoítos se habrán diseminado a través de la linfa y la sangre a tejidos extraintestinales. En este momento, pueden penetrar cualquier tipo de célula, multiplicarse en su interior, ocasionar su muerte y ser liberados con capacidad para infectar a otras células. El hospedero, usualmente supera esta fase de la infección y el parásito entra en una etapa de “descanso” donde se forman los quistes tisulares llenos de bradizoítos (Dubey *et al.*, 1998).

La formación de quistes tisulares contribuye al éxito de *T. gondii* como parásito a través de cuatro formas diferentes: 1) resisten la ingestión y paso a través del estómago para invadir el intestino delgado, 2) son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedero y los fármacos empleados, 3) la forma semidormida de los parásitos contenidos dentro de los quistes le permite a *T. gondii* prevenir la muerte de su hospedero, y con ello, persistir de forma presumiblemente benigna, 4) los bradizoítos contenidos en los quistes mantienen su infectividad y pueden de esta forma transmitirse una vez que el hospedero es consumido por otro predador (Dubey *et al.*, 2002).

II.5. Transmisión

La prevalencia global de *T. gondii* es en gran medida el resultado de un ciclo de vida flexible y tres formas diferentes median la colonización, diseminación y transmisibilidad de la infección hacia un amplio rango de hospederos susceptibles (Grigg y Sundar, 2009). Sin embargo, hasta donde el ciclo de vida de *T. gondii* contribuye al éxito de su propagación en la naturaleza, continúa siendo un enigma.

Estudios recientes muestran que factores específicos del hospedero aumentan la susceptibilidad de algunas especies a la infección, en dependencia del estado infectante ingerido. Por ejemplo, los ratones son relativamente más resistentes a la infección y a menudo requieren dosis que exceden los 100 bradizoítos. En contraste, los gatos pueden liberar al ambiente millones de ooquistes, luego de la ingestión de un único bradizoíto

(Dubey, 2001), mientras más de 100 ooquistes se necesitan para iniciar una infección. De esta forma, la infectividad de diferentes animales tanto por ooquistes como por bradizoítos juega un rol crucial en la dinámica de transmisión, la prevalencia y estructura genética poblacional de *T. gondii* para cualquier nicho ecológico y localización geográfica (Grigg y Sundar, 2009).

II.6. Patogenia

Durante la infección aguda o primaria, se produce la parasitemia responsable de la diseminación de los gérmenes en los distintos tejidos. Los parásitos son liberados de los quistes intracelulares (bradizoítos) o de los ooquistes (esporozoitos) por el proceso digestivo en el tracto gastrointestinal del hospedero. Se multiplican en los enterocitos y a continuación, los taquizoítos formados se diseminan por el torrente sanguíneo o linfático y parasitan las células de una variedad de órganos, donde experimentan proliferación por endodiogenia. En los seis a diez primeros días pos-infección, pueden haber invadido todos los órganos, incluyendo el cerebro (Ferguson y Dubremetz, 2007).

La entrada a las células del hospedero se realiza a través de un proceso de penetración activa que tiene lugar en menos de 20 segundos y ocurre con una aparente pasividad de la célula del hospedero (Morisaki *et al.*, 1995). Diferentes estudios revelan que la penetración a la célula es un proceso orquestado y acompañado por la secreción de productos del micronema, roptrias y gránulos densos (Opitz y Soldati, 2002; Sibley, 2003). El parásito penetra a la célula dentro de una vacuola formada por la invaginación de la membrana plasmática del hospedero y reside dentro de este compartimento especializado llamado vacuola parasitófora. Esta última, no se acidifica (Sibley, 1995) no se fusiona con lisosomas (Jones y Hirsch, 1972), y no intercepta con los sistemas endocítico o exocítico del hospedero (Mordue *et al.*, 1999), de tal forma que protege a *T. gondii* de la degradación lisosomal y minimiza su exposición al sistema inmune (Polonais y Soldati-Favre, 2010). Cuando el número de taquizoítos en la vacuola es muy elevado, la célula se rompe, se produce necrosis celular y una reacción inflamatoria. Así, los parásitos se liberan al medio extracelular y ocurre la invasión a nuevas células, las que también serán destruidas. Este

mecanismo permite la multiplicación rápida de *T. gondii* en los primeros días post-infección y su posterior difusión a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde una elevada proporción de taquizoítos son eliminados (Vidal, 1990).

Durante la segunda semana post-infección, la multiplicación de los taquizoítos disminuye hasta cesar y es en esta fase cuando el parásito se enquistas. No se conocen bien los factores que influyen en la formación de quistes intracelulares, aunque son más numerosos en la fase crónica de la enfermedad, cuando los animales ya desarrollaron los mecanismos de inmunidad humoral y celular (Dubey *et al.*, 1998; Tizard, 2000). Los quistes se asientan preferentemente en cerebro, retina, miocardio y músculo esquelético. La habilidad del parásito para interconvertirse entre bradizoítos y taquizoítos, es crítica para el éxito de la fase asexual y contribuye a regular la patogénesis del parásito, su persistencia por largo tiempo y transmisibilidad (Grigg y Sundar, 2009). En los pacientes con alteraciones en el sistema inmune, la reactivación de una infección latente conyeva a la conversión de bradizoítos en taquizoítos, cuya proliferación no es controlada de forma efectiva por los mecanismos inmunológicos del hospedero (Dubey *et al.*, 1998; Kasper, 2001; Fauci y Lane, 2001) y da origen a la NTx.

II.7. Algunos elementos de la respuesta inmune a *T. gondii*

T. gondii es un parásito que tiene capacidad para diseminarse en todos los tejidos y el control de la infección depende entre otros factores de la virulencia de la cepa y el estado inmune del hospedero (Switaj *et al.*, 2005).

Después del primer contacto entre el parásito y el hospedero, ocurre la activación no específica de macrófagos y células asesinas, junto a otras células, para limitar la proliferación del parásito (Hauser *et al.*, 1983). Las células asesinas dependen para su actividad, de señales como la de proteínas traductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT, siglas en inglés) y de factores solubles secretados por los macrófagos infectados. De esta forma, existe una acción sinérgica entre los macrófagos y las células asesinas. Una vez que el macrófago se infecta con *T. gondii*, comienza a secretar

interleuquina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral (TNF, siglas en inglés). La producción de esta interleuquina (IL-12) es reconocida por las células asesinas que en respuesta a esto, secretan interferón gamma (IFN- γ) (Gazzinelli *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 2000a, b). La producción de IFN- γ activa los macrófagos para producir TNF el cual de forma sinérgica con el IFN- γ , inicia la producción de óxido nítrico, que puede eliminar los taquizoítos de *T. gondii* por inhibición de enzimas mitocondriales y nucleares (Brunet, 2001). De esta misma forma, el IFN- γ activa la producción de intermediarios reactivos del oxígeno que constituyen un importante mecanismo efector antimicrobiano del sistema inmune innato (Brunet, 2001). Los esfuerzos conjuntos de estas dos citoquinas (IFN- γ e IL-12) son centrales en la resistencia a *T. gondii* y contribuyen a una fuerte respuesta adaptativa de células T cooperadoras tipo 1 (Th1, siglas en inglés) que también se caracteriza por altos niveles de IL-12 e IFN- γ (Miller *et al.*, 2009).

Los péptidos presentes en la superficie del parásito presentan una alta inmunogenicidad, de manera tal que la inmunidad adquirida se caracteriza por una fuerte actividad de células T CD4+, y células T citotóxicas CD8+ (Reie Sousa *et al.*, 1997). De esta forma, durante el estado agudo de la infección predominan niveles elevados de IFN- γ e IL-12, así como otras citoquinas proinflamatorias como el TNF, IL-6 e IL-1 y antiinflamatorias como la IL-10 (Denkers y Gazzinelli, 1998). El IFN- γ y el TNF son importantes para el control de la replicación de los taquizoítos durante la fase aguda y crónica de la infección, mientras la IL-10 y la IL-12 son más importantes en la fase inicial y menos durante la fase crónica de la infección (Suzuki, 2002). Entre las citoquinas reguladoras, la IL-10, cuya secreción está vinculada a las células T cooperadoras tipo 2 (Th2, siglas en inglés), células B y macrófagos, inhibe la síntesis de IFN- γ por los linfocitos Th1 y las células asesinas. Dicha actividad ocurre a través de la inhibición de la síntesis de IL-12, que es un importante modulador de la inflamación y se considera reguladora del sistema, para la prevención de una patología mediada por la propia respuesta inmune (Denker y Gazzinelli, 1998; Maubon *et al.*, 2008). Un balance adecuado entre citoquinas pro y anti inflamatorias es decisivo para establecer un equilibrio entre el parásito y su hospedero (Carruthers y Suzuki, 2007; Maubon *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009; Tait y Hunter, 2009).

Existen otras células que ayudan a la defensa contra el parásito, aunque no juegan el papel más importante. Entre estas podemos mencionar a los linfocitos T gamma delta, que se ha comprobado que expresan actividad citotóxica “in vitro” no restringida al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, siglas en inglés), contra células infectadas con *T. gondii* (Subauste *et al.*, 1995). Las plaquetas parecen tener también actividad citotóxica contra *T. gondii* y los neutrófilos y eosinófilos intervienen rápidamente en el sitio de la infección (Yong *et al.*, 1991; Chumpitazi *et al.*, 1998; Bliss *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2001). Por otro lado células no hematopoyéticas como los fibroblastos, células epiteliales o endoteliales son capaces de reducir la proliferación del parásito (Yap *et al.*, 1999).

II.8. Enfermedad Clínica

El término “Infección por *T. gondii*” describe el curso asintomático de infección observado en la mayoría de los individuos inmunocompetentes. De forma contraria, “toxoplasmosis” se refiere al curso sintomático de infección con este parásito que puede causar diversas manifestaciones clínicas (Petersen y Liesenfeld, 2007). A continuación, se discuten las principales formas de presentación de esta enfermedad.

II.8.1. Toxoplasmosis en el paciente inmunocompetente

En las personas inmunocompetentes, la primoinfección por *T. gondii* suele ser asintomática entre 80 y 90 % de los casos y solo 10 al 20 % presentan síntomas. El período de incubación es de diez a 17 días y en general la infección es asintomática u oligo sintomática, benigna y auto resolutive (Dubey, 1996; Jenun *et al.*, 1998; Hill y Dubey, 2002). Cuando se producen manifestaciones clínicas, estas pueden variar desde fiebre autolimitada hasta síntomas severos con fiebre prolongada, fatiga y corioretinitis (Luft y Remington, 1984; Bowie *et al.*, 1997). Las linfadenopatías cervicales constituyen la manifestación clínica más común y los nódulos linfáticos que se presentan son discretos y generalmente miden solo unos pocos centímetros de diámetro (McCabe *et al.*, 1987).

II.8.2. Toxoplasmosis ocular

T. gondii es responsable de la mayoría de los casos de uveítis infecciosa (inflamación intraocular) y puede ser consecuencia de una infección adquirida antes o después del nacimiento (Fekkar *et al.*, 2011). Sin embargo, en la actualidad se reconoce que un gran porcentaje de las infecciones oculares, son adquiridas luego del nacimiento (Holland *et al.*, 2004).

La retina es el lugar primario de infección en el ojo, pero pueden afectarse otros sitios como el corioide, vítreo, cámara anterior y el nervio óptico (Holland, 2004 Eckert *et al.*, 2007). Las lesiones pueden ser solitarias, múltiples o satélites a una cicatriz retinal (Conmodaro *et al.*, 2009).

Cuando la toxoplasmosis ocular está activa se presenta dolor, enrojecimiento, fotofobia y disminución de la agudeza visual. En ocasiones, se aprecian manifestaciones inusuales de patología retinal como maculopatía idiopática aguda unilateral. La lesión característica es la de una coriorretinitis necrotizante focal bilateral, que aparece al inicio como una mancha algodonsa sobrelevada. Al cicatrizar las lesiones se vuelven pálidas, se atrofian y se pigmentan de negro (Dodds, 2003). En casos severos se puede presentar desprendimiento de retina y vítreo hemorrágico, que puede llegar hasta la ceguera total (Botero y Restrepo, 1992; Roberts *et al.*, 2001).

II.8.3. Toxoplasmosis congénita

La infección aguda por *T. gondii* en mujeres embarazadas no difiere de la infección en otros individuos inmunocompetentes. La mayoría de las veces se comporta de forma asintomática, aunque pueden ocurrir linfadenopatías cervicales. Debido al curso asintomático de la infección, a menudo no se notifica y se puede transmitir al feto (Petersen y Liesenfeld, 2007). Un recién nacido expuesto a *T. gondii* en el útero de su madre, puede desarrollar toxoplasmosis congénita con consecuencias oculares y neurológicas (Havelaar *et al.*, 2007).

La toxoplasmosis contraída durante el primer trimestre del embarazo induce a los síntomas más severos, tales como alteraciones multisistémicas, destrucción de tejido cerebral e incluso la muerte fetal (Verhofstede *et al.*, 1987; Tarlow, 1994). En esta etapa, para 86 % de las pacientes que contraen el parásito, no se produce infección fetal. Sin embargo, 14 % de ellas transmiten la infección al feto. En el momento del nacimiento puede manifestarse la triada clásica de Sabin, que comprende hidrocefalia, calcificaciones intracraneales y coriorretinitis, a las que se le pueden sumar las convulsiones (Sabin, 1942). En casos donde el niño presenta signos de enfermedad el pronóstico es malo, la mortalidad es alta (alrededor del 12 %), 85 % de los niños que sobreviven presentarán retraso mental, 75 % convulsiones y 50 % pérdida de la visión (González *et al.*, 1999).

La toxoplasmosis contraída en el segundo y tercer trimestre, conlleva por lo general a una baja tasa de infección fetal (15%) y los niños infectados nacen asintomáticos (Isaccs y Moxon, 1991). Sin embargo, algunos pueden desarrollar lesiones irreversibles en los órganos, particularmente en los ojos. Entre 25 y 30 % de los fetos infectados, asintomáticos al nacer, desarrollan luego coriorretinitis bilateral. El tratamiento de las madres con fármacos antiparasitarios puede reducir la incidencia de infección congénita (Gilbert *et al.*, 2003).

II.8.4. Toxoplasmosis en el paciente inmunodeficiente

La mayoría de las formas clínicas de toxoplasmosis que se presentan en hospederos inmunocomprometidos son producto de la reactivación de una infección previa, y las afectaciones más frecuentes tienen una localización cerebral. No obstante, pueden ocurrir afectaciones a nivel ocular, pulmonar, gástrico y cardiaco. De esta forma, la retinitis toxoplásmica, constituye la segunda localización más frecuente de la toxoplasmosis en estos pacientes. Posee una frecuencia asociada con lesiones cerebrales del 30 %, hecho casi inobservable en personas inmunocompetentes (Holland *et al.*, 1988; Martín y García, 2003). Se presenta como una retinitis necrotizante, con uno o varios focos blanquecinos o blancos amarillentos de límites borrosos. La retina se halla engrosada, opaca y sus bordes

no son granulares, sino homogéneos. En general, las lesiones en estos pacientes se presentan en forma bilateral y son multifocales (Moorthy *et al.*, 1993; Pivetti-Pezzi *et al.*, 1994; Oréfice y Bonfioli, 2000; Martín y García, 2003). El comprometimiento de los pulmones ocurre generalmente durante la reactivación (Pomeroy y Filice, 1992; Rabaud *et al.*, 1996) y los pacientes suelen presentar distres respiratorio agudo, fiebre y neumonía (Decker y Masur, 1998; Charles *et al.*, 2003).

Sobre la localización gastrointestinal y cardíaca existen muy pocos estudios. Esta última se presenta por lo general en forma de miocarditis y puede ser severa en algunos pacientes (Lipshultz *et al.*, 1990; Kaul *et al.*, 1991). Para la toxoplasmosis gástrica, los principales síntomas son pérdida de peso, anorexia, vómitos, dolor abdominal en epigastrio, fiebre irregular, diarrea y síntomas digestivos altos. Suele afectar a individuos cuyos linfocitos T CD4⁺ son menores de 50 células / μ L (Smart *et al.*, 1990; Peraire *et al.*, 1993, Kofman *et al.*, 1996; Guerrero-Flores y Vega-Ramos, 2002).

Las afectaciones cerebrales son por lo general consecuencia de la reactivación de una infección latente que se origina debido a la ruptura de quistes del parásito localizados a nivel del SNC, lo cual da lugar a la ET (Derouin *et al.*, 1996). Su incidencia entre individuos infectados con el VIH, se relaciona con la prevalencia de anticuerpos anti *T. gondii* en la población general (Luft *et al.*, 1993; Cohen, 1999), y constituye una de las infecciones oportunistas más comunes entre pacientes con el sida (Vidal *et al.*, 2005). En nuestro país, aún después de la introducción de la TARGA en el año 2001, la ET ocupa el primer lugar entre las infecciones asociadas al sida, (Pérez *et al.*, 2004).

Una vez que el paciente de sida presenta fiebre y signos neurológicos focales, se debe sospechar una NTx. La forma difusa de la enfermedad es rara en el sida, pero cuando las otras causas de encefalitis se descartan, se recomienda iniciar un tratamiento empírico específico de prueba. La mayoría de las veces se trata de una reactivación de la infección crónica latente, que se disemina por vía hematogena y puede ocasionar lesiones multicéntricas con compromiso de los plexos coroides. Desde el punto de vista clínico, predomina un síndrome compatible con lesiones ocupantes, hemiparesias, deficiencias

visuales, hipertensión endocraneana, elementos neurológicos focales, compromiso de pares craneanos, trastornos de conciencia, alteraciones psiquiátricas y somnolencia. La sintomatología es variable, y depende de la localización de las lesiones y de su número (Martin y García, 2003).

Otras manifestaciones neurológicas, aunque menos frecuentes, son la mielitis transversa, el síndrome del cono medular y las endocrinopatías secundarias como el síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética, que puede aparecer por alteraciones hipotálamohipofisarias (Fauci y Clifford, 1998). En un estudio realizado en nuestro país en el año 2002, entre 88 pacientes sida con ET, se encontró que predominaron como síntomas cardinales la cefalea, fiebre y manifestaciones neurológicas tipo hemiparesia, parálisis de pares craneales, convulsiones, movimientos anormales de tipo coreoatetósico, balismos y distonías (Hernández-González *et al.*, 2002). Estas manifestaciones son extrapiramidales, dependientes de la localización de las lesiones y menos frecuentes según otros estudios (Mattos *et al.*, 1995; Piccolo *et al.*, 1999).

De forma general, los resultados reportados en la literatura indican que con la introducción de la terapia antirretroviral se redujo la ocurrencia y curso clínico de las infecciones parasitarias oportunistas en los pacientes infectados con el VIH (Palella *et al.*, 1998; CDC, 2001; Pozio y Gómez, 2005). En particular para la ET, cinco estudios longitudinales, realizados para estimar la ocurrencia de la enfermedad antes y después de la introducción de la terapia antirretroviral, demuestran una marcada reducción de la enfermedad entre pacientes positivos al VIH (Conti *et al.*, 2000; Abgrall *et al.*, 2001; Ives *et al.*, 2001; Sacktor *et al.*, 2001; Babiker *et al.*, 2002).

En nuestro país, varios estudios muestran que a partir de la introducción de la terapia antirretroviral en el año 2001, ocurrió una disminución de la ocurrencia de infecciones oportunistas relacionadas con el VIH/sida (Pérez *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2004; Estruch *et al.*, 2010). En el caso de la NTx, se produjo una reducción del 34 % de los casos en el primer año después de aplicada la terapia antirretroviral. Sin embargo, aún constituye la principal infección oportunista asociada al sida (Pérez *et al.*, 2004).

II.9. Epidemiología

La toxoplasmosis es la zoonosis de distribución más universal (Neto *et al.*, 1999; Sroka, 2001) debido a la amplia variedad de hospederos que puede utilizar *T. gondii*. Sin embargo, solo los felinos pueden realizar el ciclo sexuado del parásito (Pereira *et al.*, 2005). Aproximadamente, medio billón de personas tiene anticuerpos contra el parásito (Dubey *et al.*, 1998). La infección humana es accidental y punto final del ciclo vital de *T. gondii*. De esta forma, no juega un rol en la transmisión y consecuentemente, la patogénesis es el resultado indirecto de una adaptación a la infección (Sibley *et al.*, 2009).

Datos epidemiológicos indican que la exposición a ooquistes e ingerir alimentos poco cocidos, son los principales factores de riesgo para la infección humana (Cole *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2000; Tenter *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001; Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). La transmisión vertical, ocurre cuando la embarazada padece la infección aguda durante la gestación (McLeod *et al.*, 2000). Es rara, aunque posible, la transmisión por transfusión a través de trasplantes de órganos o por accidente ocupacional en los trabajadores de laboratorio (Dubey, 1988; Dubey *et al.*, 1998). No se conoce ningún artrópodo transmisor, pero las moscas pueden transportar algunos ooquistes en sus patas (Pereira *et al.*, 2005).

Respecto a su diversidad genética, estudios realizados en las dos décadas pasadas muestran que en muchas regiones domina un selecto número de cepas en ciertas especies hospederas, especialmente humanos y sus animales domésticos (Sibley y Boothroyd, 1992; Howe y Sibley, 1995; Ajzenberg *et al.*, 2002b, Ajzenberg *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2006). Esto parece ser el resultado de una expansión clonal de un pequeño número de genotipos. En Europa y América del Norte, los tres tipos dominantes parecen estar relacionados desde el punto de vista genético y son el resultado de uno o dos cruces entre dos o quizás tres linajes (Boyle *et al.*, 2006). Para América del Sur, existe una mayor diversidad genética de cepas (Ajzenberg *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2008; Dubey *et al.*, 2008a), que puede reflejar el origen geográfico de *T. gondii* (Sibley *et al.*, 2009).

II.10. Diagnóstico de NTx en pacientes con sida. Utilidad de las herramientas moleculares

II.10.1. Diagnóstico de NTx en pacientes con sida

En los pacientes inmunodeprimidos, las afectaciones relacionadas con *T. gondii* tienen por lo general una localización cerebral en 98 % de los casos (Israelsva y Remington, 1993). El diagnóstico definitivo requiere la demostración de taquizoítos en biopsias de cerebro. Sin embargo, es un procedimiento demasiado invasivo para el paciente y no es adecuado para el uso rutinario (Antinori *et al.*, 1997). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, siglas en inglés) estableció tres criterios fundamentales para definir un paciente con ET, donde se incluye: (1) iniciación reciente de anomalías neurológicas focales por enfermedades intracraneales o reducción de los niveles de conciencia, (2) imágenes de lesiones hipodensas que se observan en el encefalo (TAC, RMI) y (3) prueba positiva a anticuerpos anti-*T. gondii* en suero o la favorable respuesta al tratamiento empírico contra la ET (CDC, 1993). El primer inconveniente de estos criterios radica en que la encefalitis causada por *T. gondii*, es una entidad clínicamente indistinguible de otras complicaciones del SNC que también ocurren en los pacientes con sida, como el linfoma del SNC, encefalitis viral, fúngica, reactivación de la enfermedad de Chagas y neurotuberculosis (Muller *et al.*, 1983; Wilske *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1997). La TAC muestra lesiones únicas o múltiples, redondeadas, hipodensas, con edema y efecto de masa; suele captar el contraste en forma de anillo y las lesiones se localizan con preferencia en ganglios basales y en hemisferios cerebrales. De forma ocasional, pueden aparecer calcificaciones y hemorragias. La RMI es más sensible y suele demostrar la existencia de un mayor número de lesiones, aunque es posible la aparición de una sola. Ante la evidencia de una TAC normal y, aún más si se utiliza la técnica de doble contraste, es raro que la RMI ofrezca alteraciones que sugieran el diagnóstico de ET (Casanova, 2006). A pesar de esto, el principal inconveniente de estas técnicas radica en que las lesiones observadas, pueden ser similares a las de otras enfermedades cerebrales que se producen en los pacientes infectados con el VIH, como el linfoma cerebral, tuberculoma y el astrocitoma (Ciricillo y Rosenblum, 1990; Raffi *et al.*, 1997), lo que dificulta poder establecer como causa única de estas alteraciones una NTx. La detección de anticuerpos específicos contra *T. gondii* en el suero de estos pacientes se plantea como un problema de

difícil interpretación. Es conocido que en las personas infectadas con el VIH se produce un deterioro importante del sistema inmune. La toxoplasmosis en estos pacientes puede ocurrir con bajos niveles de anticuerpos anti-*T. gondii* y es rara la presencia de IgM específica (Montoya, 2002). Sin embargo, la ausencia de anticuerpos contra el parásito, aleja el diagnóstico de la enfermedad, ya que solo 3 al 6 % de los pacientes con ET, resultan negativos a estas técnicas (Antinori *et al.*, 1997; Rafi *et al.*, 1997; Nissapatorn *et al.*, 2004). El inicio del tratamiento frente a la sospecha clínica está admitido en la práctica diaria y su mayor inconveniente radica en la demora necesaria para la confirmación del diagnóstico. Adicionalmente, se inicia sobre la base de un diagnóstico presuntivo, lo que puede conllevar a errores y con ellos a un retraso para recibir la terapia necesaria. Sin embargo, en la práctica diaria, ante la imposibilidad de realizar una biopsia cerebral a cada paciente, constituye la confirmación del diagnóstico (Menotti *et al.*, 2003).

De esta forma, los diferentes criterios establecidos en la práctica diaria conyevan a una demora para la confirmación diagnóstica de la ET, de ahí que otras herramientas se utilicen para apoyar el diagnóstico. En este sentido, puede mencionarse la detección directa del parásito a través de cultivo en fibroblastos humanos o inoculación en ratones de laboratorio. Sin embargo, constituyen herramientas que de igual forma consumen mucho tiempo y tienen una baja sensibilidad (Lamoril *et al.*, 1996; Raffi *et al.*, 1997).

Con el desarrollo de la Biología Molecular y la introducción de técnicas moleculares basadas en la tecnología de PCR, ocurrió un avance considerable en el diagnóstico de esta enfermedad. La PCR permite detectar el ADN del parásito de manera rápida en fluidos biológicos obtenidos de manera menos invasiva que una biopsia cerebral (Montoya *et al.*, 1996). De esta forma, muestras de LCR, sangre y en menor medida orina, se utilizan para establecer el diagnóstico molecular de ET en estos pacientes (Lamoril *et al.*, 1996; Cresti *et al.*, 2001; Ponce Zapata y Gómez Marin, 2003; Chabbert *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2005; Cassaing *et al.*, 2006; Adurthi *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2010 a,b; Vidal *et al.*, 2011).

Hasta el momento, la utilización de muestras de sangre y LCR, evidencia una gran variabilidad en términos de sensibilidad diagnóstica. Una recopilación de los resultados

obtenidos por todos los trabajos que emplearon muestras de sangre en el diagnóstico de ET, con independencia del tipo de PCR usado y el número de pacientes, demuestra un rango de sensibilidades que oscila desde 13 hasta el 100 %, para una sensibilidad promedio del 46,3 % (444/960 pacientes) (Ho-Yen *et al.*, 1992; Dupoy-Camet *et al.*, 1993; Filice *et al.*, 1993; Dupon *et al.*, 1995; Foundrinier *et al.*, 1996; Lamoril *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 1996; Francen *et al.*, 1997; Pelloux *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2002; Priya *et al.*, 2002; Ponce *et al.*, 2003; Colombo *et al.*, 2005; Lindstrom *et al.*, 2006; Mezquita *et al.*, 2010a). Para el LCR, las sensibilidades pueden ser tan bajas como un 17 % y llegar al 100 % al emplear ensayos de PCR anidada (PCR anidada, siglas en inglés) (Bastien, 2002) o simples PCR con determinados juegos de cebadores específicos (B22/B23) (Vidal *et al.*, 2004). Es importante destacar que estas sensibilidades se reducen a valores muy bajos cuando la muestra (sangre o LCR) se obtiene luego de varios días después de iniciar el tratamiento antiparasitario (Bastien, 2002).

En cuanto a la especificidad, usualmente alcanza valores cercanos al 100 %, lo cual convierte a la PCR en una técnica altamente específica. No obstante, la utilización de muestras de sangre puede conllevar a problemas de especificidad (Nicoll *et al.*, 1996; Pelloux *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2005; Mesquita *et al.*, 2010a).

En conclusión, no existe preferencia en lo que respecta a la utilización de muestras de sangre y LCR para establecer el diagnóstico de ET. Ambos fluidos se evalúan, la mayoría de las veces en forma independiente. Adicionalmente, otros elementos contribuyen a las variables sensibilidades que se encuentran por los diferentes investigadores. Un análisis detallado de cada uno de estos elementos se aborda en el acápite siguiente.

Para las muestras de orina, su utilidad diagnóstica permanece casi inexplorada en pacientes con NTx. Sin embargo, se sugiere que la eliminación de *T. gondii* en muestras de orina durante la fase aguda de la enfermedad puede proveer un método adicional para establecer el diagnóstico de toxoplasmosis congénita (Fuentes *et al.*, 1996). Adicionalmente, el hallazgo del ADN parasitario e incluso parásitos vivos en orina de ratones infectados con *T.*

gondii (Nguyen *et al.*, 1996), demuestra su posible utilidad para la detección de este patógeno.

II.10.2. Utilización de herramientas moleculares para la detección de *T. gondii*. Algunas consideraciones importantes

En la actualidad, los métodos moleculares que utilizan la tecnología de la PCR, constituyen herramientas importantes en el diagnóstico de varias enfermedades infecciosas. Son métodos sencillos, sensibles y reproducibles, que pueden aplicarse a una variedad de muestras animales o humanas (Bell y Ranford-Cartwright, 2002; Contini *et al.*, 2005; Calderaro *et al.* 2006; Bastien *et al.*, 2008). La utilización de estas herramientas en la detección molecular de *T. gondii*, permite establecer la confirmación diagnóstica de casos afectados por esta parasitosis. Sin embargo, existen extensas variaciones entre laboratorios y son escasos los estudios comparativos o aquellos en los que los factores esenciales de esta herramienta se optimicen de forma cuidadosa.

Las condiciones fisicoquímicas de la reacción, donde se incluyen la concentración y naturaleza del ADN a analizar, así como la selección de marcadores y cebadores ideales, afectan los resultados de sensibilidad del ensayo y constituyen factores primarios que deben normalizarse (Bastien *et al.*, 2008). Elementos adicionales como el volumen total de reacción, el método de extracción de ácidos nucleicos y la variabilidad genética del ADN a amplificar, también influyen en la sensibilidad de la PCR.

De forma ideal, las condiciones de reacción deben someterse a un extenso número de modificaciones que constituyen la llamada normalización de la PCR. Este proceso tiene como objetivo aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo y es un factor considerable de variación. Adicionalmente, la cantidad o concentración de ADN en las diferentes preparaciones, donde se incluye el ADN del patógeno y su hospedero, varía de una muestra a otra en la práctica rutinaria y esto puede afectar la actividad enzimática de las polimerasas. Altas concentraciones de ADN humano pueden disminuir la sensibilidad de

los ensayos moleculares designados para detectar patógenos infecciosos (Bastien *et al.*, 2008).

El número de copias a amplificar presentes en el genoma, constituye otro factor esencial que afecta la sensibilidad del ensayo. Sin embargo, el hecho de que dos métodos de PCR utilicen el mismo marcador e incluso los mismos cebadores, no asegura resultados idénticos. A pesar de esto, para la mayoría de los casos, el grado de repetición de un marcador es proporcional a la sensibilidad del ensayo, y mientras más copias del mismo estén presentes en el genoma, es más fácil la detección (Bastien *et al.*, 2008).

Para *T. gondii*, diversos marcadores se emplean en los ensayos moleculares, el primero y de manera general el que con mayor frecuencia se emplea es el gen B1, que tiene 35 repeticiones en el genoma del parásito con una función hasta ahora desconocida (Burg *et al.*, 1989). Para este, diferentes juegos de cebadores se emplean como rutina, ya sea para ensayos de PCR o PCR anidada, cuya utilidad se demuestra en diversos estudios clínicos (Burg *et al.*, 1989, Van de Ven *et al.*, 1991; Gross *et al.*, 1992; Ostergaard *et al.*, 1993; Verhofstede *et al.*, 1993; Bretagne *et al.*, 1995; Lamoril *et al.*, 1996; Jenum *et al.*, 1998; Pelloux *et al.*, 1998; Pujol-Rique *et al.*, 1999; Jalal *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2005; Lindstrom *et al.*, 2006; Adurthi *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2010 a,b). Otro marcador empleado es la simple copia del gen P30 que codifica para el antígeno de superficie más importante del parásito (Burg *et al.*, 1988) e igualmente diversos juegos de cebadores se utilizan para el diagnóstico (Savva *et al.*, 1990; Dupoy-Camet *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1993; James *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999). La secuencia que codifica para la subunidad pequeña del Acido Ribonucleico (ARN) ribosomal, con 110 repeticiones en el genoma de *T. gondii*, representa otro marcador explorado por varios investigadores (Cazenave *et al.*, 1991; Guay *et al.*, 1993; MacPherson y Gajadhar, 1993; Ostergaard *et al.*, 1993). Los genes de la α - tubulina (Feng y Milhausen, 1999) y β -tubulina (Costa *et al.*, 1997), se emplean en menor medida. En el año 2000, Homan y col identificaron una secuencia de 529 pb que se repite más de 300 veces en el genoma de *T. gondii*. Aunque algunos trabajos comparativos muestran que esta secuencia tiene mayor sensibilidad diagnóstica en relación al B1, otros obtienen sensibilidades similares e

inferiores (Okay *et al.*, 2009; Whab *et al.*, 2010). Otras secuencias únicas en el genoma, que incluyen los genes SAG-1, SAG-2, SAG-3, SAG-4 y GRA-4 se emplean en menor medida por los diferentes laboratorios de investigación (Rinder *et al.*, 1995; Meisel *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 1997; Pelloux *et al.*, 1998; Fuentes *et al.*, 2001; García *et al.*, 2003; Ponce Zapata y Gómez Marin, 2003).

Respecto a la variabilidad genética, al seleccionar un marcador y juego de cebadores es importante asegurar que las secuencias que se amplifican no están sujetas a variación pues pueden conllevar a hibridaciones no óptimas entre los cebadores y el marcador seleccionado. De esta misma forma, pueden introducir estructuras secundarias más estables que afectan el proceso de amplificación y reducen la sensibilidad analítica (Bastien *et al.*, 2008).

Finalmente, el proceso de normalización debe resultar en un perfecto vínculo con el método de extracción de los ácidos nucleicos, pues los diferentes métodos conllevan a recuperar diferentes concentraciones de ADN genómico del hospedero u organismo diana, y ambos, juegan un papel esencial en la ejecución del ensayo (Wilson *et al.*, 2004). Al respecto, existen evidencias que demuestran como la eficacia de diferentes métodos de extracción de ADN, puede influir en la sensibilidad de un ensayo (Yera *et al.*, 2007). En el caso de *T. gondii*, como ocurre para la mayoría de los protozoos, el ADN está embebido en una masa del ADN del huésped en donde este último, está presente varios millones de veces más. En forma adicional, algunos componentes de las muestras biológicas pueden inhibir la polimerasa. Métodos simples (lisis más ebullición y centrifugación) son eficientes para muestras biológicas que contienen pocas células y no contienen sangre (LCR y Líquido amniótico). Cuando las muestras presentan muchas células o sangre, se puede realizar la extracción a través del método convencional del fenol-cloroformo o sistemas comerciales (Gross *et al.*, 1992; Romand y Thulliez, 2000; Bastien, 2002).

II.11. Estructura poblacional de *T. gondii*, asociación de los genotipos con infecciones humanas y métodos para establecer el genotipaje

II.11.1. Estructura poblacional de *T. gondii* y asociación de los genotipos con infecciones humanas.

A pesar de la existencia de un ciclo sexual bien caracterizado para *T. gondii*, la estructura poblacional de este parásito, en algunas regiones refleja una alta frecuencia de replicación asexual. Los primeros estudios de caracterización genética realizados para *T. gondii*, mostraron una escasa diversidad genética (Darde *et al.*, 1992). Posteriormente, el análisis de un extenso número de aislamientos provenientes de América del Norte y Europa, reveló la existencia de una estructura poblacional clonal, con tres genotipos denominados I, II y III (Howe *et al.*, 1997). Sin embargo, mientras la clonalidad predomina en América del Norte y Europa, el muestreo adicional de un amplio rango de localizaciones, sugiere que cepas de otras regiones tienen una mayor diversidad genética (Ajzenberg *et al.*, 2004). De esta forma América del Sur muestra una diversidad genética única, con presencia de genotipos que no pertenecen a los linajes clonales y son diferentes desde el punto de vista biológico y genético (Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007a,b,c; Pena *et al.*, 2008; Sibley *et al.*, 2009). Estos genotipos se designan como atípicos o exóticos y representan solo 5 al 10 % de los aislamientos que se identifican. De forma general, se aíslan de hospederos exóticos, de aquellos que habitan en áreas geográficas remotas o pacientes con una presentación clínica inusual (Darde, 1996; Grigg *et al.*, 2001 a,b). El desequilibrio encontrado entre los diferentes locus de estos aislamientos sugiere que los parásitos pueden experimentar frecuentes recombinaciones sexuales (Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2006).

Para África, los estudios concernientes al genotipaje de *T. gondii* son escasos y en un inicio mostraron un predominio de cepas clonales, similar a Europa y América del Norte (Velmurugan *et al.*, 2008). Estudios posteriores, muestran la circulación de cepas relacionadas desde el punto de vista genético con aislamientos provenientes de América Central y América del Sur (Mercier *et al.*, 2010).

Respecto a la virulencia del parásito, está muy bien establecido que las cepas tipo I son altamente virulentas en ratones, mientras los tipos II y III son avirulentos. Dicha asociación no está demostrada en humanos, aunque evidencias circunstanciales sugieren que la presencia de genotipos atípicos si está relacionada con formas severas de la enfermedad. Adicionalmente, ciertos tipos genéticos pueden estar asociados con diferentes formas clínicas, (Ajzenberg *et al.*, 2002b; Carme *et al.*, 2002; Demar *et al.*, 2007; De Salvador-Guillouët *et al.*, 2006). Por ejemplo, estudios realizados en Brasil (Khan *et al.*, 2006; Vallochi *et al.*, 2005) y Estados Unidos (Grigg *et al.*, 2001b), encuentran una clara predominancia del tipo I y genotipos atípicos en toxoplasmosis ocular, con independencia de la localización geográfica de los pacientes. Estos resultados no son sorprendentes para Brasil, donde con frecuencia se identifican un gran número de genotipos atípicos. Sin embargo, son inesperados para América del Norte, donde predominan las cepas tipo II, con independencia de la presentación clínica (Howe y Sibley, 1995; De Sousa *et al.*, 2006; Dumetre *et al.*, 2006; Ajzenberg *et al.*, 2009).

Para los casos congénitos, más del 80 % de las infecciones caracterizadas en Francia, son causadas por el genotipo II (Ajzenberg *et al.*, 2002b) y el mayor determinante de la severidad continúa siendo el momento de la infección. (Dunn *et al.*, 1999). En América del Sur, donde no predominan los tipos clónales, los estudios de infección congénita severa indican el rol de las cepas tipo I, atípicos o recombinantes I/III (Gallego *et al.*, 2006). De igual forma, en pacientes inmunocomprometidos, el predominio de genotipos está asociado con el contexto geográfico (Su *et al.*, 2006). Cepas tipo I, III y genotipos atípicos predominan en Brasil, mientras los genotipos I y II son frecuentes en Estados Unidos y Europa, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011).

En conclusión, quedan muchos aspectos por explorar en los estudios de asociación genotipo-presentación clínica y genotipo-severidad de la enfermedad. Estudios posteriores pudieran esclarecer estas asociaciones.

II.11.2. Métodos para establecer el genotipaje de *T. gondii*

Los primeros estudios de tipificación de *T. gondii* tuvieron como fundamento la electroforesis de enzimas multilocus (EEM), lo cual permitió caracterizar en su mayoría, aislamientos de *T. gondii* colectados de Francia. Este sistema de tipificación agrupó a *T. gondii* en tres zimódemos diferentes (Z1, Z2, Z3) (Darde *et al.*, 1992). Sin embargo, a pesar de su alta especificidad, el requerimiento de un elevado número de parásitos purificados, constituyó una desventaja para su aplicación (Sibley *et al.*, 2009). Posteriormente, los métodos de tipificación se enfocaron al análisis de microsatélites, al emplear el polimorfismo de longitud de secuencias de ADN repetidas, que de forma general están presentes en regiones no codificadoras del genoma. Aunque el grado exacto de mutaciones a nivel de microsatélites no se conoce en *T. gondii*, para eucariontes en general, oscila entre 10^{-2} y 10^{-5} por locus, dejando claro un alto grado de mutaciones y su utilidad para aumentar la resolución de la tipificación (Ajzenberg *et al.*, 2002a; Su *et al.*, 2009). El polimorfismo de fragmentos amplificados al azar permite igualmente caracterizar las cepas de *T. gondii* (Guo y Johnson, 1995; Ferreira *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados de esta técnica se afectan por la contaminación con ADN de las células del hospedero, lo cual introduce una fuente significativa de variabilidad (Sibley *et al.*, 2009). Por su parte, la técnica de RFLP, constituye una estrategia simple y eficiente para realizar el genotipaje de *T. gondii*. Está basada en la habilidad de las endonucleasas de restricción para reconocer secuencias de ADN específicas y realizar la digestión enzimática de estas. Los resultados posteriores a la digestión enzimática se analizan a través de una electroforesis en gel de agarosa. La observación de patrones de bandas diferentes, en función del polimorfismo de cada marcador, permite establecer la diferenciación de los genotipos del parásito (Sibley y Boothroyd, 1992; Howe y Sibley, 1995). Para mejorar el sistema de tipificación de cepas mixtas, recombinantes e inusuales, se analizan en conjunto los resultados para diferentes marcadores genéticos (Ferreira *et al.*, 2006, Ferreira *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2006). Su simplicidad, relativo bajo costo y alto poder de resolución (similar a la secuenciación del ADN), la convierten en la herramienta preferida para la caracterización de *T. gondii* en estudios epidemiológicos (Su *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2009).

Por otro lado, la secuenciación de regiones genómicas puede estimar una diversidad genética mucho mayor que el resto de los métodos. Simples polimorfismos de nucleótidos, así como pequeñas inserciones y deleciones se detectan a través de la secuenciación. Su desventaja obvia es que este sistema de tipificación requiere de tecnología sofisticada no disponible para muchos laboratorios de investigación (Sibley *et al.*, 2009).

Finalmente las técnicas de serotipificación tienen limitaciones debido a la cercana similitud entre las cepas de *T. gondii*, las cuales comparten los mayores determinantes antigénicos. Teniendo en cuenta que algunos epitopos son polimórficos e inmunodominantes, métodos de tipificación serológica se utilizan para distinguir tipo I o III del tipo II (Kong *et al.*, 2003). Sin embargo, aún no es posible separar de forma confiable las cepas tipo I de las tipo III o identificar el tipo de cepa en regiones donde otros genotipos predominan (Sibley *et al.*, 2009).

II.12. Tratamiento.

La decisión de tratar a un paciente se basa en la localización de la infección, el estado inmune del paciente y el hecho de estar en presencia o no de una mujer embarazada. La terapéutica estándar incluye la combinación de la pirimetamina y una sulfonamida o en el caso de alergia a las sulfonamidas, el uso de clindamicina. En general, los fármacos para tratar la enfermedad son activos contra el estado de taquizoito y su eficiencia está limitada para eliminar parásitos enquistados.

La pirimetamina es un sustituto de la fenilpirimidina, que es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa. Se administra por vía oral, se absorbe muy bien en el tracto gastrointestinal y tiene una vida media de tres a cuatro días. Alcanza una penetración en el LCR del 10 al 25 % de los valores que pueden alcanzarse en la sangre.

Las sulfonamidas, inhiben la sintetasa de ácido dihidropterico, que es otra enzima involucrada en el metabolismo del ácido fólico, de tal forma que ejerce una acción sinérgica con la pirimetamina (Petersen y Liesenfeld, 2007). La sulfadiazina también debe administrarse por vía oral y su vida media es menos de diez a doce horas. El ácido fólico

se administra de forma rutinaria para prevenir la toxicidad hematopoyética de la Pirimetamina (Ngyuen y Stadtsbaeder, 1983; Piketty *et al.*, 1990).

Algunos macrólidos también muestran efectividad contra *T. gondii*. Entre estos se destaca la azitromicina, claritromicina, espiramicina, y clindamicina. Se utilizan además con cierta efectividad la atovaquona y el fluouracil. El tratamiento con espiramicina, por su baja toxicidad y el hecho de no atravesar la placenta, se utiliza como profilaxis en mujeres durante el embarazo para reducir la transmisión vertical del parásito (Desmonts y Couvreur, 1978).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Tipo de estudio, universo y datos obtenidos de cada paciente

III.1.1. Tipo de estudio y universo

Se realizó un estudio prospectivo, observacional analítico de corte transversal que incluyó pacientes VIH-sida con manifestaciones neurológicas, que se admitieron en el IPK, La Habana Cuba, en períodos diferentes desde septiembre del 2006 a septiembre del 2010. Adicionalmente, se emplearon muestras de LCR de la seroraquioteca del Laboratorio Central de Líquido Cefaloraquídeo (LABCEL), provenientes de personas no infectadas con el VIH, quienes presentaron enfermedades del SNC no asociadas al sida. Durante una primera etapa, se emplearon muestras de LCR provenientes de pacientes VIH-sida y personas no infectadas con el VIH. En una segunda etapa, se utilizaron muestras de sangre y orina obtenidas en paralelo de pacientes VIH-sida.

III.1.2. Datos obtenidos de las historias clínicas de los pacientes

Se analizó la historia clínica de cada paciente VIH-sida, y se obtuvieron los datos clínicos y de laboratorio necesarios para su agrupación: sintomatología clínica, resultados de serología para *T. gondii*, tratamiento indicado, días transcurridos entre el comienzo del tratamiento empírico específico y la toma de las muestras, respuesta al tratamiento empírico específico para *T. gondii* y resultados de la TAC o RMI. En los pacientes fallecidos luego de la toma de muestras de LCR, sangre u orina, se analizaron las conclusiones finales de la necropsia realizada por el Laboratorio de Anatomía Patológica del IPK.

Para las muestras provenientes de la seroraquioteca de LABCEL, se recogieron los datos clínicos de cada paciente, los resultados de laboratorio obtenidos luego del análisis del LCR y el diagnóstico final realizado.

III.1.3. Criterios de inclusión y exclusión

Formaron parte del estudio pacientes VIH-sida que presentaron manifestaciones neurológicas independientemente del diagnóstico realizado, en períodos diferentes desde septiembre del 2006 a septiembre del 2010. Para su inclusión en el estudio, fue imprescindible obtener la constancia de su consentimiento así como el volumen de muestra necesario para realizar los estudios de laboratorio. Cada paciente fue clasificado según los criterios establecidos por el CDC (1993) en paciente con y sin NTx (CDC, 1993). El grupo de pacientes con NTx estuvo compuesto por pacientes con sida que cumplían al menos dos de los criterios establecidos por el CDC, que incluyen: (1) iniciación reciente de anomalías neurológicas focales por enfermedades intracraneales o reducción de los niveles de conciencia, (2) imágenes de lesiones hipodensas que se observan en el encefalo (TAC, RMI) y (3) prueba positiva a anticuerpos anti-*T. gondii* en suero o la favorable respuesta al tratamiento empírico contra la ET (CDC, 1993). Este último (respuesta favorable al tratamiento empírico) se consideró un criterio de inclusión imprescindible, ya que es el único criterio que permite la confirmación final del diagnóstico en la práctica diaria.

Conformaron también este grupo, pacientes que luego de obtener las muestras necesarias para la investigación fallecieron antes de poder evaluar la respuesta al tratamiento empírico y para los cuales el diagnóstico de NTx fue confirmado a través de un examen neurohistopatológico.

El grupo de pacientes sin NTx incluyó pacientes VIH-sida para los que se descartó una posible ET al no cumplir con los criterios establecidos por el CDC. Adicionalmente fueron incluidos en este grupo muestras de LCR de la seroraquioteca de LABCEL, provenientes de personas no infectadas con el VIH, quienes presentaron enfermedades del SNC no asociadas al sida, no tuvieron sospecha clínica ni radiológica de una NTx y no recibieron tratamiento específico para esta enfermedad.

Se excluyeron del estudio los pacientes que no brindaron su consentimiento para participar en la investigación, aquellos para los cuales complicaciones de diversa índole imposibilitaron obtener las muestras o el volumen necesario para la realización de los estudios de laboratorio. De igual forma fueron excluidos todos los pacientes que fallecieron antes de la fecha prevista para la toma de muestras.

III.2. Cepas de referencia. Obtención del ADN genómico, verificación de su calidad, concentración y pureza.

III.2.1. Obtención de los taquizoitos de *T. gondii*

Se utilizaron parásitos de ocho cepas de referencia de *T. gondii* (RH, Me49, OH3, C56, Bev, Prug, Tg51, Wil). La cepa RH, se mantuvo “in vivo” en ratones machos OF1, provenientes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). El resto de las cepas OH3, Me49, C56, Bev, Prug, Tg51, Wil, se multiplicaron de forma independiente en monocapa de fibroblastos humanos, en medio Dulbecco's modificado (Sigma, ST Louis, MO) con 10 % de suero fetal bovino (Sigma, ST Louis, MO, EEUU), 1 mM glutamina y 10 µg/mL de gentamicina. Los parásitos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y se realizaron pases sucesivos cada cinco días.

III.2.2. Extracción y purificación del ADN genómico de las cepas de referencia de *T. gondii*

Para la extracción del ADN genómico de cada cepa de referencia se utilizó el método de fenol-cloroformo (Maniatis *et al.*, 1992). Taquizoitos de *T. gondii* (2×10^6) se resuspendieron en 300 µL de tampón de lisis (tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 25 mM, NaCl 25 mM, SDS al 1 %) y 100 µg/mL de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania). Se incubó durante dos horas a 56 °C y seguidamente se realizaron dos extracciones de proteínas con igual volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), con sus respectivas centrifugaciones a 8 000 g por 10 min. El material genético se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y 30 µL de acetato de sodio (3 M; pH=5,3) durante 30 min a -20 °C. El precipitado de los ácidos

nucleicos que se obtuvo por centrifugación a 10 000 g durante 20 min, se lavó (etanol 70 %) y secó a temperatura ambiente. En una etapa final, el precipitado se resuspendió en 50 µL de tampón tris-EDTA (TE) (tris HCl 1 pH=8, EDTA 1 mM pH=8) y se conservó a -20 °C.

III.2.3. Determinación de la calidad del ADN purificado

La calidad del proceso de extracción del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % con el empleo de tampón tris borato EDTA (TBE 0,5 x) (tris-borato 0,045 M, EDTA 0,001 M) y bromuro de etidio (0,5 mg/mL). La corrida se realizó a un voltaje de 150 V durante 30 min en la fuente (Pharmacia LKB Multidrive XL, EEUU) y la visualización se llevó a cabo mediante luz ultravioleta en un transiluminador (Macrovue 2011, LKB, Reino Unido).

III.2.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN purificado

La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro (Pharmacia, EEUU) mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm.

La cuantificación se realizó teniendo en cuenta el principio que 1U a 260 nm corresponden a 50 µg de ADN de doble cadena.

Así:

$$\text{Concentración de ADN (} \mu\text{g/ } \mu\text{L)} = \frac{50 \times \text{dilución} \times \text{D.O.}_{260 \text{ nm}}}{1\ 000}$$

Para determinar la pureza del ADN la lectura se realizó además a 280 nm, longitud de onda a la cual absorben las proteínas, y se consideró un ADN de adecuado nivel de pureza cuando el cociente de la absorbancia medida a 260 y 280 nm se encontró entre 1,8 y 2,0.

III.3. Protocolos a evaluar y normalización de los componentes de la PCR y PCR anidada

III.3.1. Protocolos a evaluar

Se evaluaron tres protocolos que utilizan distintos juegos de cebadores que reconocen regiones específicas dentro de la secuencia genómica del gen B1 de *T. gondii*. Los cebadores B22-B23 se utilizaron para amplificar una secuencia de 115 pares de bases (pb) a través de una sola reacción de amplificación (PCR). Los cebadores S1-AS1 y T1-T4, amplifican regiones de 580 y 196 pb respectivamente, como parte de la primera reacción de amplificación de dos protocolos independientes de PCR anidada. Para estos, se realizó una segunda reacción de amplificación en la que emplearon los cebadores S2-AS2 y T2-T3 que amplifican regiones internas de 530 y 96 pb para los fragmentos de 580 y 196 pb, respectivamente. La tabla 1 muestra los protocolos evaluados, las características de cada cebador y la referencia de los programas empleados para la amplificación. Una representación de la secuencia genómica del gen B1 así como las regiones reconocidas por los diferentes cebadores se muestra en la figura 5.

Tabla 1: Protocolos y cebadores utilizados para amplificar regiones específicas del gen B1 de *T. gondii*.

Protocolos empleados	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Reacción	Talla del fragmento amplificado (pb)	Referencia
B22-B23	B22	TGT TCT GTC CTA TCG CAA CG	PCR (Primera)	115	Bretagne <i>et al.</i> , 1993
	B23	TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA AC			
S1-AS1/S2-AS2	S1	TGTTCTGTCCTATCGCAACG	PCR anidada (Primera)	580	Grigg y Boothrooy, 2001c
	AS1	ACGGATGCAGTTCCTTTCTG			
	S2	TCTTCCCAGACGTGGATTTC	PCR anidada (Segunda)	530	Grigg y Boothrooy, 2001c
	AS2	CTCGACAATACGCTGCTTGA			
	T1	GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG	PCR anidada (Primera)	194	Burg <i>et al.</i> , 1989
	T4	TCTTTAAAGCGTTCGGGTC			
T1-T4/T2-T3	T2	GGCGACCAATCTGCGAATACACC	PCR anidada (Segunda)	96	Burg <i>et al.</i> , 1989
	T3	TGCATAGGTTGCAGTCACTG			

III.3.2. Normalización de los componentes de la PCR y PCR anidada

Las concentraciones óptimas de algunos de los componentes de la PCR y PCR anidada para los tres protocolos utilizados se determinaron de forma independiente, y se consideró concentración o cantidad óptima aquella con la que se obtuvo la banda específica con mayor intensidad, en la que se usó la menor concentración del componente que se estandarizó y de forma preferencial, sin la aparición de productos inespecíficos.

De esta forma, cada una de las reacciones de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μL , conformado por 2,5 μL de tampón de amplificación 10x (Promega, EEUU) y 200 μM de cada desoxinucleotido (dNTP, siglas en inglés) (Promega, EEUU). Para los componentes a optimizar: MgCl_2 (Promega, EEUU), Oligonucleótidos sintéticos o cebadores, (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) y Taq ADN polimerasa (Promega, EEUU), se evaluaron diferentes concentraciones. A continuación, se refieren los rangos de concentración evaluados para cada protocolo:

B22-B23

Primera reacción: MgCl_2 (1,5 mM – 4,0 mM); Cebadores (0,05 μM - 0,4 μM); Taq ADN polimerasa (0,5 U- 3,0 U).

S1-AS1/S2-AS2

Primera reacción: MgCl_2 (0,5 mM- 2,0 mM); Cebadores (0,05 μM - 0,3 μM); Taq ADN polimerasa (0,5 U- 2,0 U).

Segunda reacción: MgCl_2 (0,5 mM – 2,5 mM); Cebadores (0,1 μM - 0,3 μM); Taq ADN polimerasa (0,5 U- 2,0U).

T1-T4/T2-T3

Primera reacción: MgCl_2 (0,5 mM- 3,0 mM); Cebadores (0,05 μM - 0,5 μM); Taq ADN polimerasa (1,0 U- 2,5 U).

Segunda reacción: MgCl_2 (1,5 mM – 2,5 mM); Cebadores (0,02 μM - 0,4 μM); Taq ADN polimerasa (0,5 U- 2,5 U).

Se incluyó un control negativo en cada experimento, para el cual se utilizó H₂O destilada estéril en lugar de ADN molde de *T. gondii*. Se empleó como control positivo de la primera reacción de amplificación de cada protocolo, 100 ng del ADN de la cepa RH de *T. gondii*. Para la segunda reacción de amplificación de los protocolos de PCR anidada, se utilizó 1 µL del producto de amplificación proveniente de la primera reacción. Todas las amplificaciones se realizaron de forma independiente en un termociclador (MJ Research, EEUU) según los perfiles descritos en la literatura para cada protocolo, cuya referencia aparece en la tabla 1.

Para la detección de los productos de amplificación se disolvió 10 µL de cada mezcla resultante en azul de bromofenol 0,25 % y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2 % preparado en tampón TBE 0.5 x con bromuro de etidio (0,5 mg/mL). La visualización se realizó mediante luz ultravioleta en un transiluminador (Syngene, Genius, Bélgica) y se consideró positivo cuando se visualizó la banda de amplificación correspondiente a la talla esperada para cada reacción.

III.3.3. Reproducibilidad de los protocolos de PCR y PCR anidada

La reproducibilidad de cada una de las reacciones se determinó al realizar la amplificación del ADN extraído de la cepa RH en tres días diferentes con las condiciones optimizadas para cada protocolo y dos réplicas dentro de cada ensayo. Los resultados se comprobaron mediante electroforesis según se describió en el acápite III.2.3.

III.3.4. Sensibilidad analítica de cada protocolo

Se realizaron diluciones 1:2 del ADN del parásito (cepa RH), en agua destilada estéril partiendo desde 1 ng hasta 0,1 pg de ADN. Posteriormente, se procedió a la amplificación a través de la PCR o primera reacción de amplificación para los protocolos de PCR anidada, según las condiciones previamente optimizadas. Los productos de amplificación obtenidos para cada dilución se observaron en una electroforesis utilizando las condiciones descritas en el acápite III.2.3.

III.3.5. Especificidad analítica de cada protocolo

Para probar la especificidad de cada protocolo se realizó un estudio de los cebadores empleados, mediante la herramienta para búsqueda de alineamientos básicos locales (BLAST, siglas en inglés) disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. De esta forma se determinó si los cebadores utilizados hibridizan total o parcialmente con la secuencia genómica de otros microorganismos. Adicionalmente, se utilizó como molde para la PCR y PCR anidada, 10 ng del ADN genómico de varias especies de hongos, bacterias, virus y parásitos. A continuación se nombran los microorganismos utilizados: Hongos: *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida parapsilopsis*, Bacterias: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomona aeruginosa*, Virus: *herpes simple*, *citomegalovirus*, *Epstein Barr*, *varicela zoster* Parásitos: *Toxoplasma gondii* (cepa RH), *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*.

III.4. Evaluación de la eficacia de métodos convencionales y comerciales para la extracción de ADN de *T. gondii* a partir de muestras de LCR, sangre y orina

III.4.1. Eficacia de cada protocolo de extracción de ADN

Con el objetivo de determinar el método de extracción de ADN adecuado para emplearse en las diferentes muestras clínicas, se comparó la eficacia de diferentes sistemas convencionales de extracción de ADN, en relación a protocolos comerciales. A partir de sedimentos celulares del orden de 10^6 parásitos, obtenidos por centrifugación (8 000 g durante 10 minutos) de suspensiones del orden de 10^6 parásitos/mL (cepa RH), luego de conteo en cámara de Neubauer, se realizaron diluciones 1:2 en 10 μ L de agua destilada estéril hasta obtener alícuotas con 1 taquizoito. Posteriormente se seleccionaron alícuotas que contuvieran altas concentraciones de parásitos así como las diluciones finales conteniendo hasta un único parásito. Estas últimas, permitirían determinar el límite de detección de cada método empleado. A cada una de las diluciones seleccionadas se le añadió de forma independiente 200 μ L de LCR, sangre y orina, libres de parásitos y se procedió a la extracción del ADN a través de cada uno de los protocolos a evaluar para cada fluido (descritos en el acápite III.4.2). La amplificación del ADN se realizó según las condiciones óptimas para cada uno de los protocolos empleados y con la utilización de los perfiles de amplificación descritos en la literatura y cuya referencia aparece en la tabla 1

(acápite III.3.1). Teniendo en cuenta que todos los cebadores amplifican regiones dentro del mismo gen conservado (B1), consideramos que la evaluación de los sistemas simulados podía ser factible con la utilización de cualquiera de los juegos de cebadores empleados en el estudio. La corrida electroforética (150V) de todos los productos de amplificación se realizó en gel de agarosa 2 % (Promega, EEUU), con las condiciones de corrida descritas en el acápite III.2.3 . Para finalizar, se determinó la sensibilidad analítica (menor dilución en la que se observó una banda de amplificación a la talla correcta) y este parámetro midió la eficacia de cada método. A continuación se explican los cebadores, su suspensiones iniciales de parásitos y métodos de extracción de ADN evaluados en cada caso.

LCR

Cebadores: S1-AS1

Métodos de extracción de ADN y suspensiones iniciales: Lisis y centrifugación ($8,75 \times 10^6$ parásitos/mL), Fenol-Cloroformo ($1,92 \times 10^6$ parásitos/mL), Sistema comercial MiniMAG ($11,2 \times 10^6$ parásitos/mL).

SANGRE

Cebadores: B22-B23

Métodos de extracción de ADN y suspensiones iniciales: Fenol-Cloroformo ($1,2 \times 10^6$ parásitos/mL), Sistema comercial MiniMAG ($1,2 \times 10^6$ parásitos/mL).

ORINA

Cebadores: B22-B23

Métodos de extracción de ADN y suspensiones iniciales: Lisis y centrifugación ($11,2 \times 10^6$ parásitos/mL), Sistema comercial MiniMAG ($11,2 \times 10^6$ parásitos/mL).

III.4.2. Descripción de los métodos de extracción de ADN

Método de lisis y centrifugación: Se añadió de forma independiente 200 μ L de LCR y orina a las diluciones seleccionadas en cada caso y se procedió a centrifugar cada una de ellas (8 000 g por 10 min). El precipitado celular que se obtuvo, se incubó a 55 °C durante 90 minutos en 15 μ L de tampón de lisis (tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM; 0,1 mg de gelatina por

mL; tween 20 0,5 %) y 20 µg/mL de Proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania). Como último paso, se inactivó la proteinasa K a 94°C por 10 min, se centrifugó a 10 000 g durante 5 min, y el sobrenadante que se obtuvo se conservó a -20°C (Gross *et al.*, 1992).

Método de fenol-cloroformo: Se añadieron de forma independiente 200 µL de LCR y sangre a las diluciones seleccionadas en cada caso y se procedió a centrifugar cada una de ellas (8 000 g por 10 min). El precipitado celular que se obtuvo se incubó a 56 °C durante 2 horas en 300 µL tampón de lisis (tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 25 mM, NaCl 25 mM, SDS al 1 %) y 100 µg/mL de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania). Luego de la incubación, se realizaron dos extracciones de proteínas, con igual volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y cloroformo-álcool isoamílico (24:1), con sus respectivas centrifugaciones a 8 000 g durante 10 min. El material genético se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y 30 µL de acetato de sodio (0,3 M; pH=5,3) durante 30 min a -20 °C. El precipitado de los ácidos nucleicos que se obtuvo por centrifugación a 10 000 g durante 20 min, se lavó con etanol 70 %, se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 15 µL de tampón tris-EDTA (TE) (tris HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) y se conservó a -20 °C (Maniatis *et al.*, 1992).

Sistema comercial MiniMAG: Se añadieron de forma independiente 200 µL de LCR, sangre y orina a cada dilución seleccionada, se adicionó 2 mL de tampón de lisis y se dejó reposar la mezcla por 10 minutos, según las condiciones recomendadas por el fabricante. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó a 2 500 g durante 2 minutos y se añadió 50 µL de sílica magnetizada para la unión de los ácidos nucleicos. Después de reposar por 10 minutos, se centrifugó nuevamente a 2 500 g durante 2 minutos. El sedimento que se obtuvo se resuspendió en 400 µL de solución de lavado 1 y se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL. Este paso de lavado se repitió tres veces en el equipo semiautomatizado miniMAG. Una vez que se aspiró la última solución de lavado, se añadió 15 µL de tampón de dilución, y se incubó durante 5 min a 60 °C. Finalmente, la sílica magnética se inmovilizó mientras se separaron los 15µL de tampón de dilución que contenían los ácidos nucleicos, y se conservó a -20 °C (bioMérieux, Francia).

III.5. Validez y Seguridad diagnóstica de los protocolos de PCR y PCR anidada a partir de muestras de LCR, sangre y orina

III.5.1. Evaluación de los protocolos de PCR y PCR anidada en muestras de LCR, sangre y orina.

III.5.1.1. Extracción del ADN a partir de las muestras de LCR, sangre y orina

La extracción de ADN para cada muestra biológica, estuvo en dependencia de los resultados obtenidos luego de la evaluación de los sistemas simulados según se explicó en el acápite III.4.1.

III.5.1.2. Evaluación de los protocolos de PCR y PCR anidada

La utilización de muestras de LCR provenientes de pacientes VIH-sida y personas no infectadas con el VIH, permitió determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de los tres protocolos de PCR y PCR anidada para el gen B1 de *T. gondii* (B22-B23, S1-AS1/S2-AS2 y T1-T4/T2-T3), lo cual definió el protocolo ideal, para determinar la utilidad de muestras de sangre y orina de pacientes VIH-sida en el diagnóstico molecular de la ET. De esta forma, teniendo en cuenta las condiciones optimizadas para cada protocolo de PCR y PCR anidada, previa extracción del ADN según el método adecuado para cada muestra biológica, se procedió a la amplificación del ADN genómico presente en cada una de ellas según el o los protocolos definidos para evaluar.

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ L, con las concentraciones seleccionadas como óptimas para cada protocolo. La concentración de tampón de amplificación (1x) y dNTP (200 μ M) fueron las recomendadas por la literatura (Steffen, 1999). En cada ensayo se utilizó un control positivo (100 ng ADN cepa RH de *T. gondii*) y se consideró positivo cuando se visualizó una banda de amplificación de la talla esperada. En el caso del PCR simple y primera reacción del PCR anidada, se incluyeron dos controles negativos en cada experimento. En uno, la mezcla de la reacción contuvo H₂O destilada estéril en lugar del ADN molde de *T. gondii* y el otro 5 μ L del producto obtenido para el control negativo de la extracción del ADN (frasco con agua destilada estéril al que se le realiza todo el procedimiento de extracción en las mismas condiciones que a las muestras clínicas). Para los protocolos de PCR anidada, la segunda reacción de amplificación incluyó tres controles negativos en cada experimento. El primero contuvo H₂O destilada estéril en lugar del ADN molde de *T. gondii*, el otro, 1 μ L del control

negativo de la primera amplificación y el tercero, 1 μ L del control negativo de la extracción del ADN proveniente de la primera amplificación.

La amplificación del ADN se realizó según las condiciones óptimas de cada protocolo, con los perfiles de amplificación descritos en la literatura (acápite III.3.1). La visualización de los productos de amplificación se realizó en una corrida electroforética (150V) en gel de agarosa preparado 2 % (Promega, EEUU), según las condiciones de corrida descritas en el acápite III.3.2. Para las muestras positivas se repitió el proceso de amplificación, con el fin de confirmar su positividad y a las muestras negativas se le realizó un control de inhibición para descartar la presencia de inhibidores de la PCR, el cual consiste en añadir a la mezcla de la PCR 100 ng del ADN de *T. gondii* (Cepa RH), además de la muestra a analizar,

III.5.1.3. Validez y Seguridad diagnóstica de los protocolos de PCR y PCR anidada

La clasificación de cada paciente según la presencia o no de una NTx, se realizó teniendo en cuenta los criterios establecidos por el CDC (1993) para la presencia o no de la enfermedad, como fue definido en el acápite III.1.3. Posteriormente, los resultados de la evaluación de los distintos protocolos se analizaron a través de una tabla de contingencia de 2x2 (Altman y Bland, 1994 a,b), donde los criterios del CDC (1993) se utilizaron como prueba de referencia. De esta forma se determinó la sensibilidad y especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada protocolo evaluado.

Para comparar los resultados de validez y seguridad diagnóstica en muestras de LCR, se realizó un análisis de proporciones independientes según el estadístico Z. Los resultados generales obtenidos para las muestras de sangre y orina tomadas en paralelo, se analizaron como proporciones emparejadas utilizando la prueba de McNemar, mientras los Intervalos de Confianza (IC) fueron empleados para comparar los resultados independientes. Todos los cálculos fueron realizados en el programa Epidat, versión 3.1 y se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor que 0,05 o teniendo en cuenta los valores de los intervalos de confianza.

III.6. Identificación de los genotipos de *T. gondii* en cepas de referencia y muestras clínicas, mediante la técnica de PCR-RFLP

III.6.1. Amplificación de los fragmentos específicos para los marcadores B1, SAG2 y CB21 utilizando protocolos de PCR y PCR anidada

La identificación de los genotipos de *T. gondii* a partir de cepas de referencia y muestras clínicas de pacientes con NTx, se realizó según la técnica de PCR-RFLP para los marcadores B1, SAG2 y CB21. De esta forma, se utilizaron cebadores específicos para amplificar las diferentes regiones genómicas de todas las cepas de referencia descritas en el acápite III.1.1 y muestras de LCR, sangre y orina correspondientes a pacientes con NTx. Para el gen B1 se emplearon los cebadores S1-AS1/S2-AS2 (PCR anidada) (tabla 1) así como las condiciones optimizadas para estos cebadores. Para el gen SAG2, se emplearon los cebadores F4-R4/F-R2 (PCR anidada para la amplificación de un fragmento del extremo 5' del gen) y F3-R3/F2-R (PCR anidada para la amplificación de un fragmento del extremo 3' del gen), cuya secuencia, referencia y talla de las bandas amplificadas aparecen en la tabla 2. De igual forma, la tabla 2 muestra las características de los cebadores CB21F-CB21R (PCR), seleccionados para amplificar el marcador CB21.

Teniendo en cuenta que los marcadores SAG2 y CB21 se emplean por primera vez en nuestro laboratorio, se realizó una normalización de los componentes de la reacción (Taq ADN polimerasa, MgCl₂ y cebadores) previo al proceso de amplificación. Dicha normalización siguió las mismas consideraciones descritas para los tres protocolos empleados en la evaluación diagnóstica en muestras de LCR, sangre y orina, descritas en el acápite III.3.2.

Tabla 2. Descripción de los marcadores utilizados para la caracterización genética de *T. gondii*.

Nombre del Marcador	Cebadores externos	Cebadores internos	Talla Final del fragmento amplificado (pb)	Referencias
5' SAG2	F4:GCTACCTCGAACAGG AACAC	F:GAAATGTTTCAGGTTG CTGC	241	Howe <i>et al.</i> , 1997
	R4:GCATCAACAGTCTTCG TTGC	R2:GCAAGAGCGAACTT GAACAC		
3' SAG 2	F3:TCTGTTCTCCGAAGTG ACTCC	F2:ATTCTCATGCCTCCG CTTC	221	Howe <i>et al.</i> , 1997
	R3:TCAAAGCGTGCATTAT CGC	R:AACGTTTCACGAAGG CACAC		
CB21	CB21F:CCAGGTGTTTCGA TATTGAT	CB21R:GCCTGTGTGGTG TTCGAATC	503	Fux <i>et al.</i> , 2003

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L según las concentraciones óptimas para cada protocolo y los perfiles de amplificación, cuyas referencias aparecen en las tablas 1 y 2. La concentración del tampón de amplificación (1 x) y dNTP (200 μ M), fueron las recomendadas en la literatura (Steffen, 1999). Para la primera amplificación de cada protocolo, se utilizó un control negativo donde la mezcla de la reacción contuvo H₂O destilada estéril en lugar del ADN molde de *T. gondii*, mientras la segunda reacción de amplificación de los protocolos de PCR anidada, incluyó este y un segundo control negativo donde se utilizó como molde 1 μ L del control negativo de la primera amplificación.

Para la evaluación de las muestras clínicas, se utilizaron controles positivos (100 ng ADN de al menos una de las cepas de referencia genotipo I, II y III) y se consideró positivo cuando se

visualizó una banda de amplificación a la talla esperada para cada una de las reacciones de PCR y PCR anidada. Dicha visualización, se realizó mediante una corrida electroforética (150 V) en gel de agarosa 2 % (Promega, EEUU), según las condiciones de corrida descritas en el acápite III.2.3.

III.6.2. Purificación de los fragmentos amplificados para los marcadores B1, SAG2 y CB21

La purificación de los productos de amplificación para los marcadores B1, SAG2 y CB21, correspondientes a cada cepa de referencia y muestra clínica, se realizó como se describe a continuación: para cada caso se añadieron dos volúmenes de agua, 1/10 de volumen de acetato de sodio (3 M pH=5,4) y dos volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se homogenizó y se mantuvo en reposo a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 1 000 g durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante, se lavó con etanol 80 %, y se dejó secar a temperatura ambiente. Todos los productos de PCR y PCR anidada purificados, se resuspendieron en 20 µL de agua bidestilada estéril. La calidad de la precipitación se comprobó a través de una electroforesis en gel de agarosa preparado al 2 %, según las condiciones de corrida descritas en el acápite III.3.2.

III.6.3. Digestión de los fragmentos purificados.

Se realizó la digestión enzimática (RFLP) de los fragmentos purificados para cada una de las muestras, a través del empleo de enzimas específicas, las cuales se listan en la tabla 3. Se prepararon mezclas independientes en cada caso compuestas por 6 µL de producto de PCR o PCR anidada purificado, 2 µL de tampón de amplificación de la enzima y 2,5 U de enzima, en un volumen final de 20 µL. Todas las mezclas se colocaron en un baño termostataado durante tres horas a 37 °C, según las condiciones recomendadas por el fabricante. Luego de la digestión enzimática, se realizó una corrida electroforética de todos los productos digeridos en un gel de agarosa 3% de alta resolución (Promega, EEUU) a 50 V con las condiciones de corrida descritas en el acápite III.2.3. Finalmente, se realizó la identificación de los genotipos del parásito tomando como referencia los patrones obtenidos para las ocho cepas de referencia empleadas, las cuales se describieron en el acápite III.2.1.

La enzima *PmI* (utilizada para el marcador B1) tiene un único sitio de corte en el fragmento amplificado para este gen, presente solo para las cepas avirulentas del parásito (Tipo II y III). La digestión de los productos de amplificación del extremo 3' del gen SAG2 diferencia el genotipo II (presencia de un único sitio de corte para la enzima *HhaI*), y quedan agrupadas las cepas Tipo I y III. La digestión del extremo 5' del gen SAG2 permite diferenciar las cepas correspondientes al genotipo III (presencia de un único sitio de corte para la enzima *Sau3A1*), mientras los genotipos I y II quedan agrupados. Para el marcador CB21 la utilización de la enzima *HaeIII* permite distinguir la existencia de tres sitios de corte diferentes dentro de cada uno de los productos de amplificación correspondientes a las cepas tipo I,II y III, lo cual facilita la diferenciación de los tres genotipos del parásito.

De esta forma, la digestión de los productos de amplificación correspondientes al gen B1, permite la diferenciación de las cepas tipo I de aquellas correspondientes a los genotipos II y III, las cuales no son digeridas. Sin embargo, el análisis conjunto de los patrones de digestión para los dos extremos del gen SAG2 y el marcador CB21, permiten la diferenciación de los tres genotipos del parásito (tabla 3). Para finalizar, un análisis de los patrones obtenidos por los tres marcadores, permite definir los genotipos en los que se agrupan las diferentes muestras clínicas evaluadas. Cuando se encuentran patrones diferentes para los marcadores utilizados se considera que las cepas corresponden a un genotipo compartido, mientras se denomina genotipo no definido claramente, cuando a través de uno de los marcadores no se define claramente un genotipo.

Tabla 3. Enzimas de restricción utilizadas para cada marcador (B1, SAG2, CB21) y capacidad de diferenciación de cada una de estas.

Nombre del Marcador	Enzima de restricción	Diferenciación del genotipo
B1	<i>PmlI</i>	I/II-III
5' SAG2	<i>Sau3AI</i>	I-II/III
3' SAG 2	<i>HhaI</i>	I-III/II
CB21	<i>HaeIII</i>	I/II/III

III.7. Consideraciones éticas

A todos los pacientes involucrados en la investigación se les ofreció participar de manera voluntaria y con previa información de aspectos relacionados con el estudio, lo cual fue informado de forma oral y a su vez se solicitó el consentimiento por escrito, que fue firmado y fechado por cada paciente o familiar (Anexo 1). El protocolo se aprobó por el comité de ética del IPK y cada una de las muestras se envió al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología del IPK donde se conservó a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

IV.RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.I. Universo y clasificación de los pacientes

El estudio incluyó un total de 254 pacientes VIH-sida con manifestaciones neurológicas, admitidos en el IPK, Habana Cuba; de los cuales fueron obtenidas muestras de LCR, sangre y orina en períodos diferentes desde septiembre del 2006 a septiembre del 2010. Durante una primera etapa de trabajo, se obtuvieron muestras de LCR correspondientes a 147 de los 254 pacientes con VIH-sida, mientras para los 107 pacientes restantes se recojieron en paralelo muestras de sangre y orina. Luego de la revisión de sus historias clínicas y teniendo en cuenta los criterios del CDC (1993), 59/147 pacientes de los cuales se obtuvieron muestras de LCR, fueron clasificados con NTx y 88/147 pacientes fueron clasificados sin NTx. De igual forma, para los 107 pacientes restantes, de los cuales se colectaron muestras de sangre y orina en paralelo, 61 de estos fueron clasificados con NTx, mientras 46 correspondieron a pacientes sin NTx.

Adicionalmente, se trabajó con 60 muestras de LCR de la seroraquioteca de LABCEL, provenientes de personas no infectadas con el VIH, quienes presentaron enfermedades del SNC no asociadas al sida. Ninguno de estos pacientes tuvo sospecha clínica de NTx, según los criterios establecidos por el CDC y no recibieron tratamiento empírico para *T. gondii* sino para el resto de las patologías específicas que fueron diagnosticadas. De esta forma, los 60 pacientes fueron clasificados sin NTx y quedaron agrupados junto al resto de los pacientes con VIH-sida, de los cuales se obtuvieron muestras de LCR y que fueron clasificados anteriormente sin NTx (88). La unión de ambos grupos conformó un total de 148 muestras de LCR correspondientes a pacientes con y sin VIH-sida que no cumplieron los criterios del CDC (1993) para una NTx.

IV.2. Normalización de los protocolos de PCR y PCR anidada para cada juego de cebadores

Para proceder a la normalización de cada uno de los protocolos, se determinaron las condiciones óptimas de algunos de los componentes de la mezcla de reacción (concentración de cebadores, $MgCl_2$ y Taq ADN polimerasa). La figura 6 muestra el patrón de amplificación en cada caso según los diferentes protocolos; las concentraciones óptimas aparecen señaladas con flechas. Los amplicones correspondieron a las tallas esperadas para cada caso y la eficiencia de la amplificación fue similar para todos los protocolos. En la tabla 4 se resumen las concentraciones óptimas para cada caso.

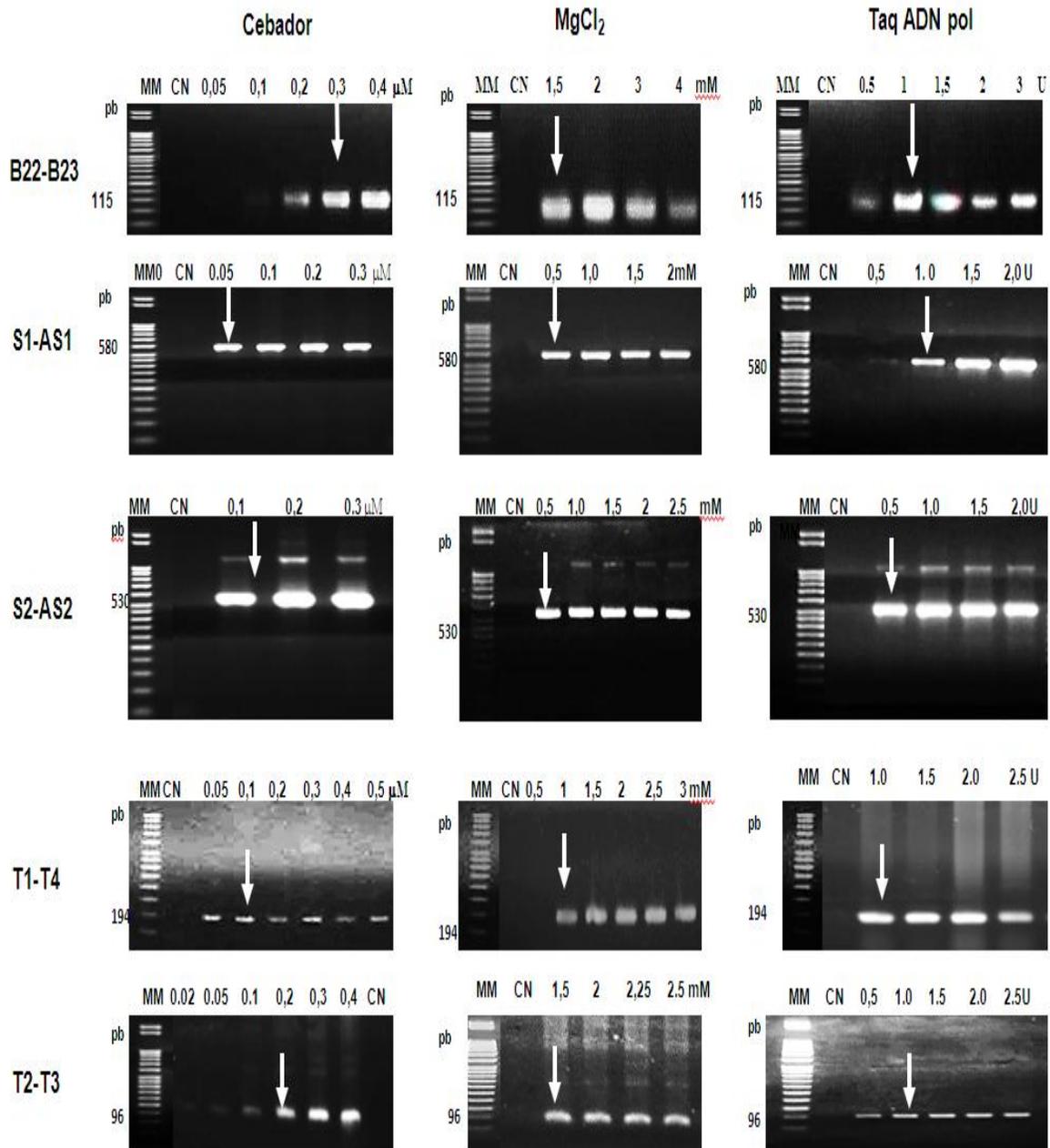


Figura 6. Patrón de amplificación al variar la concentración de los componentes de la primera y segunda reacción de amplificación para cada protocolo, utilizando la cepa RH de *T. gondii*. MM: Marcador de Peso Molecular 50 pb y 100 pb (Amersham, EEUU); CN: Control Negativo. En la parte superior de cada figura se indican las variaciones en concentración ensayadas para los cebadores, MgCl₂ y Taq ADN polimerasa. Las flechas indican las concentraciones óptimas.

Tabla 4. Concentraciones óptimas de los componentes de la PCR y PCR anidada.

Protocolos		Concentraciones óptimas
B22-B23	Primera reacción	B22-B23: 0,3 μ M MgCl ₂ : 1,5 mM Taq ADN Polimerasa: 1U
	Primera reacción	S1-AS1: 0,05 μ M MgCl ₂ : 0,5 mM Taq ADN Polimerasa: 1 U
S1-AS1/S2-AS2	Segunda reacción	S2-AS2: 0,1 μ M MgCl ₂ : 0,5 mM Taq ADN Polimerasa: 0,5 U
	Primera reacción	T1-T4: 0,1 μ M MgCl ₂ : 1 mM Taq ADN Polimerasa: 1U
T1-T4/T2-T3	Segunda reacción	T2-T3: 0,2 μ M MgCl ₂ : 1,5 mM Taq ADN Polimerasa: 1 U

La reproducibilidad se confirmó según las condiciones normalizadas para cada protocolo en tres días, empleando dos réplicas para cada uno. No se encontraron diferencias entre los patrones de amplificación luego de la primera reacción de amplificación (Figura 7).

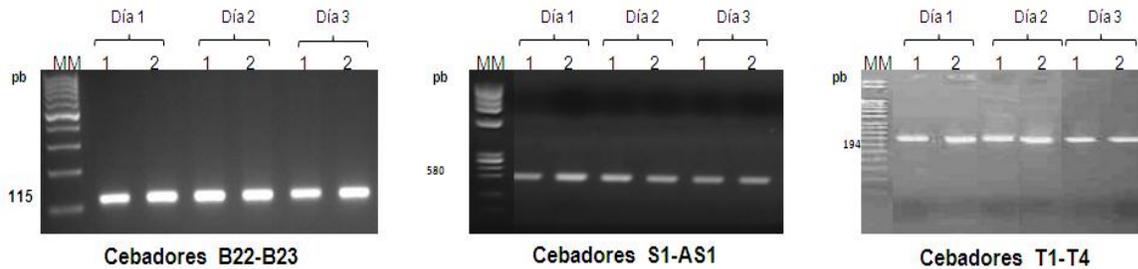


Figura 7. Reproducibilidad de cada protocolo, luego de la primera amplificación en tres días, utilizando dos réplicas cada día. MM: Marcador de Peso Molecular 50 pb y 100 pb (Amersham, EEUU). En la parte superior de cada figura se indican los días y las réplicas realizadas.

La sensibilidad analítica de la PCR-B1 se evaluó a partir de diluciones del ADN de la cepa RH de *T. gondii*. Para cada protocolo fue posible detectar hasta 0,1 pg, última concentración en la que se observó la banda esperada en cada caso. La figura 8 muestra los patrones de amplificación para los cebadores B22-B23, S1-AS1 y T1-T4.

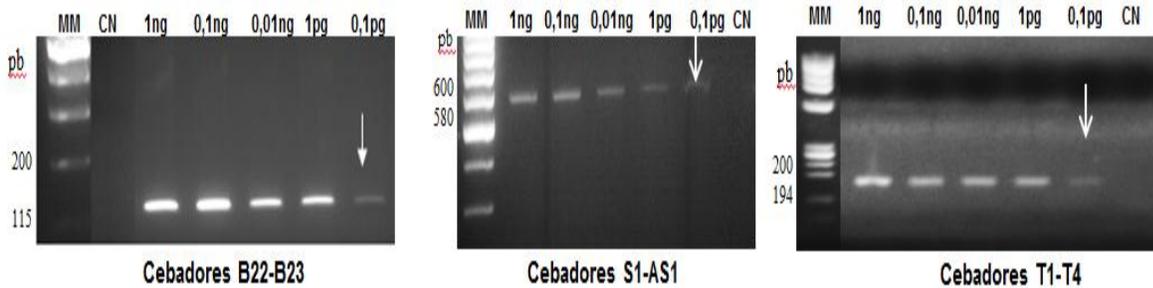


Figura 8. Patrón de amplificación de la PCR y primera reacción de amplificación de los protocolos de PCR anidada al variar la concentración del ADN de *T. gondii* (cepa RH). MM: Marcador de Peso Molecular 50 pb y 100 pb (Amersham, EEUU), CN: Control negativo. En la parte superior de cada figura se indican las concentraciones de ADN ensayadas, mientras las flechas indican la mínima concentración de ADN detectada por cada protocolo.

El estudio de los cebadores mediante la herramienta BLAST, definió la especificidad de cada uno de ellos. Sus secuencias solo hibridizan totalmente con regiones específicas del gen B1 de *T. gondii*. Las similitudes parciales con secuencias de otros microorganismos fueron mínimas y no ubicadas en el extremo 3' del hidroxilo libre de la secuencia de los cebadores. Adicionalmente, la utilización como molde para las reacciones de PCR y PCR anidada, del ADN correspondiente a otros parásitos, bacterias, virus y hongos, referidos con anterioridad (acápite III.3.5), no mostró patrón de amplificación para las bandas específicas, las cuales se visualizaron solo al emplear ADN de *T. gondii* correspondiente a cada una de las cepas de referencia empleadas en este trabajo.

IV.3. Comparación de métodos de extracción de ADN para muestras de LCR, sangre y orina

Como se observa en las Figuras 9, 10 y 11 todos los protocolos de extracción de ADN permitieron obtener las bandas esperadas en cada caso, y mostraron diferente eficacia. Los resultados evidencian que, en términos de sensibilidad analítica, algunos métodos convencionales pueden ser tan eficientes como los sistemas comerciales.

Para el LCR (Figura 9), la sensibilidad de los protocolos convencionales no fue similar. Al utilizar el método de Fenol-Cloroformo se detectó solo hasta 117 células (taquizoitos), mientras el método de lisis y centrifugación logró detectar hasta dos células. El sistema comercial MiniMAG sí detectó hasta una célula.

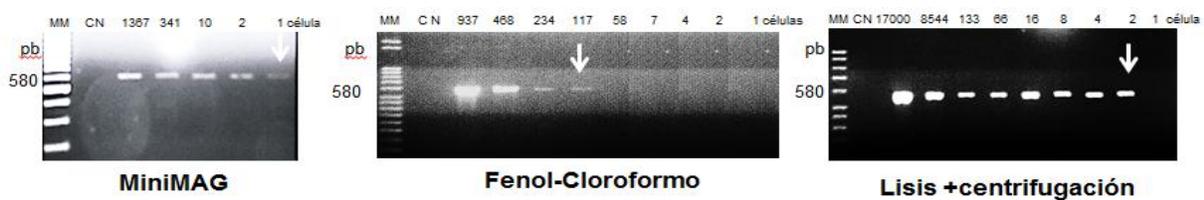


Figura 9. Patrón de amplificación obtenido al variar el número de células de *T. gondii* en LCR, según la primera reacción del protocolo S1-AS1/S2-AS2 MM: Marcador de Peso Molecular 100 pb DNA ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), CN: Control negativo. El número aproximado de parásitos se indica en la parte superior de cada carril y en la parte inferior se refieren los métodos de extracción empleados. Las flechas indican la menor cantidad de parásitos detectada por cada método.

En el caso de la sangre, los dos protocolos (Fenol-Cloroformo y MiniMAG), permitieron obtener las bandas esperadas en cada caso, sin apreciarse diferencias notables en cuanto a sensibilidad analítica. El método de fenol-cloroformo fue capaz de detectar hasta dos células, mientras el sistema MiniMAG detectó hasta una célula de *T. gondii* (Figura 10).

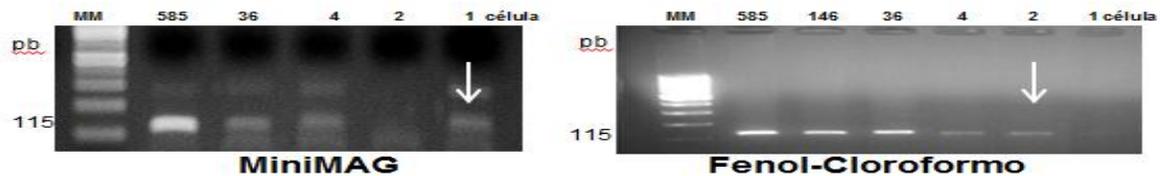


Figura 10. Patrón de amplificación al variar el número de células de *T. gondii* en sangre humana para el protocolo B22-B23. MM: Marcador de Peso Molecular 100 pb, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), CN: Control negativo. En la zona superior de cada carril se indica el número aproximado de parásitos, mientras en la inferior aparecen los métodos de extracción empleados. Las flechas indican la menor cantidad de parásitos detectada.

Para las muestras de orina, el límite de detección del sistema comercial MiniMAG fue superior. El método de lisis y centrifugación permitió detectar el ADN correspondiente a cinco células (Figura 11), mientras el sistema comercial MiniMAG detectó el ADN correspondiente a una célula.



Figura 11. Patrón de amplificación al variar la cantidad de parásitos en orina, según las condiciones optimizadas para el protocolo B22-B23. MM: Marcador de Peso Molecular 100 pb (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), CN: control negativo. En la zona superior de cada carril se indica el número aproximado de parásitos, mientras en la inferior aparecen los métodos de extracción utilizados. Las flechas indican la menor cantidad de parásitos detectada.

La evaluación de todos los sistemas simulados para las diferentes muestras clínicas, permitió definir el método ideal para la extracción de ADN de *T. gondii* ideal. De esta forma, se seleccionó para la extracción del ADN de las muestras clínicas, en cada caso que fuera posible, el método convencional de mayor sensibilidad analítica. Un resumen de la eficiencia de cada método (menor cantidad de parásitos detectada), y nuestras recomendaciones para su utilización preferencial en cada fluido, se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen de la eficiencia de los métodos de extracción de ADN según cada fluido evaluado.

Fluido	Fenol-cloroformo	Lisis y centrifugación	MiniMAG	Método recomendado
LCR	117 taquizoitos	2 taquizoitos	1 taquizoitos	Lisis y centrifugación
Sangre	2 taquizoitos	-	1 taquizoitos	Fenol-cloroformo
Orina	-	5 taquizoitos	1 taquizoitos	MiniMAG

IV.4. Validez y seguridad diagnóstica de la PCR y PCR anidada a partir de muestras de LCR, sangre y orina

Para cada una de las muestras clínicas, se procedió a la extracción del ADN (según protocolo recomendado en cada caso), amplificación de fragmentos específicos, análisis en gel de agarosa y evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica según se definió en el acápite III.5. La figura 12 muestra los patrones de amplificación para algunas de las muestras de LCR con resultados positivos por los distintos protocolos. Bandas de intensidad similar se obtuvieron también para muestras de sangre y orina.

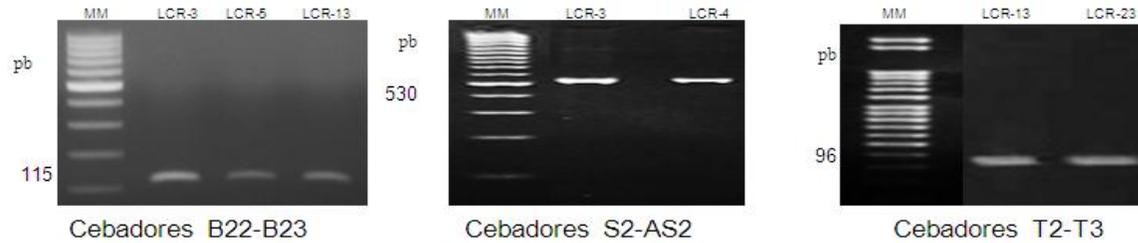


Figura 12. Patrón de amplificación de diferentes muestras de LCR, al emplear los tres protocolos evaluados. MM: Marcador de Peso Molecular 50 y 100pb (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). En la parte superior de la figuras se indican los códigos correspondientes a algunas de las muestras analizadas, mientras la zona inferior muestra los cebadores empleados en cada caso.

La comparación de los tres protocolos de PCR empleando muestras de LCR definió su validez y seguridad diagnóstica. Un total de 52/59 muestras de LCR de pacientes con ET resultaron positivas por al menos uno de los tres protocolos evaluados. No obstante, la sensibilidad diagnóstica de cada uno fue diferente. El protocolo B22-B23 mostró la mejor sensibilidad diagnóstica (72,41 %) seguido de S1-AS1/S2-AS2, el cual detectó 68,97 % de los casos definidos con ET. Para T1-T4/T2-T3 solo se observó amplificación en 50,85 % de los casos con ET. No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de sensibilidad diagnóstica para los protocolos B22-B23 y S1-AS1/S2-AS2 ($P=0,83$) así como para S1-AS1/S2-AS2 y T1-T4/T2-T3 ($p=0,07$), mientras si fueron evidentes para B22-B23 y T1-T4/T2-T3 ($p=0,02$). De forma general, para seis casos no ocurrió amplificación por ninguno de estos protocolos. Para estas muestras, así como el resto de las muestras negativas se realizó un control de inhibición y se confirmó la ausencia de inhibidores de la reacción.

Respecto a la especificidad diagnóstica, todos los protocolos mostraron especificidades superiores al 95 % y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p=0,36$ para B22-B23 y S1-AS1/S2-AS2; $p=0,33$ para B22-B23 y T1-T4/T2-T3; $p=0,71$ para S1-AS1/S2-AS2 y T1-T4/T2-T3). Todas las muestras de personas no infectadas con VIH, quienes presentaron otras enfermedades neurológicas no asociadas al sida (60)

resultaron negativos por los tres protocolos, mientras 12 pacientes con VIH-sida, para los cuales no se sospechó una ET, resultaron positivos por al menos uno de los tres protocolos. El VPP resultó de 85,71 % para B22-B23, y alcanzó valores de 93,02 % para S1-AS1/S2-AS2, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($p=0,43$), lo cual tampoco fue evidente para B22-B23 y T1-T4/T2-T3 ($p=0,71$), ni para S1-AS1/S2-AS2 y T1-T4/T2-T3 ($p = 0,92$).

Para los VPN, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las comparaciones realizadas (B22-B23 y S1-AS1/S2-AS2 mostraron una $p=0,85$; B22-B23 y T1-T4/T2-T3 evidenciaron una $p=0,11$ y para S1-AS1/S2-AS2 y T1-T4/T2-T3 se obtuvo una $p=0,23$). Un resumen de los resultados de validez y seguridad diagnóstica para los tres protocolos evaluados empleando muestras de LCR, se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Validez y seguridad diagnóstica de tres protocolos de PCR (B22-B23) y PCR anidada (T1-T4/T2-T3 y S1-AS1/S2-AS2), evaluados en muestras de LCR provenientes de pacientes con y sin VIH-sida: sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica y valores predictivos.

Protocolo	Número de muestras		Total	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
	Con NTx	Sin NTx					
B22-B23	58	148	206	72,41	95,27	85,71	89,81
S1-AS1/S2-AS2	58	142	200	68,97	97,89	93,02	88,54
T1-T4/T2-T3	59	148	207	50,85	97,97	90,91	83,33

Para B22-B23, aún con la menor especificidad diagnóstica (95,27 %), los valores de sensibilidad diagnóstica, así como su fácil ejecución (solo una reacción de amplificación), sugieren su utilización preferencial para establecer el diagnóstico de ET. De forma adicional, el protocolo S1-AS1/S2-AS2 pudiera ser un elemento complementario de apoyo en el diagnóstico de rutina de esta enfermedad.

Una vez determinado el protocolo con mejores resultados de sensibilidad diagnóstica (B22-B23), se procedió a su evaluación en 107 muestras de sangre y orina. Los resultados obtenidos luego del análisis de muestras emparejadas evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

Al investigar la presencia de ADN de *T. gondii* a partir de las muestras de sangre, 30/61 (49,18 %) pacientes con ET resultaron positivos. Para las muestras de orina, se encontró positividad solo en 13/61 (21,31 %) muestras de pacientes con ET, evidenciando diferencias estadísticamente significativas en relación a la evaluación de muestras de sangre (IC: 10,22-32,41). Con relación a la especificidad diagnóstica, la utilización de muestras de sangre mostró solo 80,43 %, mientras 100 % se obtuvo para muestras de orina, lo cual demostró diferencias estadísticamente significativas (IC: 98,91-100).

Para el VPP en muestras de sangre y orina se encontró 76,92 % y 100 % respectivamente, existiendo diferencias estadísticamente significativas (IC: 96,15-100). Para el VPN, se obtuvieron valores inferiores en ambos fluidos (54,41 % para muestras de sangre y 48,94 % para muestras de orina), y para este caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (IC: 38,30-59,57). La tabla 7 resume los resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos obtenidos para estos dos fluidos.

Tabla 7. Validez y seguridad diagnóstica de la PCR (B22-B23) para muestras de sangre y orina provenientes de pacientes con VIH-sida: sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica y valores predictivos.

Tipo de muestra	Número de muestras		Total	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP %	VPN %
	Con NTx	Sin NTx					
Sangre	61	46	107	49,18	80,43	76,92	54,41
Orina	61	46	107	21,31	100	100	48,94

De esta forma, la evaluación adicional de la validez y seguridad diagnóstica de muestras de sangre y orina, permitió definir la sangre como fluido biológico adicional al LCR, para detectar el ADN de *T. gondii* en pacientes sida con ET. Sin embargo, la especificidad diagnóstica de este fluido es significativamente inferior en relación al empleo de muestras de orina.

IV.5. Aplicación de la técnica de PCR-RFLP para la identificación de los genotipos de *T. gondii* en cepas de referencia y muestras clínicas

Con el objetivo de emplear tres marcadores moleculares que permiten distinguir la variabilidad genética de *T. gondii* y teniendo en cuenta que dos de estos se utilizan por primera vez en nuestro laboratorio, se normalizaron las condiciones de la PCR y PCR anidada para los marcadores SAG-2 y CB21. La tabla 8 muestra las condiciones normalizadas para cada protocolo.

Tabla 8. Concentraciones óptimas para de los componentes de la primera y segunda reacción de amplificación para los marcadores SAG2 (extremo 5' y 3') y CB21.

Marcador	Reacción	Concentraciones óptimas
SAG2 5'	Primera	F4-R4: 0,3µM
		MgCl2: 2mM
	Segunda	Taq ADN Polimerasa: 1,5U
		F-R2: 0,2µM
SAG2 3'	Primera	MgCl2: 1mM
		Taq ADN Polimerasa: 1,5U
	Segunda	F3-R3: 0,05µM
		MgCl2: 1mM
CB21	Primera	Taq ADN Polimerasa: 1,5U
		F2-R: 0,3µM
	Segunda	MgCl2: 1mM
		Taq ADN Polimerasa: 1,5U
CB21	Primera	CB21f-CB21R: 0,1µM
		MgCl2: 1mM
		Taq ADN Polimerasa: 0,5U

Posteriormente, se procedió a la amplificación de los fragmentos específicos utilizando la técnica de PCR y PCR anidada para los tres marcadores moleculares. Para las cepas de referencia, la amplificación de los fragmentos específicos según cada marcador, permitió obtener bandas intensas y adecuadas (únicas) para la posterior digestión con las enzimas de restricción. La figura 13 muestra el perfil de amplificación para los tres marcadores al emplear el ADN de ocho cepas de referencia de *T. gondii*.

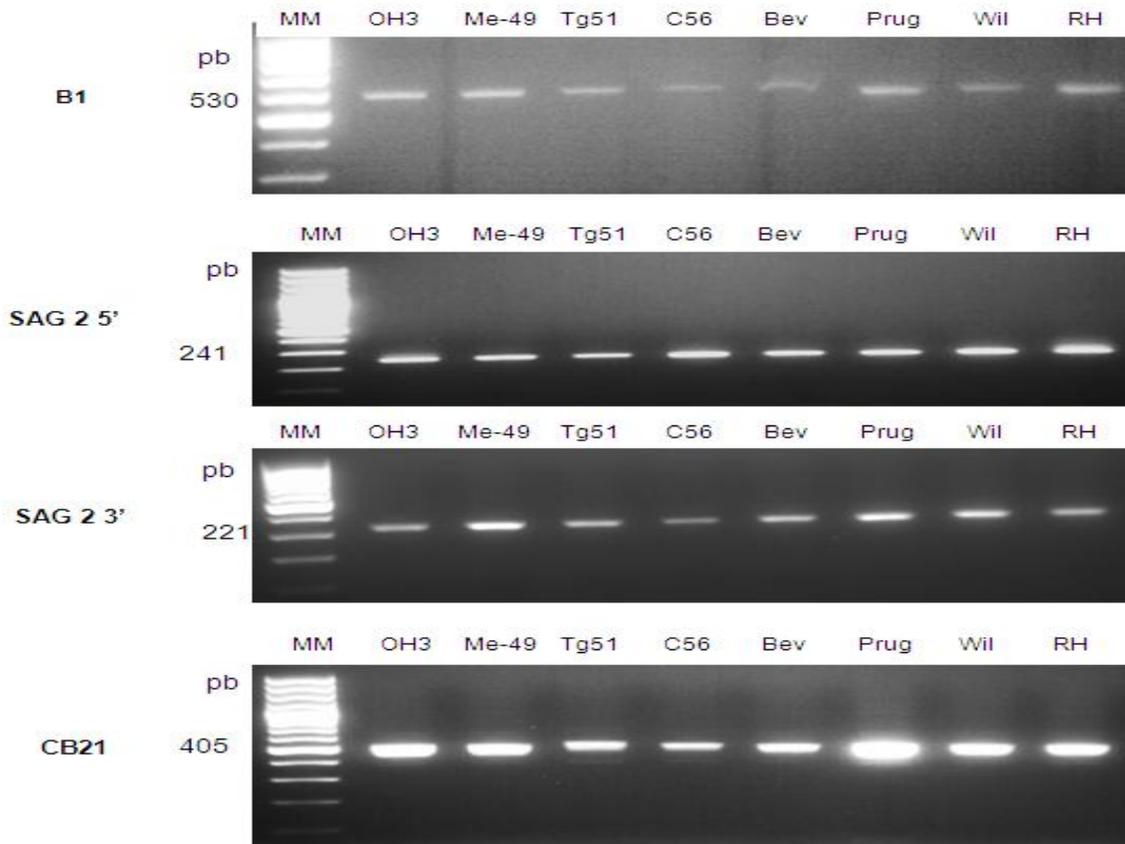


Figura 13. Patrón de amplificación al utilizar la técnica de PCR y PCR anidada para 8 cepas de referencia de *T. gondii*, empleando los marcadores B1, SAG 2 y CB21. MM: Marcador de Peso Molecular 100 pb (Amersham, EEUU). En la parte superior de cada figura se indican las cepas de referencia empleadas: OH3 (tipo I), Me49 (tipo II), Tg51 (tipo III), C56 (tipo III), Bev (tipo II), Prug (tipo II), Wil (tipo II), RH (tipo I) mientras en el extremo izquierdo aparecen los marcadores utilizados.

En el caso de las muestras clínicas, no fue posible obtener bandas de amplificación para todos los marcadores. De esta forma, la utilización del marcador B1 permitió amplificar solo 40/58 muestras de LCR y 6/61 muestras de sangre. Para el extremo 5' del gen SAG2, las bandas de amplificación se visualizaron en 21/58 y 5/61 muestras de LCR y sangre, respectivamente. En forma similar, se amplificó el extremo 3' del gen SAG2 para 24/58 muestras de LCR y solo 7/61 muestras de sangre. Ninguna de las muestras de orina de pacientes con ET mostró un patrón positivo a través de estos marcadores (B1 y SAG 2) y no se logró la amplificación del marcador CB21 para las diferentes muestras clínicas evaluadas. La figura 14 muestra una representación de algunas de las muestras de LCR con patrones positivos para los marcadores B1 y SAG 2.

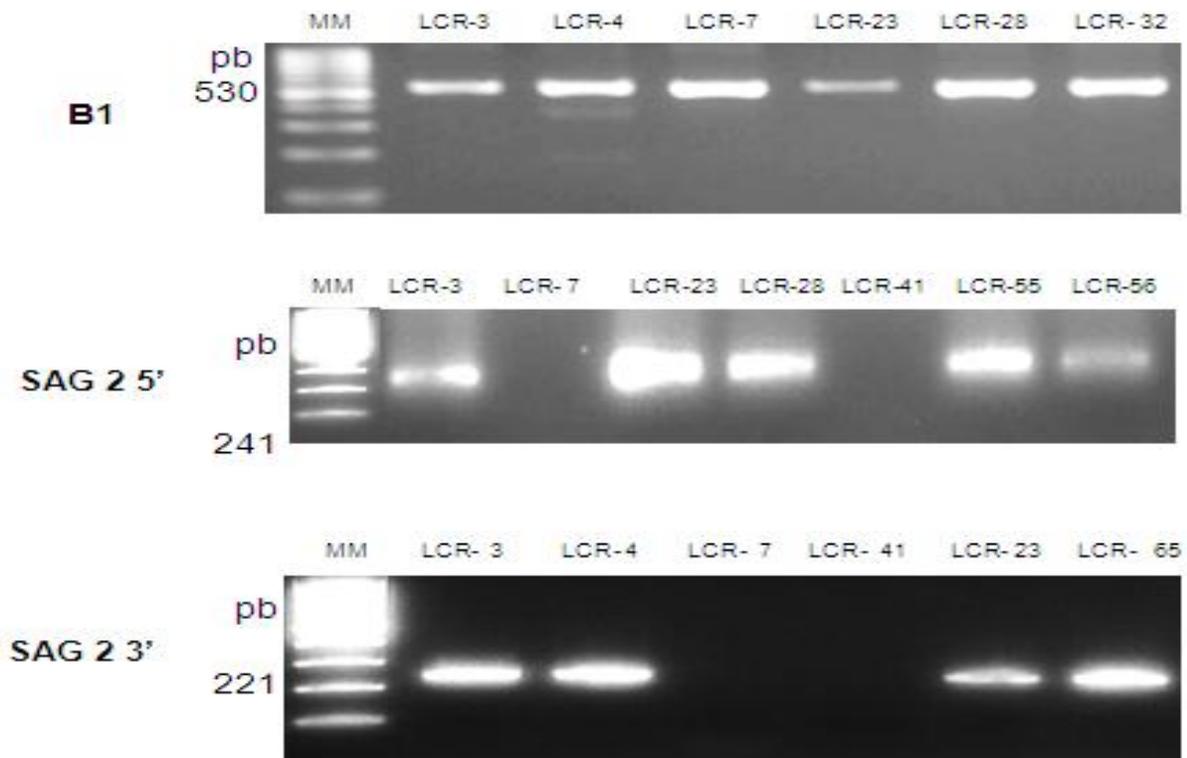


Figura 14. Patrón de amplificación para los marcadores B1 y SAG 2 en algunas muestras de LCR. Marcador de Peso Molecular 100 pb (Amersham, EEUU). En la parte superior se indica el código de las muestras amplificadas mientras en el extremo izquierdo aparecen los marcadores utilizados.

La digestión enzimática de las bandas amplificadas para las cepas de referencia y muestras clínicas, permitió identificar los genotipos del parásito. De esta forma el empleo del marcador B1 diferenció las cepas OH3 y RH (ambas tipo I) de las cepas Me-49, Tg-51, C56, Bev, Prug y Wil (todas genotipo II o III). El análisis conjunto de los dos extremos del gen SAG2 caracterizó todas las cepas en sus respectivos genotipos exceptuando a Tg51 (extremo 5') para la cual, se encontró un patrón correspondiente al genotipo II en lugar de III, lo cual se refiere en otros trabajos para esta cepa (Sibley y Boothroyd, 1992). La utilización del marcador CB21 permitió diferenciar sin ambigüedad los tres genotipos del parásito. El patrón de digestión para todas las cepas de referencia según cada marcador se muestra en la figura 15.

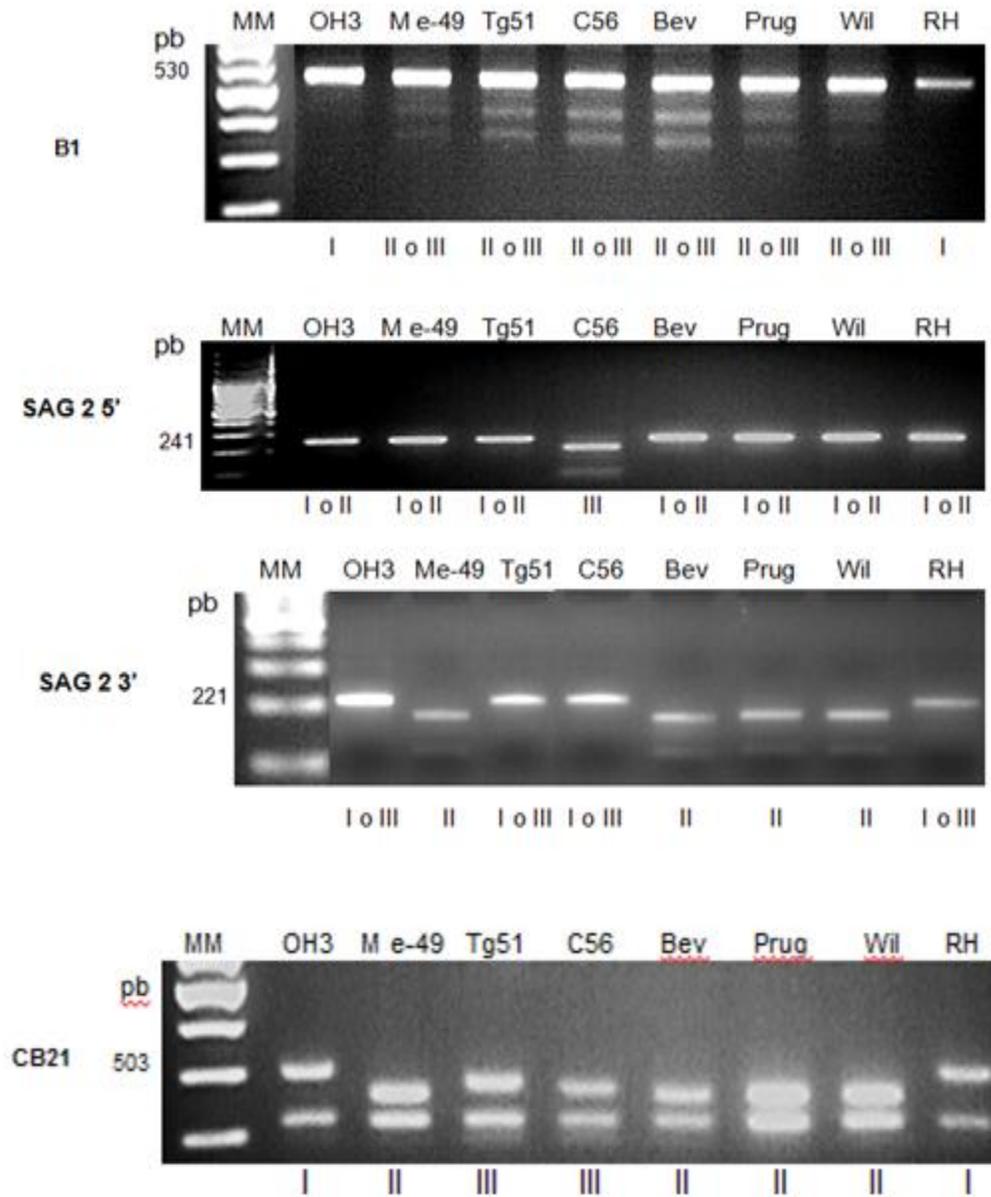


Figura 15. Patrón de digestión al utilizar la técnica de RFLP para 8 cepas de referencia de *T. gondii*, empleando los marcadores B1, SAG 2 y CB21. MM: Marcador de Peso Molecular 100 pb (Amersham, EEUU). En la parte superior se indican las diferentes cepas de referencia empleadas: OH3 (tipo I), Me49 (tipo II), Tg51 (tipo III), C56 (tipo III), Bev (tipo II), Prug (tipo II), Wil (tipo II), RH (tipo I) mientras en la zona inferior aparecen los genotipos resultantes. El extremo izquierdo muestra los marcadores utilizados.

De igual forma la digestión de los productos de amplificación de los marcadores B1 y SAG2 para muestras de LCR y sangre, permitió identificar los genotipos causantes de ET en pacientes con sida. Para el marcador B1 todas las muestras de LCR (40) y sangre (6) genotipificadas quedaron agrupadas dentro del genotipo I. Por su parte el análisis integral de la digestión de los dos extremos del gen SAG2, identificó de forma precisa, 13 muestras de LCR con genotipo I, una muestra con genotipo II y dos muestras con genotipo III.

Adicionalmente, para 13 muestras de LCR solo fue posible la amplificación y digestión de uno de los dos extremos del gen. De tal forma, cinco muestras quedaron agrupadas como genotipo I o II (digestión del extremo 5') y siete muestras como genotipo I o III. En el caso de las muestras de sangre, el empleo del gen B1 identificó solo el genotipo I en seis de las ocho muestras caracterizadas. Por su parte, el análisis de los dos extremos del gen SAG2 demostró la presencia de tres muestras genotipo I, una muestra genotipo III y ninguna como genotipo II.

Al igual que para el LCR, cuatro muestras de sangre se amplificaron y digirieron solo para uno de los dos extremos de este gen demostrando la presencia de una muestra genotipo III y tres muestras agrupadas como genotipo I o III. La digestión para algunas de las muestras clínicas genotipificadas se muestran en la figura 16.

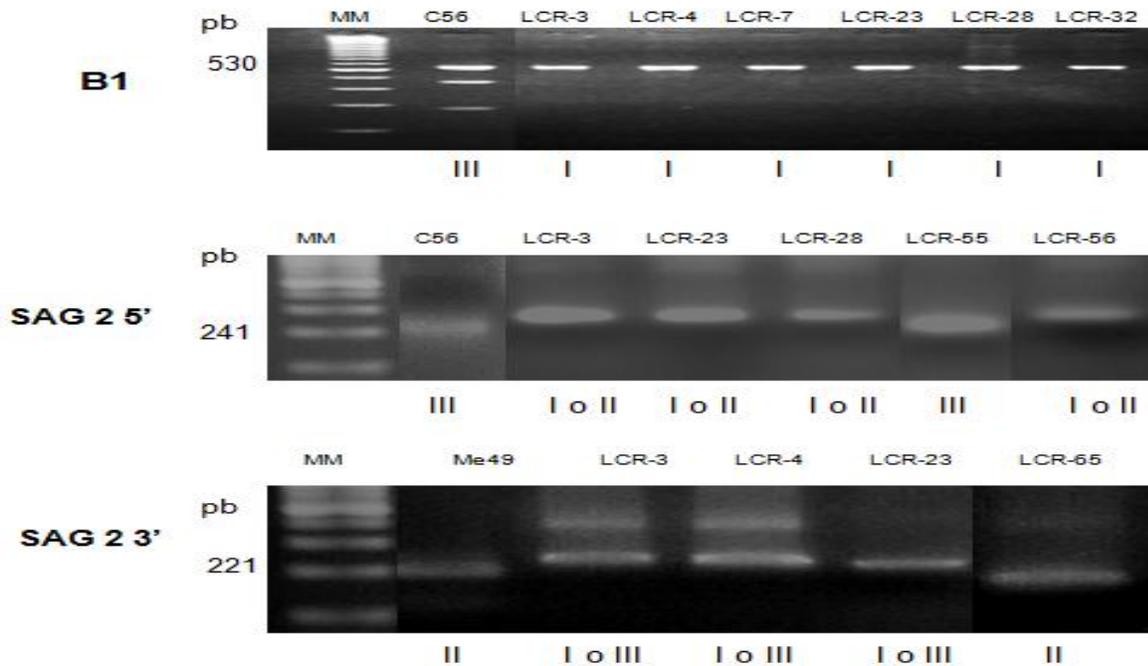


Figura 16. Patrón de digestión al utilizar la técnica de RFLP para muestras de LCR, empleando los marcadores B1 y SAG 2. MM: Marcador de Peso Molecular 100 pb (Amersham, EEUU). En la parte superior se indican las diferentes cepas de referencia empleadas: C56 (tipo III), Me49 (tipo II) así como los códigos de las muestras digeridas. En la zona inferior aparecen los genotipos resultantes. El extremo izquierdo muestra los marcadores utilizados.

Un análisis integral de los genotipos encontrados de acuerdo a los dos marcadores utilizados permitió clasificar la mayoría de las muestras como genotipo I, siendo menos predominante el genotipo III y los genotipos compartidos I-II o I-III. Esta clasificación (genotipos compartidos) se refiere a muestras para las se obtienen patrones de digestión diferentes por los dos marcadores utilizados. Para 15 muestras, se obtuvieron patrones no claramente definidos que fueron clasificados como (I o II) y (I o III). La tabla 9 muestra un resumen de estos resultados para las diferentes muestras clínicas genotipificadas, mientras un análisis detallado para cada marcador aparece en el Anexo 2.

Tabla 9. Resumen de los genotipos o combinaciones encontradas en las muestras de LCR y sangre de pacientes sida con ET según un análisis integral para todos los marcadores.

Genotipo	Número y tipo de muestra
I	27 (24 LCR, 3 Sangre)
III	2 (Sangre)
I-II	1 (LCR)
I-III	2 (LCR)
I o II	5 (LCR)
I o III	10 (7 LCR, 3 Sangre)

V.DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. Normalización de los protocolos de PCR y PCR anidada. Elección de muestras, marcadores y cebadores

Aunque el uso de la PCR ha mejorado en forma considerable el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral, algunas dificultades aún influyen en su aplicación como método de rutina. Su utilización tiene implícita una gran variabilidad en relación a las secuencias ideales para la amplificación. En consecuencia, varios marcadores moleculares se emplean y evalúan indistintamente para muestras de LCR, sangre y en menor frecuencia, orina. Entre estos marcadores puede mencionarse la simple copia del gen P30 (Burg *et al.*, 1988), las 110 repeticiones del gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal (Cazenave *et al.*, 1991), los genes de la α -tubulina (Feng y Milhausen, 1999) y β -tubulina (Costa *et al.*, 1997) y la secuencia de 529 pb que se repite más de 300 veces en el genoma de *T. gondii* (Homan *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayoría de los trabajos se centran en la utilización del gen B1, que continúa siendo el marcador más popular entre todos aquellos que se evalúan. Entre sus ventajas se destaca el hecho de ser un gen repetitivo (35 repeticiones en el genoma) y su marcada conservación a nivel de las secuencia de varios tipos clonales (99,5 %) (Grigg y Boothroy, 2001c). Se conoce que cuando la secuencia molde se presenta en múltiples copias en el genoma, la sensibilidad analítica del ensayo se incrementa (el límite de detección es más bajo) (Weiss, 1995). Adicionalmente, un nivel de conservación elevado incrementa la posibilidad de encontrar muestras positivas pertenecientes a los diferentes linajes del parásito.

Aún cuando existen muy pocas investigaciones donde se comparan las secuencias molde y los juegos de cebadores (Bastien, 2002; Switaj *et al.*, 2005), algunas de ellas muestran que los ensayos que utilizan el gen B1 son más sensibles (Jones *et al.*, 2000; Mesquita *et al.*, 2010a; Wahab *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos datos, este gen se seleccionó en nuestro trabajo como marcador para la evaluación de los protocolos de PCR y PCR anidada.

Unido a la extensa variabilidad de marcadores empleados, diversos juegos de cebadores están diseñados para cada marcador, donde se incluyen protocolos de PCR y PCR anidada. Sin embargo, para ninguno de ellos existe una utilización preferencial. De acuerdo con estos antecedentes, tres protocolos que emplean cebadores que reconocen regiones diferentes en este gen, se seleccionaron para determinar su utilidad en el diagnóstico de la ET (B22/B23 (PCR simple), T1-T4/T2-T3 (PCR anidada) y S1-AS1/S2-AS2 (PCR anidada)).

Luego de la selección del marcador y cebadores a evaluar, fue imprescindible detectar la menor cantidad posible de parásitos que pudieran encontrarse en las muestras clínicas a ser analizadas. En este sentido, la PCR permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN que pueden encontrarse en la muestra en mínimas cantidades, haciendo de esta técnica una herramienta útil para el diagnóstico, siempre y cuando se logre la normalización de los componentes de la reacción. Dicha normalización, constituye un elemento indispensable cuando esta herramienta se introduce por primera vez en un laboratorio con fines diagnósticos. Se normalizan los parámetros de la reacción con ADN purificado, seleccionándose la concentración óptima de los principales componentes de la reacción: cebadores, cloruro de magnesio y Taq ADN polimerasa, elementos que influyen en la sensibilidad y especificidad de la prueba (Weiss, 1995).

El criterio esencial para cualquier reacción de PCR o PCR anidada, es que la muestra a analizar contenga al menos un ADN enrollado cerca de la región que se va a amplificar y que cualquier impureza esté diluida, de forma tal que no inhiba el paso de la polimerización en la PCR. En nuestro caso, la PCR se normalizó con ADN de la cepa RH de *T. gondii*, libre de impurezas y otros contaminantes que pudieran inhibir la reacción de polimerización, lo que se demostró al amplificar los fragmentos específicos según cada protocolo. El método empleado para la extracción del ADN genómico fue el de fenol cloroformo (Maniatis *et al.*, 1992). La principal desventaja de este método es su laboriosidad, lo que implica mayor manipulación y demora cuando se analiza un gran número de muestras (Breniere *et al.*, 2003). Sin embargo, se utiliza para la extracción de ADN genómico de diferentes protozoos parásitos como *Trichomonas vaginalis* (Fraga *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2004), *Giardia lamblia* (Pelayo *et al.*, 2003),

Leishmania spp (Ordeñana, 2005), e incluso para *T. gondii* (Contini *et al.*, 2002; García *et al.*, 2003; Chabbert *et al.*, 2004).

Se plantea que cantidades de ADN genómico entre 0,1 a 1 µg en 100 µL de reacción son suficientes para utilizar como molde en las reacciones de PCR y un exceso de ADN molde puede inhibir a la polimerasa y reducir el rendimiento o provocar la aparición de productos inespecíficos no deseados (Steffen *et al.*, 1999). En este caso, se empleó 100 ng de ADN genómico del parásito, como molde para la normalización de algunos de los componentes de la reacción en un volumen final de 25 µL.

La concentración de MgCl₂ es un aspecto importante en la mezcla de reacción y debe ser optimizado cuidadosamente pues diferentes concentraciones pueden conllevar a diferencias significativas en la eficiencia de las reacciones y el rendimiento de los productos de PCR. En ausencia de una adecuada cantidad de Mg²⁺ la enzima se inactiva, y no hay amplificación o hay un bajo rendimiento. Por otra parte, el exceso del mismo reduce la fidelidad de la enzima, e incrementa el número de amplificaciones inespecíficas, lo cual disminuye la fidelidad de la copia (Williams *et al.*, 1989; Eckert y Kundell, 1990; Ellsword *et al.*, 1993). El rango de concentración recomendado debe estar entre 1- 4 mM, bajo las condiciones normales de reacción, y la concentración habitual, para 200 µM de dNTPs, en un rango de 2 ± 0,5 mM (Steffen, 1999). En este trabajo, las concentraciones óptimas estuvieron en el rango entre 0,5 y 1,5 mM de MgCl₂.

La elección de los cebadores debe realizarse de forma cuidadosa y habitualmente, es el factor más crítico durante la amplificación. En este trabajo, los cebadores utilizados presentan las características generales necesarias, como son su longitud (18 – 25 nucleótidos) y el contenido de Guanina y Citosina entre 40 al 60 %, distribuido de forma regular a lo largo de la secuencia. Su concentración es otro aspecto importante en la mezcla de reacción, pues bajas concentraciones disminuyen el rendimiento y aumentan la especificidad, mientras, concentraciones elevadas provocan lo contrario (Steffen *et al.*, 1999). En nuestro caso, se emplearon diferentes concentraciones en dependencia de cada protocolo (rango entre 0,05 y 0,3 µM).

La concentración de enzima (Taq ADN Polimerasa) es un factor importante a tener en cuenta en la PCR, debido a que tanto altas como bajas concentraciones respecto a la óptima, afectan la eficiencia de la reacción (Steffen *et al.*, 1999). Para muchos ensayos la cantidad óptima se encuentra entre 0,5 y 2,5 U en 50 µL de volumen final de reacción. Concentraciones superiores disminuyen la especificidad, y se pueden generar artefactos relacionados con la actividad exonucleasa 5'-3' (Longley *et al.*, 1990; Bell y De Marini, 1991). En nuestro caso, concentraciones entre 0,5 y 1 U para 25 µL de reacción fueron suficientes.

El resto de los componentes de la reacción, dNTPs y tampón de amplificación, se utilizaron a las concentraciones recomendadas. La concentración habitual para los dNTPs es 200 µM, y es fundamental tener una concentración equimolar de los 4 dNTPs, ya que el desequilibrio, disminuye el rendimiento y favorece la tasa de error de copia. La concentración del tampón de amplificación que se utilizó, fue la que recomiendan los fabricantes (Steffen, 1999).

Una vez normalizados los parámetros de la PCR y PCR anidada, se determinó la sensibilidad y especificidad analítica de cada protocolo. Para esta comparación solo se analizaron los resultados de la primera reacción de amplificación en el caso de los protocolos de PCR anidada. Consideramos que al realizar la segunda reacción, donde la sensibilidad de la técnica se incrementa, sería más difícil determinar cuál de los métodos era más sensible, aún cuando las muestras clínicas se evaluaron según las dos reacciones de amplificación en los protocolos de PCR anidada. Los resultados obtenidos muestran que todos los protocolos tienen la misma capacidad para la detección de *T. gondii*, y logran amplificar el ADN correspondiente a un parásito (50-100 fg de ADN genómico de *T. gondii* equivalen a un parásito). Sensibilidades similares se describen al emplear los diferentes cebadores diseñados para este gen (Jones *et al.*, 2000; Priya *et al.*, 2002; Chabbert *et al.*, 2004; Cassaing *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2006).

De forma simultánea, la evaluación de la especificidad analítica mostró el reconocimiento y amplificación de las bandas esperadas, solo para el ADN de *T. gondii*, lo cual evidencia la alta especificidad de los cebadores respecto a otros microorganismos que pueden estar presentes en el LCR, sangre u orina de los pacientes con VIH-sida. Estos resultados están en correlación con

estudios anteriores que demuestran la especificidad de estos cebadores con algunos de los microorganismos evaluados (Burg *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2002; Spalding *et al.*, 2002). Adicionalmente, el estudio de los cebadores mediante la herramienta BLAST, mostró que las secuencias de los cebadores empleados, solo hibridizan totalmente con secuencias genómicas del gen B1 de *T. gondii*. Las similitudes parciales para otros microorganismos fueron mínimas y no ubicadas en el extremo 3' del hidroxilo libre de la secuencia de los cebadores, de tal forma que no constituyen un riesgo de inespecificidad.

Una vez demostrada la excelente sensibilidad y especificidad analítica de la técnica, se inició una segunda etapa de trabajo para lograr el más alto nivel de detección luego de la evaluación de sistemas simulados.

V.2. Comparación de métodos de extracción de ADN a partir de muestras de LCR, sangre y orina

La extracción de ADN es el primer paso para la detección de patógenos y constituye un elemento medular, ya que se conoce que la contaminación del ADN molde con inhibidores de la enzima, pueden afectar su actividad y la hibridación de los cebadores, lo que puede producir inespecificidad y una baja sensibilidad del ensayo (Fuentes *et al.*, 1996; Steffen *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, el método de extracción a utilizar depende del fluido biológico a evaluar, pues la complejidad requerida en la extracción depende de los componentes constituyentes del fluido. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la excelente sensibilidad analítica de cada protocolo, se evaluó la influencia de diferentes protocolos de extracción de ADN sobre la sensibilidad analítica. De esta forma, se determinó la influencia de contaminantes propios de las muestras biológicas, y se midió la eficacia de algunos métodos convencionales en relación a protocolos comerciales. Los resultados obtenidos evidencian la utilidad diferencial de cada método y muestran que algunos protocolos convencionales pueden tener similar eficiencia en relación a otros comerciales. De esta forma, se decidió escoger en cada caso que fuera posible, el método convencional que mostró la mejor sensibilidad analítica.

Para el LCR, se obtuvo muy buenos resultados con la utilización del método de lisis y centrifugación, que constituye un protocolo rápido y de poco trabajo manual por parte del personal del laboratorio. Se detectó hasta dos taquizoitos de *T. gondii* sin la necesidad de realizar ensayos de PCR anidada. Con la utilización de este método el tubo que contiene la muestra que se analiza, permanece cerrado durante todo el tiempo de la extracción del ADN y se reduce el riesgo de contaminaciones así como la pérdida del ADN en las transferencias de un tubo a otro. Por otro lado, no requiere la utilización de solventes orgánicos, ni procedimientos de extracción complicados lo que lo convierte en un protocolo fácil de realizar. Se ha empleado para la obtención de ADN de muestras de orina (Fuentes *et al.*, 1996) y LCR (Gross *et al.*, 1992) y constituye un método eficiente, rápido y asequible para muchos laboratorios.

En particular para la sangre, se conoce que esta muestra biológica tiene un grupo importante de inhibidores de la PCR. Se ha descrito que la IgG inhibe la reacción de PCR por su habilidad de interactuar con ADN de simple cadena (Abu Al-Soud *et al.*, 2000). De ahí la necesidad de contar con un método de extracción de ADN que permita eliminar la mayor cantidad de inhibidores y favorezca una adecuada amplificación. En términos de sensibilidad analítica, el método de fenol-cloroformo resultó tan eficiente como el sistema comercial MiniMAG, al detectar hasta dos taquizoitos de *T. gondii* en relación a la detección de un único taquizoito por el sistema MiniMAG. De esta forma, consideramos conveniente para la extracción de ADN de las muestras de sangre, la utilización del método de fenol cloroformo, aún cuando implique mayor manipulación. Solo algunos autores han comparado los métodos de extracción de ADN a partir de muestras de sangre (Pujol-Rique *et al.*, 1999; Chabber *et al.*, 2004; Edvinsson *et al.*, 2004; Priya *et al.*, 2002). En los diferentes estudios, al utilizar los métodos comerciales se obtienen mejores sensibilidades, con independencia de los juegos de cebadores que se empleen. Sin embargo, de forma general no se observan grandes diferencias cuando se comparan los sistemas comerciales y convencionales.

Por otro lado, el proceso de extracción de ADN a partir de muestras de orina, requiere de procedimientos de extracción eficientes (Behzadbehbahani *et al.*, 1997; Priftakis *et al.*, 2003), ya que la presencia de sustancias inhibitorias de la PCR puede conllevar a una ineficiente amplificación. El método de lisis y centrifugación detectó solo el ADN correspondiente a cinco

parásitos mientras, el sistema comercial MiniMAG amplificó el ADN correspondiente a un parásito. Teniendo en cuenta la baja carga parasitaria que pudiera encontrarse en las muestras de orina y el hecho de existir muy pocos estudios que evalúen la utilidad diagnóstica de este fluido en el contexto de la ET, se decidió realizar la extracción de ADN de las muestras de orina de pacientes VIH-sida a través del sistema comercial MiniMAG, para asegurar los mejores resultados de sensibilidad diagnóstica.

La evaluación de los diferentes sistemas simulados para las tres muestras biológicas, permitió definir los métodos de extracción ideales para la obtención del ADN de cada una de las muestras biológicas a evaluar.

V.3. Comparación de tres protocolos que amplifican regiones diferentes en el gen B1 de *T. gondii*. Validez y seguridad diagnóstica de la PCR y PCR anidada para muestras de LCR, sangre y orina

Una vez establecidas las condiciones óptimas de todos los protocolos a evaluar, determinada su sensibilidad, especificidad analítica, reproducibilidad y, evaluados diferentes sistemas simulados para la extracción del ADN de *T. gondii*, se concluyó que todos los protocolos de PCR y PCR anidada estaban normalizados y listos para aplicarse a la evaluación de muestras clínicas. De esta forma, en una primera etapa, se evaluó la utilidad diagnóstica de tres protocolos que amplifican regiones específicas y diferentes dentro del gen B1 de *T. gondii*, empleando muestras de LCR de pacientes con y sin sospecha de NTx. Posteriormente, se determinó la utilidad diagnóstica adicional de muestras de sangre y orina para establecer el diagnóstico de NTx.

La importancia del diagnóstico molecular de NTx se ha evidenciado por varios investigadores pero a pesar de su amplio uso, la sensibilidad exacta de esta técnica no está establecida. En el contexto de ET, se utilizan diversos protocolos que se evalúan con diferentes marcadores y juegos de cebadores. Aunque la especificidad es alta para la mayoría de los estudios, existe una alta variabilidad en resultados de sensibilidad. Además, aún cuando de forma general se prefiere emplear muestras de LCR en comparación con otras muestras biológicas para diagnosticar ET, fluidos como la sangre y orina también son empleados. En particular para la sangre, su utilidad

diagnóstica se evalúa casi con igual frecuencia que el LCR, y muestra, al igual que este último, una alta variabilidad en resultados de sensibilidad (Lamoril *et al.*, 1996; Ponce Zapata y Gómez Marin, 2003; Chabbert *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2005; Cassaing *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2010 a,b). De forma contraria, la utilidad diagnóstica de las muestras de orina, se puede considerar casi inexplorada en el contexto de ET. Hasta nuestro conocimiento, solo un estudio demostró la presencia del parásito en orina de pacientes inmunocomprometidos, durante episodios agudos de la enfermedad (Cresti *et al.*, 2001).

La alta diversidad que se observa en el diagnóstico molecular de *T. gondii*, contrasta con los escasos estudios comparativos que se realizan. Solo 12 estudios compararon marcadores o juegos de cebadores para la detección de *T. gondii* en muestras humanas (Jones *et al.*, 2000; Buchbinder *et al.*, 2003; Reischl *et al.*, 2003; Chabbert *et al.*, 2004; Hierl *et al.*, 2004; Calderaro *et al.*, 2006; Cassaing *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2006; Nagi *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2010a; Okay *et al.*, 2009; Wahab *et al.*, 2010). La mayoría de estos trabajos comparan la sensibilidad diagnóstica de diferentes marcadores o tecnologías de PCR (PCR convencional vs PCR en tiempo real) Sin embargo, para estos últimos su aplicación no está siempre accesible en países en vías de desarrollo y la evaluación de protocolos convencionales para el diagnóstico de rutina, es importante en lugares con bajos recursos económicos, como nuestro país.

Durante la primera fase de evaluación, la comparación de protocolos demostró baja sensibilidad diagnóstica para T1-T4/T2-T3 y moderada para B22-B23 y S1-AS1/S2-AS2, existiendo diferencias estadísticamente significativas solo para la comparación B22-B23 y T1-T4/T2-T3. Estos resultados evidencian que existen resultados divergentes, aún cuando se emplee el mismo método de extracción y el mismo gen conservado.

La PCR para B22-B23, mostró los mejores valores de sensibilidad (72,41 %). De forma similar, algunos autores encuentran que los protocolos que utilizan los cebadores B22-B23 son más sensibles que otros sistemas de amplificación (Chabbert *et al.*, 2004; Okay *et al.*, 2009; Mesquita *et al.*, 2010a), aún cuando se compara con cebadores diseñados para el mismo gen B1 (Chabbert *et al.*, 2004; Mesquita *et al.*, 2010a). De igual forma, Okay y col (2009) demostraron que los protocolos que incluyen a los cebadores B22-B23, son más sensibles que aquellos que utilizan

cebadores para la secuencia de 529 pb (repetida 300 veces en el genoma), y la región utilizada para el ARN ribosomal (repetida más de 100 veces en el genoma), a pesar de que estos marcadores son mucho más repetitivos que el gen B1 (Okay *et al.*, 2009).

Para el protocolo T1-T4/T2-T3, donde se utilizan los primeros cebadores diseñados para el gen B1 (Burg *et al.*, 1989), estudios comparativos e independientes, muestran resultados de sensibilidad variables (Chabbert *et al.*, 2004; Hierl *et al.*, 2004; Cassaing *et al.*, 2006). Un estudio comparativo previo, realizado por Chabbert y col (2004), comparó la sensibilidad diagnóstica de este sistema en relación a B22-B23 y demostró la superioridad de este último (Chabbert *et al.*, 2004).

En el caso de S1-AS1/S2-AS2, su eficiencia para diagnosticar ET se evalúa por primera vez en este trabajo y los resultados obtenidos demuestran la utilidad de estos cebadores, al confirmar casi 70 % de los casos con la enfermedad. Sumado a esto, la utilización de este protocolo permite no solo diagnosticar ET, sino también, caracterizar los genotipos del parásito, directamente a partir de muestras clínicas.

Para seis muestras no fue posible detectar el ADN del parásito por ninguno de los protocolos de PCR o PCR anidada. Al respecto, la cantidad de ADN presente en estas muestras clínicas pudiera ser muy bajo y dar lugar a una ineficiente amplificación. De forma adicional, la mayoría de estos pacientes presentaron resultados negativos luego de la evaluación de técnicas radiológicas. En relación con esto, algunos autores refieren que este puede ser un factor que propicie la baja carga parasitaria en el fluido proveniente de la punción, y eventualmente, afecta la amplificación del ADN del parásito y con ello la sensibilidad diagnóstica del ensayo (Nogui *et al.*, 2009).

Respecto a la especificidad diagnóstica, 12/148 muestras de LCR provenientes de pacientes sin ET, presentaron resultados falsos positivos por alguno de los protocolos empleados pero no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los protocolos evaluados, lo que evidencia que todos tienen la misma capacidad para la detección de casos sin NTx. Estos 12 pacientes sufrían de otras enfermedades relacionadas con el sida, sin evidencia clínica ni

radiológica de ET. Aunque para esta enfermedad, la especificidad diagnóstica de la PCR es muy alta, se describen resultados falsos positivos en una minoría de casos (Nicoll *et al.*, 1996; Pelloux *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2005; Mesquita *et al.*, 2010b; Wahab *et al.*, 2010). En ocasiones, la positividad se vincula a la ruptura intermitente de quistes, con la consecuente presencia de parásitos en sangre y otros fluidos, aún sin presencia de la enfermedad (Nicoll *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos definieron que el protocolo de PCR B22-B23, constituye la mejor alternativa para una PCR diagnóstica, y es una estrategia rápida y de fácil ejecución. De esta forma, consideramos importante determinar la utilidad adicional que pueden tener muestras de sangre y orina en el diagnóstico de ET.

La utilización de muestras de sangre evidencia, al igual que el LCR, una gran variabilidad en términos de sensibilidad diagnóstica. Una recopilación de los resultados obtenidos en las investigaciones que emplearon muestras de sangre en el diagnóstico de ET, con independencia del método de PCR usado y el tamaño de la muestra, mostró un rango de sensibilidades que oscila desde 13 hasta 100 %, para una sensibilidad promedio de 46,3 % (444/960 pacientes) (Ho-Yen *et al.*, 1992; Dupoy-Camet *et al.*, 1993; Filice *et al.*, 1993; Dupon *et al.*, 1995; Foundrinier *et al.*, 1996; Lamoril *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 1996; Francen *et al.*, 1997; Pelloux *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2002; Priya *et al.*, 2002; Ponce *et al.*, 2003; Colombo *et al.*, 2005; Lindstrom *et al.*, 2006; Mezquita *et al.*, 2010a). En nuestro caso, la sensibilidad de la PCR (B22-B23) en sangre fue de 49,18 %, la cual se encuentra dentro del rango de sensibilidades para este fluido y es superior al promedio calculado. Sin embargo, valores superiores se describen al utilizar los cebadores B22-B23 (Colombo *et al.*, 2005; Mesquita *et al.*, 2010b). Al respecto, las diferencias pudieran estar influenciadas por variaciones en la extracción de ADN así como la utilización de muestras provenientes de pacientes con toxoplasmosis diseminada.

En el caso de la orina, su utilidad desde el punto de vista diagnóstico se ha explorado muy poco en el contexto de ET. Sin embargo, la presencia de *T. gondii* en muestras de orina durante la fase aguda de la enfermedad, pudiera constituir un método adicional para establecer el diagnóstico de

toxoplasmosis (Fuentes *et al.*, 1996). Un estudio realizado en ratones infectados con cepas virulentas y avirulentas, demostró la presencia de parásitos en la orina de animales infectados con cepas virulentas luego de 24 h de inoculación. De forma contraria, el parásito no se detectó en la orina de animales inoculados con cepas avirulentas, aún 525 días después de la inoculación (Nguyen *et al.*, 1996). En nuestro trabajo, la utilización de muestras de orina en el diagnóstico de ET demostró una baja sensibilidad, y logró detectar solo el 21,31 % de los casos con NTx, evidenciándose diferencias estadísticamente significativas en relación a las muestras de sangre. Todos los pacientes con resultados positivos a través de la PCR en orina, presentaron ADN de *T. gondii* detectable en muestras de sangre. De esta forma, en términos de sensibilidad diagnóstica, la utilidad de muestras de sangre puede considerarse superior a muestras de orina. Sin embargo, es importante destacar que la utilización de muestras de orina resultó altamente específica en relación a las muestras de sangre, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos fluidos. Adicionalmente, el VPP (100 %) obtenido para muestras de orina evidencia que aún con muy baja sensibilidad diagnóstica, es el único de los fluidos evaluados capaz de brindar una seguridad del 100 % en relación a la presencia de la enfermedad para pacientes con resultados positivos.

Un análisis integral de la evaluación de protocolos y muestras clínicas evidencia que la PCR (B22-B23) empleando muestras de LCR, es suficientemente sensible para confirmar 72 % de los casos con la enfermedad. Si bien esta metodología no es capaz de detectar la totalidad de los casos, constituye una estrategia simple, específica y rápida (24 h) para establecer la confirmación diagnóstica sin necesidad de realizar estudios radiológicos o esperar la respuesta al tratamiento empírico, desventajas fundamentales de los criterios empleados en la práctica diaria. La evaluación adicional de muestras de sangre definió su utilidad en el diagnóstico de ET y mostró que puede ser un fluido alternativo para confirmar la presencia del parásito, ya sea en conjunto con la evaluación de muestras de LCR o aplicado a pacientes en los que es imposible realizar una punción lumbar.

Finalmente, la utilización de muestras de orina, no constituye una herramienta diagnóstica sensible para confirmar una NTx, posiblemente debido a la localización cerebral de la enfermedad, lo cual limita la posibilidad de encontrar parásitos o su ADN a nivel de la orina. Sin

embargo, su alta especificidad diagnóstica (100 %) muestra la imposibilidad de erróneamente encontrar casos falsos positivos. De igual forma, la obtención de un VPP del 100 % para este fluido, evidencia que la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba es también del 100 %.

V.4. Aplicación de la PCR-RFLP para la identificación de los genotipos de *T. gondii* en cepas de referencia y muestras clínicas

La diversidad genética de *T. gondii* identificados en población general y pacientes inmunocomprometidos, parece tener un comportamiento geográfico típico. La mayoría de los parásitos identificados en Europa y América del Norte pertenecen al genotipo II de *T. gondii* (Darde *et al.*, 1992; Howe y Sibley, 1995; Howe *et al.*, 1997; Ajzenberg *et al.*, 2002b; Fekkar *et al.*, 2011). Sin embargo, en estudios realizados en América del Sur, fundamentalmente Brasil y Colombia, prevalecen los tipos I y III, casi en ausencia del genotipo II (dos Santos *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2005 a,b; da Silva *et al.*, 2005; de Melo *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2011). Brasil, en particular, parece tener una estructura poblacional única para este parásito, pues su diversidad genética es atípica (predominan genotipos recombinantes y atípicos) en relación al resto de los aislamientos caracterizados en otras regiones (Dubey *et al.*, 2010a; da Silva *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2011; Frazão-Teixeira *et al.*, 2011). En África, poco se conoce sobre la variabilidad genética de este parásito. La mayoría de los estudios realizados, en su mayoría en animales, revelan el predominio de cepas tipo III o I-III (Dubey *et al.*, 2005c; Dubey *et al.*, 2008b; Dubey *et al.*, 2010b). Sin embargo, se conoce que también existe circulación de cepas relacionadas con aislamientos provenientes de América Central y América del Sur (Mercier *et al.*, 2010).

En pacientes con ET, algunos trabajos muestran una elevada frecuencia de cepas tipo I (Howe y Sibley, 1995; Khan *et al.*, 2005; Gallego *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008), aún cuando otros genotipos también están asociados a la enfermedad (Lindstrom *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008). En nuestro país, no existen estudios previos que evalúen la diversidad genética de este parásito en ninguno de los grupos de riesgo de la enfermedad. La caracterización genética realizada en el presente trabajo arrojó una alta prevalencia del genotipo I, siendo poco frecuente el hallazgo de cepas correspondientes a los genotipos II, III o combinaciones de estos, de forma tal que

prevalece una estructura poblacional clonal. Este patrón parece estar relacionado con la situación existente en América del Sur, prevaleciendo el genotipo I en relación al resto de los genotipos del parásito. Al respecto, se especula sobre la posible existencia de un nuevo y un viejo mundo para *T. gondii*, donde prevalece en el nuevo mundo el genotipo I, mientras la presencia del genotipo II pudiera tener mayor protagonismo en el viejo mundo y América del Norte (Gallego *et al.*, 2006).

Por otro lado, la prevalencia de un genotipo u otro entre los pacientes estudiados, depende de las cepas que predominan entre los animales afectados por este parásito y que tienen contacto con el humano o son destinados a su consumo. Esto constituye un elemento importante y desconocido en nuestro país, que determina en cierta medida la prevalencia de un genotipo particular en la población general y por ende, entre los pacientes con NTx. Desde el punto de vista clínico, no es posible asociar estos genotipos con la ET, pues la mayoría de los estudios realizados están limitados a pacientes enfermos, mientras permanecen desconocidos los genotipos infectantes en personas asintomáticas. De forma contraria a los humanos, la mayoría de los aislamientos de origen animal corresponden a los tipos II y III, con independencia del estado clínico del hospedero (Howe y Sibley, 1995; Owen y Trees, 1999; Jungersen *et al.*, 2002).

A pesar de que la mayoría de las muestras caracterizadas arrojaron la presencia del genotipo I, no es posible asegurar que exista una alta prevalencia de este genotipo en nuestro país o entre pacientes con ET. El análisis de un grupo mayor de pacientes, así como la caracterización genética de cepas provenientes de otros hospederos humanos y animales proveerán datos más precisos sobre la epidemiología de *T. gondii* en nuestra isla. Adicionalmente, si bien la metodología utilizada tiene algunas ventajas en relación a otros métodos moleculares y serológicos utilizados para la caracterización, puede brindar resultados no concluyentes con relación al genotipaje de *T. gondii* cuando se utiliza un número pequeño de marcadores moleculares para la genotipificación. La introducción de otros marcadores permitirá estudiar de forma más profunda las características genéticas de este parásito entre cualquiera de los grupos de riesgo de la enfermedad.

Finalmente, estudios posteriores que permitan determinar de forma sencilla y menos invasiva las características genéticas del parásito en personas asintomáticas, permitirá realizar estudios más completos sobre la relación genotipo sintomatología en cualquiera de las formas clínicas de la enfermedad. Sin embargo, este es el primer estudio que provee evidencia de las características genéticas de este parásito en Cuba.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1- Se establecieron las condiciones óptimas para la detección del ADN de *T. gondii* a través de las reacciones de PCR y PCR anidada y se demostró la excelente sensibilidad y especificidad analítica de estas.
- 2- La utilización de sistemas simulados definió métodos eficaces para la extracción del ADN de *T. gondii* a partir de muestras de LCR, sangre y orina.
- 3- La comparación de protocolos en LCR demostró que la PCR B22-B23 es la herramienta diagnóstica de mayor utilidad para establecer el diagnóstico de NTx en pacientes con sida.
- 4- La sangre, en comparación con la orina, resultó el fluido biológico más útil para establecer el diagnóstico de NTx en pacientes con sida.
- 5- La caracterización genética de *T. gondii* en muestras de sangre y LCR de los pacientes estudiados arrojó una alta prevalencia del genotipo I, siendo poco frecuente el hallazgo de los genotipos II, III o combinaciones de estos.

VII.RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

- Comparar la validez y seguridad diagnóstica de la PCR (B22-B23) en muestras de sangre y LCR tomadas de un mismo paciente en paralelo.
- Continuar el genotipaje de *T. gondii* en un grupo mayor de pacientes con NTx, e iniciar la caracterización genética del parásito en otros grupos de riesgo de la enfermedad, que permitan estudiar una posible relación genotipo sintomatología.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D. Clinical Epidemiology Group of the French Hospital Database on HIV. Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1747-55.
- Abu Al-Soud W, Rådström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4463-70.
- Adurthi S, Mahadevan A, Bantwal R, Satishchandra P, Ramprasad S, Sridhar H, *et al.* Utility of molecular and serodiagnostic tools in cerebral toxoplasmosis with and without tuberculous meningitis in AIDS patients: A study from South India. *Ann Indian Acad Neurol* 2010; 13:263-70.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Tibayrenc M, Darde ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 2002a; 32:27-38.
- Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessiéres MH, Thulliez P, Filisetti D, *et al.* Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 2002b; 186:684-89.
- Ajzenberg D, Bañuls A.L, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, *et al.* Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2004; 34:1185–96.
- Ajzenberg D, Yera H, Marty P. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 2009; 199:1155-67.
- Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé M. Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay. *J Clin Microbiol* 2010; 48:4641-4645.

- Alonso R, Martinez E, Laynez P, Miguelez M, Pinero JE, Valladares B. Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada de *Toxoplasma gondii* en pacientes con infección por el VIH. *Med Clin* 2002; 118:294-6.
- Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ* 1994a; 308:1552.
- Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: predictive values. *BMJ* 1994b; 309:102.
- Alvarado-Esquivel C, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OC, Choudhary S, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *J Parasitol* 2011; 97:809-12.
- Antinori A, Ammassari A, De Luca A, Cingolani A, Murri R, Scoppettuolo G, *et al.* Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: a decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristic combined with polymerase chain reaction assay in CSF. *Neurology* 1997; 48:687-94.
- Aspinall TV, Guy EC, Robert KE, Joynson DH, Hyde JE, Sims FG. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int J Parasitol* 2003; 33:97-103.
- Atias A. *Parasitología Clínica*. 3ra ed. Publicación Mediterraneo, Santiago de Chile; 1994. p. 81-282.
- Babiker A, Darbyshire J, Pezzotti P, Porter K, Rezza G, Walker SA, *et al.* Changes over calendar time in the risk of specific first AIDS-defining events following HIV seroconversion, adjusting for competing risks. *Int J Epidemiol* 2002; 31:951-8.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Ore´fice F, Addiss FD. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:55-62.
- Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, Venkatapathy N. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Arch Ophthalmol* 2010; 128:28-32.
- Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1897-900.
- Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 205-15.

- Behzadbehbahani A, Klapper PE, Vallely PJ, Cleator GM. Detection of BK virus in urine by polymerase chain reaction: a comparison of DNA extraction methods. *J Virol Methods* 1997; 67:161-6.
- Belfort-Neto R, Nussenblatt V, Rizzo L, Muccioli C, Silveira C, Nussenblatt R, *et al.* High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2007; 79:111-4.
- Bell AS, Randord-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002; 18:337-42.
- Bell DA, De Marini DM. Excessive cycling converts PCR products to random length higher molecular fragments. *Nucleic Acid Res* 1991; 19:5079.
- Bliss SK, Gavrilescu LC, Alcaraz A, Denkers EY. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun* 2001; 69:4898-905
- Botero D, Restrepo M. Parasitosis humana. 2da ed. Colombia: Corporación para investigaciones biológicas 1992 p:279-94.
- Boyle JP, Rajasekar B, Saeij JP, Ajioka JW, Berriman M, Paulsen I, *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; 103:10514-9.
- Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet* 1997; 350:173-7.
- Brenière SF, Taveira B, Bosseno MF, Ordoñez R, Lozano-Kasten F, Magallón-Gastélum E, *et al.* Preliminary results of Random Amplified Polymorphic DNA among Triatominae of the phyllosoma complex (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:1033-38.
- Bretagne S, Costa JM, Fleury-Feith J, Poron F, Dubreuil-Lemaire MI, Vidaud M. Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1662-4.
- Bretagne S, Costa JM, Vidaud M, Tran J, Nhieu V, Fleury-Feith J. Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *J Infect Dis* 1993; 168:1585-8.

- Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1:1457-67.
- Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45:269-71.
- Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1988; 141:3584-91.
- Burg JL, Grove CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Directed and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1787-92.
- Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* 1998; 105:1032-7.
- Cai G, Kastelein R, Hunter CA. Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12 mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immunol* 2000a; 68:6932-8.
- Cai G, Radzanowski T, Villegas EN, Kastelein R, Hunter CA. Identification of STAT4 dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2000b; 165:2619-27.
- Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S. Comparison between two real-time PCR assay and a nest-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed* 2006; 77:75-80.
- Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophrenia Bulletin* 2007; 33:745-51.
- Casanova PS. Complicaciones del Sistema Nervioso Central con clínica focal predominante. En: Remedios MH, editor. *Sida y Sistema Nervioso Central*. Ciudad de la Habana 2006. p.52.
- Cassaing S, Bessieres MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time-PCR. *J Clin Microbiol* 2006; 44:720-4.
- Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, *et al*. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4037-44.
- Cazenave J, Cheyrou A, Blouin P, Johnson AM, Bequeret J. Use of polymerase chain reaction to detect toxoplasma. *J Clin Pathology* 1991;44:1037.

- Center for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS surveillance report. US Department of Health and Human Services Public Health Service, Atlanta, Georgia; 2001.
- Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA* 1993; 10:729-30.
- Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1719-22.
- Charles PM, Doise JM, Quenot JP, Aube H, Dalle F, Bour JB, *et al.* An unusual cause of acute respiratory distress in a patient with AIDS: Primary infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 2003; 35:901-2.
- Chumpitazi BF, Simon J, Polack B, Peyron F, Picot S, Ricard J, Ambroise-Thomas P. Human platelet inhibition of *Toxoplasma gondii* growth. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:325-33.
- Ciricillo SF, Rosenblum ML. Use of CT and MR imaging to distinguish intracranial lesions and to define the need for biopsy in AIDS patients. *J Neurosurg* 1990; 73:720-4.
- Cohen BA. Neurologic manifestation of toxoplasmosis in AIDS. *Semin Neurol* 1999; 19: 201-11.
- Cole R, Lindsay D, Howe D, Roderick C, Dubey J, Thomas N, *et al.* Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *J Parasitol* 2000; 86:526-30.
- Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, *et al.* Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5044-7.
- Commodaro A, Belfort R, Rizzo L, Muccioli C, Silveira C, Burnier M, *et al.* Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:345-50.
- Conti A, Masocco M, Pezzotti P, Toccaceli V, Vichi M, Boros S, *et al.* Differential impact of combined antiretroviral therapy on the survival of Italian patients with specific AIDS defining illnesses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25:451-8.

- Contini C, Cultrera R, Seraceni S, Segala D, Romani R, Fainardi E, *et al.* The role of stage-specific oligonucleotide primer in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated *Toxoplasma gondii* encephalitis in patients with AIDS. *Diagnost Microbiol* 2002; 51:879-90.
- Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A, Picot S. Evaluation of a real time PCR based assay using the lighcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradizoite gene in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *Int J Parasitol* 2005; 35:275-83.
- Cook A, Gilbert R, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, *et al.* Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 2000; 321:142-7.
- Costa JM, Darde ML, Assouline B, Vidaud M, Bretagne S. Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2542-5.
- Costa J, Cabaret O, Moukoury S, Bretagne S. Genotyping of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* using high-resolution melting analysis of the repeated B1 gene. *J Microbiol Methods* 2011; 86:357-63.
- Cresti S, Ciacci C, Donati E, Giordano I, Tordini G, Barberi A. Evaluation of PCR methods for 5S-rDNA and p30 genes to detect *Toxoplasma gondii* in blood and other clinical samples. *New Microbiol* 2001; 24:171-4.
- da Silva A, Pezerico SB, de Lima M, Pinheiro J, Tanaka E, *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Vet Parasitol* 2005; 127:23-7.
- da Silva RC, Langoni H, Su C, da Silva AV. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Vet Parasitol* 2011; 175:173-7.
- Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* 1992; 78:786-94
- Darde ML. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 219: 27-41.
- de Melo AF, Wagner RA, Tostes RG, Norma MM. Genetic analysis of natural recombinant brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Evolution* 2006; 6:22-31.

- de Moura L, Bahia-Oliveira L, Wada M, Jones J, Tuboi S, Carmo E, *et al.* Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:326-9.
- de Salvador-Guillouët F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, Saint-Paul MC, Dunais B, Dellamonica P, *et al.* Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. *J Infect* 2006; 53:47-50.
- de Sousa S, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, da Costa C, Darde M, *et al.* Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol* 2006; 135:133-36.
- Decker CF, Masur H. Pneumonia in AIDS patients in the critical care unit. *Critical Care Clinics* 1998; 14:135.
- Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, *et al.* Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis* 2007; 45:88-95.
- Denkers E, Gazzinelli R. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol* 1998; 11:569-88.
- Derouin F, Garin Y. Isolation of *Toxoplasma gondii* by cellular culture in HIV infected patients. *Press Med* 1992; 21:1853-6.
- Desmonts G, Couver J. Congenital toxoplasmosis: A prospective study of the offspring of 54 women who acquired toxoplasmosis during pregnancy: Pathophysiology of congenital disease. En: Thalhammer O, Baumgartner K, Pollak A, editores. *Perinatal Medicine. Sixth European Congress Vienna. 1978. Stuttgart, Georgia Thieme 1979.*
- Dodds EM. Toxoplasmosis ocular. *Archivos de la Sociedad Española de Microbiología* 2003;10:232-6.
- Dos Santos C, de Carvalho A, Ragozo A, Soares R, Amaku M, Yai L, *et al.* First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from Sao Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 131:207-11.
- Dubey J, Sundar N, Gennari S, Minervino A, Farias N, Ruas J, *et al.* Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the North Parana state and the South state Rio Grande do Sul, Brazil revealed high diverse and distinct parasite populations. *Veter Parasitol* 2007a; 143:182-8.

- Dubey J, Applewhaite L, Sundar N, Velmurugan G, Bandini L, Kwok O, *et al.* Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology* 2007c; 134:1559-65.
- Dubey J, Beattie C. *Toxoplasmosis of animals and Man*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988.
- Dubey J, Bhaiyat M, de Allie C, Macpherson C, Sharma R, Sreekumar C, *et al.* Isolation tissue distribution and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens Grenada, West Indies. *J Parasitol* 2005a; 91:557-60.
- Dubey J, Gennari S, Sundar N, Vianna M, Bandini L, Yai L, *et al.* Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. *Parasitol* 2007b; 93:60-4.
- Dubey J, Graham D, Blackston C, Lehmann T, Gennari S, Ragozo A, *et al.* Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol* 2002; 32:99-105.
- Dubey J, Velmurugan G, Chockalingam A, Pena H, de Oliveira L, Leifer C, Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 2008a; 157:299-305.
- Dubey J, Huong L, Lawson B, Subekti D, Tassi P, Cabaj W, *et al.* Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. *J Parasitol* 2008b; 94:68-71
- Dubey J, Karhemere S, Dahl E, Sreekumar C, Diabaté A, Dabiré K, *et al.* First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *J Parasitol* 2005c; 91:69-72.
- Dubey J, Lopez B, Alvarez M, Mendoza C, Lehmann T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Guatemala. *J Parasitol* 2005b; 91:955-7.
- Dubey J, Pas A, Rajendran C, Kwok O, Ferreira L, Martins J, *et al.* *Toxoplasmosis* in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Vet Parasitol* 2010b; 172:195-203.

- Dubey J, Rajendran C, Costa D, Ferreira L, Kwok O, Qu D, *et al.* New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *J Parasitol* 2010a; 96:709-12.
- Dubey J, Velmurugan G, Rajendran C, Yabsley M, Thomas N, Beckmen K, *et al.* Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int J Parasitol* 2011; 41:1139-47.
- Dubey J, Lindsay D, Speer CA. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Review* 1998; 11:267-99.
- Dubey J. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocyst by cats. *J Parasitol* 1995; 81:410-5.
- Dubey J. Oocyst shedding by cat fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J Parasitol* 2001; 87:215-9.
- Dubey J. *Toxoplasma gondii*. En: Baron S, Peake R, James D, Susman M, Kennedy C, Singleton MJD, Schuenke S, editores. *Medical Microbiology*, 4th ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Tex.; 1996. p. 84.
- Dumètre A, Ajzenberg D, Rozette L, Mercier A, Dardé ML. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Vet Parasitol* 2006; 142:376-9.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counseling. *Lancet* 1999; 353:1829-1833.
- Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2421-6.
- Dupouy-Camet J, Lavareda De Souza S, Bougnoux ME, Mandelbrot I, Hennequin C, Dommergues M, *et al.* Preventing congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1990; 336: 1018.
- Eckert G, Melamed J, Menegaz B. Optic nerve changes in ocular toxoplasmosis. *Eye Lond* 2007; 21:746-51.

- Eckert K, Kundel T. High fidelity DNA synthesis by the thermus aquaticus DNA polymerase. *Nucleic Acid Res* 1990; 18:3739-44.
- Edvinsson B, Jalal S, Nord CE, Pedersen BS, Evengård B; ESCMID Study Group on Toxoplasmosis. DNA extraction and PCR assays for detection of *Toxoplasma gondii*. *APMIS* 2004; 112:342-7
- Edvinsson B, Lappalainen M, Evengård B; ESCMID Study Group for Toxoplasmosis. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:131-6
- Ellsworth D, Rittenhouse K, Honeycutt R. Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 1993; 14:214-7.
- Estruch L, Santín M, Lantero MI, Ochoa R, Joan- es J, Alé K, *et al.* República de Cuba. Informe nacional sobre los progresos realizados en la aplicación del UNGASS. La Habana Geneva: UNAIDS; 2010.
- Fauci A, Lane H. Human Immunodeficiency virus (HIV) disease: AIDS and related disorders. En: Braunwald E, Fauci A, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editores. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15 ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1852-913.
- Fauci A, Clifford L. Human immunodeficiency virus (HIV) disease. AIDS and related disorders. En Fauci AS, Braun E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL editores. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14 ed. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 1791-856.
- Fekkar A, Ajzenberg D, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Delmas J, *et al.* Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1513-7
- Feng X, Milhausen M. localization of *Toxoplasma gondii* in feline intestinal tissue using PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 85:1041-46.
- Ferguson D, Dubremetz T. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan: perspectives and methods. Editorial Academic Press, EUA, 2007 p. 81-100.
- Ferreira A, Vitor R, Gazzinelli R, Melo M. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 2006; 6:22-31.

- Ferreira M, Vitor R, Carneiro A, Brandão G, Melo M. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infect Genet Evol* 2004; 4:131-42.
- Ferreira I, Vidal J, Costa-Silva T, Meira C, Hiramoto R, Penalva de Oliveira A, *et al.* *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol* 2008; 118:221-7.
- Ferreira I, Vidal J, de Mattos C, de Mattos L, Qu D, Su C, *et al.* *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol* 2011; 129:190-5.
- Ferreira M, Nishioka S, Silvestre M, Borges A, Nunes-Araujo F, Rocha A. Reactivation of Chagas disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literatura. *Clin Infect Dis* 1997; 25:1397-400.
- Filice G, Hitt J, Mitchell C, Blackstad M, Sorensen S. Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2327-31.
- Flores A. La toxoplasmosis: consideraciones económicas, técnicas y sanitarias. Hospital Centro Policlínico Veterinario, Malaja, España; 1991.
- Fraga J, Rojas L, Sariago I, Sarría C. Optimization of random amplified polymorphic DNA technique for its use in genetic studies of *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect Genet Evol* 2002; 2:73-5.
- Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H, *et al.* Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2639- 41.
- Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, de Oliveira FC. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol* 2011; 175:33-9.
- Frenkel J, Dubey J, Miller N. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 1970; 167:893-6.

- Froudinier F, Aubert D, Puygauthier-Thobas D, Rouger C, Beguinot I, Halbout P, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in immunodeficient subjects by gene amplification: influence of therapeutics. *Scand J Infect Dis* 1996; 28:383-6.
- Fuentes I, Rodríguez M, Domingo CJ, del Castillo F, Juncosa T, Alvar J. Urine simple used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2368-71.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramirez M, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1566-70.
- Fux, B, Rodrigues C, Portela R, Silva M, Su C, Sibley D, *et al.* Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2003; 71:6392-6401.
- Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gomez-Marin JE. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica* 2006; 97:161-67.
- García Y, Fraga J, Ginorio DE, Rodriguez MS, Cox R, Sarracent J. Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Mex Patol Clin* 2003; 50:157-9.
- Gazzinelli R, Hieny S, Wynn T, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6115-9.
- Gilbert R, Gras L; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. *BJOG* 2003; 110:112-20
- Goldman M, Carver RK, Sulzner AJ. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J Parasitol* 1958; 44:161-71.
- González N, Armas H, Mederos J. Toxoplasmosis y gestación: Un mito o una realidad. En: Cabero L, editor. *Infecciones de transmisión vertical*. Mayo ed. Barcelona; 1999. p. 115-52.
- Grigg M, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 2001a; 294:61-5.

- Grigg M, Boothroyd J. Rapid identification of virulent Type I strain of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis at the B1 gene. *J Clin Microbiol* 2001c; 39:398-400.
- Grigg M, Ganatra J, Boothroyd J, Margolis T. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2001b; 184:633-9.
- Grigg M, Sundar N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int J Parasitol* 2009; 39:925-33.
- Gross U, Roggenkamp A, Janitschke K, Heeseman H. Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *T. gondii* in biological and human clinical specimens. *J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11:33-9.
- Guay J, Dubois D, Morency M, Gagnon S, Mercier J, Levesque RC. Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:203-7.
- Guerrero-Flores A, Vega-Ramos B. Toxoplasmosis gástrica en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Rev Biomed* 2002; 13:37-41.
- Guo Z, Gross U, Johnson A. *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 1997; 83:458-63.
- Guo Z, Johnson A. DNA polymorphisms associated with murine virulence of *Toxoplasma gondii* identified by RAPD-PCR. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 219:17-26.
- Guo Z, Johnson A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol* 1995; 11:127-32.
- Hauser W, Sharma S, Remington J. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fraction of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1983; 131:458-63.
- Havelaar A, Kemmeren J, Kortbeek L. Disease burden of congenital toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1467-74.
- Hernández-González E, Zamora F, Barnés J, Bender JE, Rodríguez-Delgado, Millán-Marcelo JC. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis cerebral en pacientes cubanos de sida. *Revista de Neurología* 2002; 34:618-21.

- Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. *J Med Microbiol* 2004; 53:629-32.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:634-40.
- Holland G, Engstrom R, Glasgow B, Berger B, Daniels S, Sidikaro Y, *et al.* Ocular toxoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 1988; 106:653-7.
- Holland G. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol* 2004; 137:1-17.
- Homan W, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200 to 300 fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000; 30:69-75.
- Howe D, Sibley L. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995; 172:1561-6.
- Howe K, Honore S, Derouin F, Sibley L. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1411-4.
- Ho-Yen D, Joss A, Balfour A, Smyth E, Baird D, Chatterton J. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J Clin Pathol* 1992; 45:910-3.
- Israelsva D, Remington J. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr Clin Trop Infect Dis* 1993;13:322-56.
- Ives N, Gazzard B, Easterbrook PJ. The changing patterns of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in London clinic. *J Infect Dis* 2001; 42:134-9.
- Jalal S, Nord CE, Lappalainen M, Evengard B; ESCMID Study Group on toxoplasmosis. Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:937-9.
- James G, Sintehenko V, Dickeson D, Gilbert G. Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii* : effects of storage condition on sensitivity . *J Clin Microbiol* 1996; 34:1572-5.

- Jenum P, Holberg-Petersen M, Melby K, Stray-Pedersen B. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. *APMIS* 1998; 106:680-6.
- Johnson J, Butcher P, Savva D, Holliman RE. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. *J Infection* 1993; 26:147-58.
- Jones C, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2000; 41:634-44.
- Jones J, Kruszon-Moran D, Wilson M, McQuillan G, Navin T, McAuley J. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol* 2001; 154:357-65.
- Jones T, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med* 1972; 136:1173-94.
- Jungersen G, Jensen L, Rask M, Lind P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep Type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002; 25:187-95.
- Kasper LH. *Toxoplasma* infection. En: Braunwald E, Fauci A, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editores. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15 ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1222-7.
- Kaul S, Fishbein MC, Siegel RJ. Cardiac manifestations of acquired immune deficiency syndrome: a 1991 update. *Am Heart J* 1991; 122:535-44.
- Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R, *et al*. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect* 2006; 12:942-9.
- Khan A, Su C, German M, Storch GA, Clifford DB, Sibley D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5881-7.
- Khan I, Murphy P, Casciotti L, Schwartzman J, Collins J, Gao J, Yeaman GR. Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 2001; 166:1930-7.

- Kofman E, Khorsandi A, Sarlin J, Adhami K. Gastric toxoplasmosis: case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:2436-8.
- Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis* 2003; 187:1484-95.
- Lamoril J, Molina JM, De gouvello A, Garin YJ, Deybach JC, Moday J, *et al.* Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathology* 1996; 49:89-92.
- Lee PY, Mangan J, Holliman RE, Butcher PD. Quantitation of *Toxoplasma gondii* DNA in a competitive nested polymerase chain reaction. *J Clin Pathology* 1999; 52:61-4.
- Lehmann T, Graham DH, Dahl ER, Bahia-Oliveira LM, Gennari SM, Dubey JP. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect Genet Evol* 2004; 4:107-14
- Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:11423-8.
- Lindstrom I, Kaddu-Mulindwa DH, Kironde F, Lindh J. Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. *Acta Trop* 2006; 100:218-22.
- Lipshultz SE, Fox CH, Perez-Atayde AR, Sanders SP, Colan SD, McIntosh K, Winter HS. Identification of human immunodeficiency virus-1 RNA and DNA in the heart of a child with cardiovascular abnormalities and congenital acquired immune deficiency syndrome. *Am J Cardiol* 1990; 66:246-50.
- Longley MS, Bennett SE, Mosbaug DW. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* RNA polymerase. *Nucleic Acid Res* 1990; 18:7317-22.
- Luft BJ, Hafner R, Korsun AH. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1993; 329:995-1000.

- Luft BJ, Remington JS. Acute *Toxoplasma* infection among family members of patients with acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *Arch Intern Med* 1984; 144:53-6.
- Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 1992; 15:211-22.
- MacPherson JM, Gajadhar A. Sensitive and specific polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* for veterinary and medical diagnosis. *Canadian J Vet Res* 1993; 57:45-8.
- McLeod R, Muench SP, Rafferty JB, Kyle DE, Mui EJ, Kirisits MJ, *et al.* Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I. *Int J Parasitol* 2001; 31:109-13.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York; 1992.
- Martin I, García SM. Toxoplasmosis. Infección oportunista en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. *Rev Biomed* 2003;14:101-11.
- Mattos JP, Rosso AL, Correa RB, Novis S. Hemichorea with cerebral toxoplasmosis and AIDS (letter, comment). *Arq Neuropsiquiatr* 1995; 53:34.
- Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol* 2008; 24: 299-303.
- McCabe RE, Brooks RG, Dorfman RF, Remington JS. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis* 1987; 9:754-74.
- Meisel R, Stachelhaus S, Mevelec MN, Reichman G, Dubermetz JF, Fischer H-G. Identification of two alleles in the GRA4 locus of *Toxoplasma gondii* determining a differential epitope which allows discrimination of type I versus type II and III strains. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 81:259-63.
- Menotti J, Vilela G, Romand S, Garin YJ, Ades L, Gluckman E, *et al.* Comparison of PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5313-6.
- Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P, *et al.* Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:876-9.

- Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis* 2010a; 14:346-50.
- Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus infected patients. *J Med Microbiol* 2010b; 59:641-7.
- Miller CM, Smith NC, Ikin RJ, Boulter NR, Dalton JP, Donnelly S. Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-inducing helminth *Fasciola hepatica*. *PLoS One* 2009; 4:5692.
- Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR, *et al.* An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int J Parasitol* 2004; 34:275-84.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004; 363:1965-76.
- Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23:277-82.
- Montoya TG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002; 185:73-82.
- Moorthy RS, Smith RE, Rao NA. Progressive ocular toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 1993; 115:742-7.
- Mordue DG, Håkansson S, Niesman I, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 1999; 92:87-99.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by activate penetration of the host cell. *J Cell Sci* 1995; 108:2457-64.
- Muller F, Moskophidis M. Estimation of the local production of antibodies to *Treponema pallidum* in the central nervous system of patients with neurosyphilis. *British Journal Venereal Dis* 1983; 12:79-81.
- Nagy B, Ban Z, Beke A, Nagy GR, Lazar L, Papp C, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. *Clin Chim Acta* 2006; 368:131-7.

- Neto EC, Anele E, Schulte J, Rubim R, Becker D, Brites A. Screening for congenital toxoplasmosis in Brazil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30:54.
- Nguyen BT, Stadtsbaeder S. Comparative effects of cotrimoxazole (trimethoprim-sulphamethoxazole), pyrimethamine-sulphadiazine and spiramycin during avirulent infection with *Toxoplasma gondii* (Beverley strain) in mice. *Br J Pharmacol* 1983; 79:923-8.
- Nguyen TD, de Kesel M, Bigaignon G, Hoet P, Pazzaglia G, Lammens M, Delmee M. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3:635-9.
- Nicoll S, Burns SM, Brettle RP, Leen CS. A comparison of two methods of gene amplification for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* in AIDS. *J Infect* 1996; 33:177-83.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. Sur une piroplasmose nouvelle d'un rongeur 1908; 147:763-66.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Soc Biol* 1909; 148, 369-72.
- Nissapatorn V, Lee C, Fatt K, Loon C, Mahmud R, Anuar K. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients: A current situation. *Jpn J Infect Dis* 2004;57:160- 65.
- Nogui FL, Mattas S, Turcato Júnior G, Lewi DS. Neurotoxoplasmosis diagnosis for HIV-1 patients by real-time PCR of cerebrospinal fluid. *Braz J Infect Dis* 2009; 13:18-23.
- Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GM. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics* 2009; 64:171-6.
- Opitz C, Soldati D. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 2002; 45:597-604.
- Ordeñana R. Optimización de la técnica del ADN polimorfico Amplificado al Azar (RAPD) para la identificación de especies de Leishmania. [Tesis para optar por el Título de Master en Parasitología] Insituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", 2005.
- Oréface F, Bonfioli AA. Uveíte clínica e cirúrgica. En: Oréface F, editor. Toxoplasmosis. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica; 2000. p. 619-80.

- Ostergaard L, Nielsen AK, Black FT. DNA amplification on cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis among HIV-positive patients with signs or symptoms of neurological disease. *Scandinavian J Infect Dis* 1993; 25:227-37.
- Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J Parasitol* 1999; 85:382-4.
- Palanisamy M, Madhavan B, Balasundaram MB, Andavar R, Venkatapathy N. Outbreak of ocular toxoplasmosis in Coimbatore, India. *Indian J Ophthalmol* 2006; 54:129-31.
- Palella FJ; Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338:853-60.
- Pelayo L, Fraga J, Nuñez FA, Mendoza D, Torres D, Finlay CM. Genetic characterization by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of 18 isolates of *Giardia lamblia* obtained from day care children. *Exp Parasitol* 2003; 104:162-6.
- Pelloux H, Dupouy-Camet J, Derouin F, Aboulker JP, Raffi F. A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *Bio-Toxo Study Group AIDS* 1997; 11:1888-90.
- Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessières MH, Blatz R, *et al.* A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* involving 15 teams. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165:231-7.
- Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of in Brazil. *Int J Parasitol* 2008; 38:561-9.
- Pena HF, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biological and molecular characterization. *Res Vet Sci* 2006; 81:58-67.
- Peraire J, Vidal F, Mayayo E, Razquin S, Richart C. Gastric toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:1464-5.
- Pereira DN, Lane A de Melo, Marcos PL, Almeida RV. *Toxoplasma gondii*. En: Pereira DN, editor. *Parasitologia Humana*. 11^a ed. Sao Paulo 2005. p. 163-73.

- Pereira SA, Rodrigues DB, Correia D, dos Reis MA, Teixeira P. Identification of infectious agents in the lungs in autopsies of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:635-9.
- Pérez LJ, Pérez DF, Orta M, Martínez A, Luzardo C, Aragonés López C, *et al.* Tratamiento antirretroviral de alta eficiencia en pacientes cubanos con genéricos de producción nacional. II Foro en VIH/SIDA/ITS en América Latina y el Caribe. 2003 Apr 7-12; Havana, Cuba: Pedro Kourí Institute of Tropical Medicine (CU); 2003 [cited 2011 Feb 1]. 12 p. Available from: <http://www.foro2003.sld.cu/recursos/ver.php>
- Pérez J, Pérez D, González I, Díaz Jidy M, Orta M, Aragonés C, *et al.* Approaches to the Management of HIV/AIDS in Cuba. Geneva: World Health Organization; 2004.
- Piccolo I, Causarano R, Sterzi S, Sberna M, Oreste PL, Muioli C, *et al.* Chorea in patients with AIDS. *Acta Neurol Scand* 1999; 100:332-6.
- Piketty C, Derouin F, Rouveix B, Pocidalo JJ. In vivo assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii* by quantification of parasites in the blood, lungs, and brain of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1467-72.
- Pivetti-Pezzi P, Accorinti M, Tamburi S. Clinical features of toxoplasmic retinochoroiditis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Ophthalmol* 1994; 26: 73-84.
- Polonais V, Soldati-Favre D. Versatility in the acquisition of energy and carbon sources by the Apicomplexa. *Biol Cell* 2010; 102:435-45.
- Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Housseine L, Darde ML, *et al.* Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1327-8.
- Pomeroy C, Filice GA. Pulmonary toxoplasmosis: a review. *Clin Infect Dis* 1992; 14:863-70.
- Ponce Zapata NC, Gomez Marin JE. Estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH. *Infection* 2003; 7:8-14.
- Porter S, Sande M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327:1643-8.
- Pozio E, Gomez MA. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitology* 2005; 21:58-63.
- Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of

- hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol* 2003; 26:71-7.
- Priya J, Calderon MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, *et al.* Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4499-4503.
- Pujol-Rique M, Derouin F, Garcia-Quintanilla A, Valls ME, Miro JM, Jiménez de Anta MT. Design of a one tube hemi-nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. *J Medical Microbiol* 1999; 48:857-62.
- Rabaud C, May T, Lucet JC, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. *Clin Infect Dis* 1996; 23:1249-54.
- Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, *et al.* A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. *AIDS* 1997; 11:177-84.
- Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN. *et al.* In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997; 186:1819-29.
- Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 2003; 3:7.
- Renold C, Sugar A, Chave JP, Perrin L, Delavelle J, Pizzolato G, *et al.* *Toxoplasma* encephalitis patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 71:224-39.
- Rinder H, Thomschke A, Darde ML, Loscher T. Specific DNA polymorphism discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 69:123-6.
- Robert F, Ouatas T, Blanche P, Tourte-Schaefer C, Sicard D, Dupouy-Camet J. Retrospective evaluation of the detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in AIDS patients. *Presse Med* 1996; 25:541-5.
- Roberts F, Mets MB, Ferguson DJ, O'Grady C, Thulliez P. Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:51-8.

- Rojas L, Fraga J, Sario I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. *Infect Genet Evol* 2004; 4:53-8.
- Rojas M, Lobarto I, Montalvo M. Prevalencia de *Toxoplasma gondii* en alpacas y llamas. Resumen XII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal, Lima, Perú 1989. p. 345-7.
- Romand S, Thulliez P. Laboratory diagnosis of fetal toxoplasmosis. En: Ambroise Thomas P, Petersen E, editores. *Congenital toxoplasmosis*. Paris: Springer-Verlag, France; 2000. p. 131-9.
- Sabin AB. Toxoplasmosis: recently recognized disease. *Adv Pediatric* 1942; 1:1-54.
- Sacktor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus associated neurological disease in the era of highly antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 2002; 8:115-121.
- Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Medical Microbiol* 1990; 32:25-31.
- Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strain of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 1992; 359:82-5.
- Sibley LD. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol* 1995; 5:129-32
- Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 2003; 4:581-6.
- Sibley D, Khan A, Ajioka W, Rosenthal B. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophic Transact Royal Society* 2009; 364:2749-61.
- Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* 2010; 107:253-60.
- Smart PE, Weinfeld A, Thompson NE, Defortuna SM. Toxoplasmosis of the stomach: a cause of antral narrowing. *Radiology* 1990; 174:369-70.
- Soares RM, Silveira LH, da Silva AV, Ragozo A, Galli S, Lopes EG, *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 178:29-34.
- Spalding SM, Reis MR, Coelho J, Angel SO. Optimization of *Toxoplasma gondii* detection by PCR in pregnant blood and placenta. *J Braz Patol Med Laborat* 2002; 38:105-10.
- Sroka J. Seroepidemiology of toxoplasmosis in the Lublin region. *Agric Environ Med* 2001; 8:25-31.

- Steffen C, Ankenbaver W, Poaver-Hofmann R, Bye S, Eisen D, Frey B, *et al.* En: Steffen C, ed. PCR Application Manual. 2nd ed. Mannheim: Roche Diagnostics 1999. p.10.
- Su C, Zhang X, Dubey J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution simple method for identification of parasites. *International J Parasitol* 2006; 36:841-8.
- Su C, Shawabi E, Zhou P, Zhu X, Dubey P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 2009; 137:1-11.
- Subauste X, Chung J, Koniaris A, Hunter C, Montoya J, Porcelli S, Remington J. Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma-delta T cells in response to *Toxoplasma gondii in vitro* and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. *J Clin Invest* 1995; 96:610-9.
- Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 2002; 18:58-65.
- Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:170-6.
- Tait ED, Hunter CA. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:201-10.
- Tarlow MJ. Epidemiology of neonatal infections. *Antimicrob Chemother* 1994;1: 43-52.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30:1217-58.
- Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. Sexta Edición. Editorial Mc Graw-Hill. México; 2000.
- Van de Ven E, Melchers W, Galama J, Camp W, Meuwissen J. Identification of *Toxoplasma gondii* infection by B1 gene amplification. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2120-12.
- Velmurugan GV, Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol* 2008; 155:314-8.
- Verhofstede C, Reniers S, Colebunders R, Wanzele F, Plum J. Polymerase chain reaction in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis. *AIDS* 1993; 7:1539-41.
- Verhofstede C, Sabbe L, Van Renterghem L. Ability of enzyme-linked immunosorbent assays to detect early immunoglobulin G antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6:147-51.

- Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4765-68.
- Vidal JE, Diaz AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Colombo FA, Pereira-Chiocola VL. Importance of high IgG anti-*Toxoplasma gondii* titers and PCR detection of *T. gondii* DNA in peripheral blood samples for the diagnosis of AIDS-related cerebral toxoplasmosis: a case-control study. *Braz J Infect Dis* 2011; 15:356-9.
- Vidal JE, Hernandez AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Barbosa SP Jr, Focaccia R. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDS* 2005; 19:626-34.
- Vidal L. Prevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en cabras de la provincia de Lima. [Tesis de Medicina Veterinaria]. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú 1990. p. 41.
- Wahab T, Edvinsson B, Palm D, Lindh J. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2010; 48:591-2.
- Weiss JB. DNA probes and PCR diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:313-30.
- Weiss LM, Udem SA, Salgo M, Tanowitz HB, Wittner M. Sensitive and specific detection of *Toxoplasma* DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 163:180-6.
- Williams JF. Optimization strategies for the Polimerasa Chain Reaction. *Biotechniques* 1989; 7:762-9.
- Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, Von-Busch K, Kuhbeck R, Pfister HW. Intrathecal production of specific antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth is Síndrome). *J Infect Dis* 1986; 153:304-14.
- Wilson, D., B. Yen-Lieberman, U. Reischl, I. Warshawsky, Procop G. Comparison of five methods for extraction of *Legionella pneumophila* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5913-16

- Yap GS, Sher A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)- alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. J Exp Med 1999; 189:1083-92.
- Yera H, Delhaes L, Filisetti D, Ancelle T, Thulliez P, Bastien P. Comparison of five DNA extraction methods for *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid. Abstr Soc Fr Parasitol Meet 2007 p.35.
- Yong EC, Chi EY, Fritsche TR, Henderson WR, Jr. Human platelet-mediated cytotoxicity against *Toxoplasma gondii*: role of thromboxane. J Exp Med 1991; 173:65-78.
- Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, Sugimoto C, Xuenan X, Fujisaki K. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. J Vet Med Sci 2006; 68:1105-7.

IX. AUTOBIBLIOGRAFÍA

IX. AUTOBIBLIOGRAFÍA

Artículos donde se publican los resultados de la tesis.

- **Alfonso Y**, Fraga J, Cox R, Bandera F, Pomier O, Fonseca C, Ginorio D, Torres G, Capó V. Comparison of four DNA extraction methods from cerebrospinal fluid for the detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in AIDS patients. *Medical Science Monitor* 2008 14(3): CR1-6.
- **Alfonso Y**, Fraga J, Fonseca C, Jiménez N, Pinillos T, Dorta-Contreras AJ, Cox R, Capó V, Pomier O, Bandera F, Ginorio D. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Research* 2009 6:2.
- **Alfonso Y**, Fraga J, Jiménez N, Fonseca C, Dorta-Contreras AJ, Cox R, Capó V, Bandera F, Pomier O, Ginorio D. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested RCP and rapid identification of type I allele at B1 gene by PLFR analysis. *Experimental Parasitology* 2009 122: 203-207.
- **Alfonso Y**, Fraga J, Cox R, Jiménez N, Capó V, Pomier O, Fonseca C, Bandera F, Dorta-Contreras AJ, Calá V, Ginorio D. Conventional PCR for the diagnosis of neurotoxoplasmosis: Comparison of three set of primers for the B1 gene using CSF samples. (ACEPTADA en *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*).

Artículos del autor relacionados con el tema.

Alfonso Y and Fraga J. Toxoplasmosis. Ciencias J 2006; 3(6): 340-359.

Fraga J and Alfonso Y. Diagnóstico de la Toxoplasmosis. Ciencias 2006; 3(12): 210-225.

Alfonso Y, Fraga J. Neurotoxoplasmosis. Neuroinmunología Clínica Ed: Academia, 2009. pp 131-142.

Fonseca C, Alfonso Y. Neurosida. Neuroinmunología Clínica Ed: Academia pp 113-130.

Alfonso Y and Monzote. HIV Protease Inhibitors: Effect on the Opportunistic Protozoan Parasites. The Open Medicinal Chemistry Journal, 2011, 5, 40-50.

Eventos científicos donde se han expuesto los resultados del presente trabajo.

- Evento Joven Ciencia (Habana Cuba, 2005).
- Brigadas Técnicas Juveniles (Habana Cuba, 2005).
- III Aniversario del Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL), Facultad de Ciencias Médicas Dr. Miguel Enríquez (Habana Cuba, 2007).
- XVIII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología (Islas Margarita, Venezuela 2007).
- VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical (Habana, Cuba 2007).
- III Fórum Tecnológico Especial de Biotecnología (Holguín, Cuba, 2009).
- XIII Exposición Forjadores del Futuro (Habana, Cuba 2009).
- Congreso 70 Aniversario del IPK (Habana, Cuba 2009).
- Sexto Congreso Europeo de Medicina Tropical y Salud Internacional (Verona, Italia. Septiembre 2009).

Reconocimiento de los resultados.

- Premio Evento joven Ciencia
- Premio Nacional de las BTJ

X. ANEXOS

X. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado

La neurotoxoplasmosis es una enfermedad parasitaria causada por el parásito *Toxoplasma gondii*, y constituye una de las infecciones oportunistas más comunes del sistema nervioso central. Las técnicas de biología molecular, conjuntamente con otros criterios constituyen herramientas importantes para el diagnóstico rápido y caracterización genética de *T. gondii*. En este sentido el Laboratorio Nacional de Referencia de *Toxoplasma* del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) se propone realizar una investigación para determinar la utilidad diagnóstica de la técnica de PCR-RFLP teniendo en cuenta muestras de sangre, LCR y orina de pacientes con sida.

A cada paciente con manifestaciones neurológicas ingresado en el IPK, se le tomará muestras de sangre (5 ml), LCR (1ml) y orina (5ml) por el personal capacitado y designado para esta función. Las muestras serán trasladadas al laboratorio de parasitología, conservadas a -20 grados y procesadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) por el personal de investigación involucrado en la investigación. La toma de muestras no presenta grandes riesgos para el paciente ya que será realizada por un personal bien capacitado y designado para esto.

Se le ofrece participar de manera voluntaria en la investigación, para lo cual se tendrá en cuenta el resguardo de su intimidad y su confidencialidad, así como la conservación de su integridad física, mental y personal. Tiene la oportunidad de preguntar los pormenores del estudio y contar con el tiempo necesario para su análisis y toma de decisión. Si decidiera abandonar el mismo no se ejercerá influencia alguna para que continuara, lo cual no dañará la relación médico paciente ni paciente institución. Como incentivo usted no recibirá ninguna remuneración financiera por

formar parte de la investigación y los resultados de la misma serán dados y consultados por personal de salud autorizado, de manera mediata.

Para realizar alguna pregunta puede consultar con el médico o enfermera inmediata que lo atiende o a través de ellos con el Laboratorio de Referencia Nacional de Parasitología del IPK.

Declaro que he sido informado de los objetivos del estudio, del flujo de trabajo, así como la importancia de los resultados de la investigación para mejorar la calidad de vida de los pacientes sida.

He sido informado que las muestras del estudio serán tomadas por un personal de salud designado y capacitado para esta función. Posteriormente serán trasladadas al laboratorio de Parasitología bajo la responsabilidad que el estudio merita.

Además tengo el consentimiento que las muestras utilizadas en la investigación no se emplearan para realizar otras pruebas que no sean con fines diagnósticos.

Él / La que Subscribe:

Dando constancia a los _____ días del mes de _____ del año 20_____.

Testigo:

Dando constancia a los _____ días del mes de _____ del año 20__

Anexo 2. Clasificación de los genotipos encontrados en muestras de LCR y sangre según los marcadores B1 y SAG2. Las siglas LCR y S se emplean como códigos de las muestras de LCR y sangre respectivamente.

Código muestra	Marcador B1 PmlI	Marcador SAG 2 5' (Sau3AI)	Marcador SAG 2 3' HhaI	Genotipo final
LCR-3	I	I o II	I o III	I
LCR-4	I	I o II	I o III	I
LCR-7	I	negativo	negativo	I
LCR-23	I	I o II	I o III	I
LCR-28	I	I o II	I o III	I
LCR-32	I	I o II	I o III	I
LCR-39	I	I o II	I o III	I
LCR-41	I	negativo	negativo	I
LCR-45	I	negativo	negativo	I
LCR-47	I	negativo	negativo	I
LCR-53	I	I o II	I o III	I
LCR-55	I	III	I o III	I-III
LCR-56	I	I o II	I o III	I
LCR-57	I	I o II	negativo	I o II
LCR-58	I	I o II	negativo	I o II
LCR-59	I	negativo	I o III	I o III
LCR-62	I	I o II	I o III	I
LCR-64	I	negativo	I o III	I o III
LCR-65	I	I o II	II	I-II
LCR-66	I	III	I o III	I-III
LCR-67	I	negativo	negativo	I
LCR-101	I	I o II	negativo	I o II

LCR-103	I	I o II	negativo	I o II
LCR-104	I	negativo	negativo	I
LCR-115	I	negativo	negativo	I
LCR-116	I	negativo	I o III	I o III
LCR-120	I	I o II	I o III	I
LCR-128	I	I o II	I o III	I
LCR-129	I	negativo	negativo	I
LCR-130	I	I o II	I o III	I
LCR-131	I	negativo	negativo	I
LCR-152	I	I o II	negativo	I o II
LCR-170	I	negativo	I o III	I o III
LCR-180	I	negativo	I o III	I o III
LCR-182	I	negativo	negativo	I
LCR-183	I	negativo	negativo	I
LCR-185	I	negativo	I o III	I o III
LCR-190	I	negativo	I o III	I o III
LCR-191	I	negativo	I o III	I o III
LCR-260	I	I o II	I o III	I
S-8	I	I o II	I o III	I
S-14	I	I o II	I o III	I
S-18	I	negativo	I o III	I o III
S-24	negativo	III	I o III	III
S-36	negativo	III	negativo	III
S-37	I	negativo	I o III	I o III
S-54	I	negativo	I o III	I o III
S-97	I	I o II	I-III	I
