

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Métodos tradicionales y moleculares en el diagnóstico de la toxoplasmosis y su aplicación en el contexto clínico

Conventional and Molecular Methods in the Diagnosis of Toxoplasmosis and Their Application in a Clinical Setting / Métodos tradicionais e moleculares no diagnóstico da toxoplasmose e sua aplicação no contexto clínico

Alejandro Díaz Díaz¹, Beatriz Helena Aristizábal²

Fecha de recibido:
25 de enero de 2013
Fecha de aprobación:
26 de febrero de 2013

RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria que tiene una amplia variedad de manifestaciones clínicas. Toda la población mundial se encuentra en riesgo de adquirir la infección, pero su relevancia clínica es mayor en mujeres embarazadas, por el riesgo de toxoplasmosis congénita, y en personas inmunosuprimidas, por la alta probabilidad de desarrollar la forma diseminada de la enfermedad. Actualmente se cuenta con métodos diagnósticos tradicionales que incluyen diversas pruebas serológicas para identificar la respuesta inmune generada por el parásito en el organismo, así como la histopatología y el aislamiento microbiológico en cultivos. Aunque han ayudado al diagnóstico de esta enfermedad durante décadas, no se recomienda emplear un resultado aislado para confirmar la enfermedad. Siempre se requiere de varios resultados o la combinación de estas pruebas. Recientemente, las técnicas basadas en la biología molecular han permitido ampliar el espectro de pruebas diagnósticas y, aunque aún están lejos de ser técnicas perfectas, su rendimiento es altamente satisfactorio, lo que ha hecho que se incluyan en los algoritmos diagnósticos para cada forma de la enfermedad, no solamente como técnicas alternativas sino como estudios de primer nivel para confirmar la enfermedad, particularmente en el diagnóstico prenatal de toxoplasmosis congénita y en las formas diseminadas. En este artículo se revisaran tanto los métodos convencionales como los moleculares, con énfasis en su rendimiento y aplicabilidad en el contexto clínico.

Palabras clave: toxoplasmosis/diagnóstico; reacción en cadena de la polimerasa; serología; técnicas de diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease with a wide variety of clinical manifestations. The world population is at risk of acquiring the infection, but its clinical relevance is greater in pregnant women, due to the risk of congenital toxoplasmosis, and immunosuppressed patients, because of, the high probability of developing the disseminated form of the disease. Currently, there are traditional diagnostic methods, including various serological tests to identify the immune response generated by the parasite in the body, as well as histopathology and microbiological isolation in culture. Although they have helped diagnose this disease for decades, it is not recommended to use a single result test to confirm the disease. It always requires several results or the combination of some of these tests. Recently, techniques based on molecular biology have broadened the spectrum of diagnostic tests, and even though they are far from being technically perfect, their performance is highly satisfactory and that is why they have progressively been

1. Médico pediatra, Residente especialización en Infectología Pediátrica, Universidad CES. Medellín, Colombia
2. MSc, PhD. Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia

Dirección de correspondencia: Alejandro Díaz Díaz. Correo electrónico: alejodiaz81@gmail.com

included in diagnostic algorithms for each form of the disease, not only as alternative techniques, but as first-level studies to confirm the disease, particularly in the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis and disseminated forms. This article will review both conventional and molecular methods with an emphasis on their performance and their applicability in the clinical setting.

Keywords: toxoplasmosis/diagnosis; polymerase chain reaction; serology; molecular diagnostic techniques.

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença parasitária que tem uma ampla variedade de manifestações clínicas. Toda a população mundial se encontra em risco de adquirir a infecção, mas sua relevância clínica é maior em mulheres grávidas, pelo risco de toxoplasmose congênita, e em pessoas imunossupressão, pela alta probabilidade de desenvolver a forma disseminada da doença. Atualmente se conta com métodos diagnósticos tradicionais que incluem diversas provas de sorologia para identificar a resposta imune gerada pelo parasita no organismo, bem como a histopatológica e o isolamento microbiológico em cultivos. Embora ajudaram ao diagnóstico desta doença durante décadas, não se recomenda empregar um resultado isolado para confirmar a doença. Sempre se requer de vários resultados ou a combinação destas provas. Recentemente, as técnicas baseadas na biologia molecular permitiram ampliar o espectro de provas diagnósticas, e ainda que ainda estão longe de ser técnicas perfeitas, seu rendimento é altamente satisfatório, o qual fez que progressivamente estejam sendo incluídas dentro dos algoritmos diagnósticos para cada forma da doença, não somente como técnicas alternativas, senão como estudos de primeiro nível para confirmar a doença, particularmente no diagnóstico pré-natal de toxoplasmose congênita e nas formas disseminadas. Neste artigo se revisassem tanto os métodos convencionais como os moleculares, fazendo ênfases em seu rendimento e em sua aplicabilidade no contexto clínico.

Palavras chave: toxoplasmose/diagnóstico; reação em cadeia da polimerase; sorologia; técnicas de diagnóstico molecular.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales y epidemiología en Colombia

La toxoplasmosis es una enfermedad endémica en todo el mundo. Hasta el 30% de la población mundial puede tener la infección. Es causada por el parásito *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado, único en su género y pertenece al orden *Coccidia*¹. El ser humano es un huésped intermediario que adquiere la infección por la ingestión de carne cruda o mal cocida que contenga quistes tisulares, de agua o alimentos contaminados con ooquistes o congénitamente mediante transmisión transplacentaria desde una madre que adquiere la infección durante el embarazo. El huésped definitivo es el gato, en cuyo intestino el parásito desarrolla

cinco tipos de estadios multiplicativos y sexuales, antes de ser eliminado por las heces en forma de ooquiste. El hombre, o cualquier mamífero de sangre caliente, ingieren los ooquistes, que pasan por el estómago y cuyo contenido, que consiste en esporozoitos, es liberado en el intestino. Estos invaden la pared intestinal y producen la infección diseminada a través del torrente sanguíneo. Existen dos formas tisulares importantes en su patogénesis. Los taquizoitos y bradizoitos. Inicialmente la infección se produce por la rápida división de los taquizoitos. Posteriormente, por desarrollar la respuesta inmune, aparecen quistes en diferentes tejidos, especialmente en el músculo y el cerebro, que contienen cientos de bradizoitos de lento crecimiento, que sobreviven dentro de la célula sin destruirla, lo cual le permite evadir el sistema inmune del huésped y

adquirir un estado crónico de infección que dura por años, incluso, de por vida. El periodo de incubación de la enfermedad es de alrededor de siete días (4-21 días). El curso de la infección usualmente es benigno y la gran mayoría de personas infectadas permanece asintomática o con síntomas leves por largos periodos de tiempo (usualmente fiebre, adenopatías cervicales, sudoración). Sin embargo, en el feto y en personas inmunocomprometidas, la infección tiene alta morbimortalidad¹.

La infección durante el embarazo en una mamá serológicamente negativa puede llevar a la transmisión del parásito por la placenta hacia el feto, que lleva a toxoplasmosis congénita. En general, el riesgo de transmisión durante el embarazo es del 40%². Este riesgo incrementa durante la gestación, especialmente en el segundo y tercer trimestre, mientras que la severidad disminuye. La infección es más severa cuando se adquiere durante el primer trimestre del embarazo porque induce alteraciones multisistémicas, destrucción del tejido cerebral e, incluso, la muerte¹. En el segundo y tercer trimestre, la severidad disminuye y hasta el 85% de los neonatos puede ser asintomático, sin embargo, la mayoría desarrollará lesiones irreversibles, especialmente en el ojo y en el cerebro, durante la niñez temprana o adolescencia, si no se recibe el tratamiento adecuado^{1,2}. Los neonatos con signos de toxoplasmosis congénita presentan exantemas, linfadenopatías generalizadas, visceromegalias, ictericia y trombocitopenia². La infección del sistema nervioso produce hidrocefalia, coriorretinitis, calcificaciones cerebrales, microcefalia, convulsiones y sordera^{1,2}.

Por otro lado, en pacientes inmunosuprimidos, como el caso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pacientes con cáncer en terapia inmunosupresora, receptores de órganos trasplantados, entre otros, pueden sufrir reactivaciones de una toxoplasmosis latente, la cual es generalizada y puede comprometer múltiples órganos como el cerebro, pulmones, hígado, riñón, corazón, tracto gastrointestinal, ganglios, glándulas adrenales, médula ósea y testículos, usualmente es severa y altamente letal³.

En Colombia es escasa la información epidemiológica acerca de la frecuencia y características clínicas de la enfermedad. Los estudios que se encuentran han sido realizados en algunas regiones del país de forma aislada. En 1980 se reportó una seroprevalencia de 54% en mujeres en edad fértil, con distribución desigual entre las regiones, del 31-41% en la región central⁴. Un estudio en Quindío registró 60% de seroprevalencia⁵, mientras que otro en Cali la documentó en 46%⁶. En cuanto a la toxoplasmosis congénita, se ha estimado que el país tenga una prevalencia entre 2 y 10 por cada 1000 nacidos vivos⁴. En Quindío se encontró una prevalencia de 0.2 a 0.6%⁷. Más recientemente en un estudio multicéntrico

nacional, la seroprevalencia para IgM fue de 0.36% y para IgG de 0.5%⁸. Esto demuestra que en los últimos 25 años hay una constante transmisión del parásito, sin pruebas de descenso en la prevalencia⁴. Sin embargo, no existe información documentada más reciente en cuanto a la prevalencia global en el país, así como datos más específicos de la región y, aunque existe una guía nacional para el manejo de toxoplasmosis congénita⁹, actualmente no se cuenta con un programa de control establecido de manera oficial⁸.

Generalidades acerca del diagnóstico

Tanto en la infección aguda como en la crónica, es posible establecer un tratamiento efectivo, si el diagnóstico es hecho de forma rápida y adecuada¹. Dado que la mayoría de las veces el diagnóstico clínico es difícil, se requiere de pruebas de laboratorio para apoyarlo. De acuerdo con el estado inmune del paciente así como del contexto clínico, existen técnicas indirectas como la detección de anticuerpos, o directas como la detección del ADN por técnicas moleculares¹⁻³. También está disponible el estudio anatomopatológico y el cultivo tisular¹⁰.

Como en muchas enfermedades infecciosas, sobre todo en aquellas que frecuentemente son clínicamente inaparentes, el diagnóstico se basa en pruebas indirectas como la serología que consiste en la determinación de anticuerpos específicos contra el parásito¹. Sin embargo, en muchos casos de toxoplasmosis, los métodos diagnósticos tradicionales no son completamente eficientes en dar un diagnóstico certero y temprano, especialmente en pacientes inmunosuprimidos³. Esto ha sido facilitado por el uso de técnicas de diagnóstico modernas, basadas en la detección directa del ADN del parásito, ya que no dependen del estado inmune del huésped. Las pruebas moleculares han sido desarrolladas desde hace dos décadas y en la actualidad se constituyen como alternativas de primera elección para el diagnóstico de esta enfermedad^{1,10}. A continuación se explicarán los métodos diagnósticos disponibles.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS CONVENCIONALES

Serología

Consiste en determinar la respuesta inmune del huésped ante la infección con la medición de la producción de anticuerpos específicos contra la enfermedad¹⁰. La IgA e IgM se detectan desde la primera semana de infección y alcanzan niveles pico en el primer mes^{1,10}. También existe respuesta IgE, que es precoz y de muy rápida desaparición. La IgM inicia su disminución antes de los

seis meses, pero solamente en el 25% de los pacientes desaparece completamente antes de los 7 meses¹⁰. Por lo tanto, se detecta incluso por un año o más. Este comportamiento depende de la intensidad de la respuesta inmune en cada huésped. La IgA, por otro lado, también se ha demostrado que puede detectarse hasta por 9 meses¹⁰. La IgG aparece luego de la segunda semana, usualmente una a tres semanas después de la aparición de la IgM (esto depende del estado inmune del huésped y de las características de la técnica utilizada para su cuantificación), alcanza su pico de dos a tres meses y permanece positiva de por vida en niveles residuales variables, que no se correlacionan con la severidad de la enfermedad¹⁰.

Existen pruebas serológicas que miden anticuerpos específicos. Sin embargo, ninguna de ellas puede ser usada de forma aislada como soporte para el diagnóstico de infección aguda o crónica por *T. gondii*. En la mayoría de los casos se requiere de un panel de varias pruebas para distinguir entre infección aguda y crónica, como se discutirá más adelante¹¹.

El método Sabin Fieldman Dye Test, descrito en 1948, está basado en la lisis del parásito en presencia de los anticuerpos específicos y de complemento. Ha sido tradicionalmente la prueba de oro estándar en términos de sensibilidad y especificidad, pero actualmente se utiliza por muy pocos laboratorios de referencia^{12,13}. Desde entonces muchos otros métodos han sido usados. La inmunofluorescencia indirecta para detección de anticuerpos (IFAT), hemaglutinación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (Elisa), ensayos de aglutinación inmunoabsorbente (Isaga)³⁻¹¹. Todas ellas tienen un desempeño diferente y proveen resultados que no son comparables entre sí, aunque estos valores sí tienen calibración específica de acuerdo con estándares internacionales¹⁰. Actualmente, el método más utilizado y difundido comercialmente es la detección por Elisa¹⁰. Las otras técnicas, que son poco disponibles, se utilizan como pruebas confirmatorias y sólo se realizan en laboratorios de referencia¹³.

El resultado de la serología debe interpretarse con base en el contexto clínico. En pacientes con signos y síntomas sugestivos, la IgM específica positiva, pareada con una IgG no reactiva, es altamente sugestiva de infección aguda. La certeza diagnóstica aumenta cuando los títulos se repiten luego de tres semanas y se detecta IgG. Si esto no ocurre, podría pensarse en un falso positivo para IgM. Si la IgM inicial es negativa, el diagnóstico es poco probable pero no se descarta. La IgA sigue el mismo patrón de la IgM. Por ello, en muchas ocasiones, no es solicitada de forma rutinaria. Su principal utilidad radica en confirmar una infección reciente cuando la IgM es negativa o indeterminada^{10,11,13}. Teóricamente la respuesta IgE, por ser de elevación y desaparición rápida, aporta información

valiosa para diagnosticar la infección aguda, pero no se cuantifica en el contexto clínico de forma rutinaria^{2,13}. En pacientes inmunocomprometidos con sospecha clínica (por ejemplo abscesos cerebrales múltiples) la sola presencia de IgG indica una reactivación, mientras que un resultado negativo puede sugerir otro diagnóstico¹¹.

Aunque encontrar niveles altos de IgM e IgG de forma simultánea en un paciente con clínica sugestiva sugiere una infección aguda¹⁰, la IgM permanece positiva por más de un año, por lo tanto, no es conveniente utilizarla como único marcador reciente de infección, a no ser que se presente en títulos muy altos o que se analice en el contexto clínico¹⁴. Por este motivo, siempre se recomienda confirmar los resultados de serología con un método diagnóstico alternativo¹⁰⁻¹³. El Test de avidéz de la IgG, es útil para definir si un paciente con IgM positiva presenta una infección aguda, crónica o reactivada, también cuando el resultado es equívoco o indeterminado^{13,15,16}. Este Test de avidéz se basa en el hecho de que la afinidad funcional de la IgG específica es inicialmente baja después del reto antigénico inicial y con la maduración de la respuesta inmune, aumenta progresivamente con las semanas. Se expone el complejo antígeno-anticuerpo a reactivos como la urea o cualquier otro agente desnaturizante, que disocian la IgG específica para *T. gondii* del antígeno^{11,13}. Los títulos resultantes reflejan la IgG total y resistente a urea. El resultado se determina con la comparación de la tasa de titulación de anticuerpos en suero tratado y no tratado¹³. Si el índice de avidéz o afinidad es bajo, se concluye que la infección es reciente. Si el índice de avidéz es alto, se supone que la infección ocurrió hace más de cuatro meses^{10,13}. Es importante tener en cuenta, para la interpretación del resultado del Test de avidéz en presencia de IgM positiva, que una afinidad baja no indica necesariamente una infección aguda, pues puede permanecer así hasta por un año, como ocurre con la IgM. Por eso debe utilizarse como una prueba confirmatoria y nunca debe realizarse de forma aislada¹⁷. El principal inconveniente que tiene esta prueba es su disponibilidad, puesto que no es una prueba de rutina y no se hace en cualquier laboratorio en donde se hace la serología convencional. Está disponible sólo en algunos laboratorios de referencia^{10,13,14}. En Colombia, el Test de avidéz se realiza en muy pocos centros de referencia. La mayoría de instituciones cuenta con la serología convencional.

La serología puede tener falsos negativos, por ejemplo en pacientes con inmunodeficiencias primarias como una hipogamaglobulinemia, o en aquellos con una inmunosupresión marcada como en una infección por VIH o en un receptor de trasplantes^{1,10}. Las muestras sanguíneas hiperlipémicas, hemolisadas o con inadecuada conservación de la temperatura, pueden ofrecer resultados no

confiables¹³. Por otro lado, los falsos positivos son un problema en el momento de interpretar la prueba^{10,11,13}. Esto ocurre por la presencia de factor reumatoideo, anticuerpos antinucleares o por unión inespecífica *in vitro*. Esto se evita con el uso de la técnica Elisa, de “doble sandwich” o por inmunocaptura^{10,13}. También en el contexto clínico un título positivo puede interpretarse erróneamente como infección activa basado en la cinética de las inmunoglobulinas, como ya se mencionó¹⁴. Varios estudios han encontrado falsos positivos de IgM en laboratorios comerciales de Estados Unidos hasta en un 60%. Por eso, la administración de drogas y medicamentos de ese país (FDA), recomienda que todo título positivo para IgM, debe confirmarse en un laboratorio de referencia¹⁸. Otra dificultad ocurre al interpretar correctamente la prueba de Elisa IgG en “zona gris” o en niveles bajos, sobre todo en pacientes con inmunosupresión o en quienes se benefician de quimioprofilaxis. Estos títulos deberían confirmarse por medio de otras técnicas complementarias¹⁰.

La principal dificultad que tienen las pruebas serológicas es identificar el momento de la infección, es preciso acudir a la combinación de diferentes técnicas, toma de sueros pareados e interpretación acuciosa de las pruebas para evitar diagnósticos erróneos o preocupaciones innecesarias, especialmente en mujeres embarazadas que persistan con serología positiva debido a una infección pasada, pero que en el momento los títulos no representan ningún riesgo para el feto¹⁰.

Histopatología y cultivo

El estudio histopatológico detecta los taquizoitos y quistes. Pueden estudiarse muestras de cualquier líquido o tejido con diferentes tinciones (Hematoxilina Eosina, Giemsa o Wright)¹¹. La más efectiva parece ser la Inmunohistoquímica con el uso de anticuerpos específicos o Inmunoperoxidasa, pues las tinciones convencionales no tienen una sensibilidad y especificidad estandarizada⁵. En cuanto al cultivo tisular o de líquidos corporales, su disponibilidad es baja y es poco práctico, pues su resultado se demora hasta 6 semanas. El aislamiento del patógeno también se lleva a cabo con la inoculación en ratones, técnica que tiene alta sensibilidad y especificidad pero que actualmente se reserva para investigaciones médicas y sólo se realiza en laboratorios de referencia^{10,19}.

Diagnóstico molecular

La detección directa del ADN del parásito, se basa en la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). En ésta, un fragmento específico del genoma es amplificado para que sea visualizado en un gel de electroforesis, en

un secuenciador automático o en un software de PCR en tiempo real²⁰.

Este método ha demostrado ser simple, sensible, reproducible y de costo efectivo²¹. La detección por PCR detecta cantidades muy pequeñas del ADN, incluso de un solo parásito con concentraciones hasta de 0.2 picogramos de ADN²². La sensibilidad y especificidad dependerán principalmente de la técnica apropiada de extracción del material genético, el procesamiento de la muestra, las características de la secuencia escogida y los parámetros mismos de la reacción de amplificación²⁰.

La prueba puede llevarse a cabo en una amplia variedad de muestras que incluyen líquido amniótico, sangre, líquido cefalorraquídeo, fluido vítreo, orina, lavado broncoalveolar o en muestras de diferentes tejidos, además ofrece resultados en menos de 24 horas, que la hace una alternativa excelente para el diagnóstico de esta enfermedad cuando los otros métodos diagnósticos son insuficientes^{1,2,10,11,13}. En general, una prueba positiva por PCR indica infección activa, lo que es clínicamente significativo^{18,24}. Un resultado positivo en cualquier muestra fetal es confirmatorio de toxoplasmosis congénita²²⁻²⁴.

Se han descrito varias secuencias objetivo en el genoma de *T. gondii* para los ensayos con PCR que han sido evaluadas y desarrolladas durante los últimos 20 años¹. Estas se dividen en secuencias únicas y repetitivas. La primera secuencia única descrita fue la correspondiente al antígeno P30 de la superficie del parásito, gen no repetitivo y sin intrones^{2,11}. Otras secuencias no repetitivas que se han usado en algunos laboratorios de investigación son los genes SAG1, SAG2, SAG3, SAG4, GRA4. Sin embargo, la intención era encontrar secuencias de genes repetitivos que permitieran un mejor rendimiento de la prueba. Fue en 1989 cuando se describió por primera vez la secuencia del gen repetitivo B1²⁰. La secuencia del gen B1 es una secuencia que se repite 35 veces dentro del gen²⁶. Hasta la fecha ha sido el más estudiado y utilizado y para el cual se han diseñado diferentes cebadores, en localizaciones que permitieron el uso de técnicas como la PCR anidada²⁶⁻²⁸. Las técnicas de PCR convencional que identificaban esta secuencia, tenían una sensibilidad aproximada de 65 a 80%¹. A partir de 1990, se buscaron secuencias que fueran repetitivas con el fin de mejorar cada vez más el rendimiento de la técnica. Dentro de ellas están la secuencia repetitiva TGR1E y la ADN_r^{27,28}.

En 2000 se describió la secuencia REP 529, que se repite de 200 a 300 veces en el genoma del *T. gondii* y que es altamente sensible y específica para el diagnóstico²⁹. Estudios comparativos del uso de las secuencias demostraron un aumento de 10 veces en la sensibilidad cuando se utilizaba esta secuencia, comparada con el Gen B1 (límite de detección de 20 femtogramos (fg) para REP529 Vs 200 fg para B1)³⁰. Por otra parte, los

estudios que evalúan el rendimiento en la detección del parásito, demuestran sensibilidad y especificidad superior con la secuencia REP529 que con el gen B1 (88% y 100% de sensibilidad y especificidad con el gen B1, comparado con 100% de sensibilidad y 98% de especificidad con el gen REP529)³¹. Con el desarrollo de la PCR en tiempo real (qPCR), se ha remplazado el método convencional, con nuevas técnicas que utilizan esta secuencia^{21,32}. La qPCR permite detectar y cuantificar *T. gondii* en muchas muestras biológicas. Tiene la capacidad de estimar la intensidad de la infección en pacientes que están con tratamiento, por lo que es muy útil para monitorizar la respuesta y progresión de la enfermedad, además de detectar hasta el genoma de un solo parásito y diagnosticar infecciones en pacientes con estado de portador crónico²¹. Comparada con otras técnicas, parece ser la de mejor rendimiento porque capta el menor número de parásitos²⁹⁻³¹. En el estudio de Nagi, 2006, se compararon cuatro técnicas moleculares para la detección de *T. gondii*, entre las cuales estaban PCR convencional, PCR fluorescente, PCR en tiempo real con SYBRGreen I y PCR en tiempo real con detección FRET (Fluorescence Energy Transfer Hybridization). Se determinó que la PCR convencional y por SYBRGreen tenían un límite de 1000 parásitos, seguido de la PCR fluorescente con un límite de 10 a 100 parásitos. La técnica más eficiente fue la FRET-qPCR que logró detectar un solo parásito³³. En el 2010 se describió una técnica de qPCR TaqMan cuantitativa, que detecta la secuencia repetitiva REP529 y confirma una mayor sensibilidad de esta secuencia, comparada con el gen B1³⁴.

Muchos estudios aluden a la diversidad de diseños y ensayos con PCR para la identificación de este parásito^{25,32,35,36}. Sin embargo, a pesar de esta diversidad, son escasos los estudios de comparabilidad. Como las técnicas no están estandarizadas, la sensibilidad es variable, pero la especificidad es mayor al 95%¹. Independientemente de la técnica que se utilice, es importante tener en cuenta las técnicas de manejo de la muestra para lograr resultados óptimos. El proceso de extracción de ADN debe realizarse en laboratorios certificados y con la infraestructura necesaria para asegurar la calidad, así como la pureza y adecuada concentración del ácido nucleico³⁷.

Las pruebas de diagnóstico molecular para toxoplasmosis, se han vuelto especialmente importantes en la evaluación de la infección congénita y sobrepasan los métodos tradicionales. El problema es que se han desarrollado múltiples pruebas de PCR, "caseras" o diseñadas en laboratorios de forma independiente. Esto tiene el inconveniente que cada método difiere en los pasos que se llevan desde el método de extracción hasta la inclusión de controles internos. Estas diferencias son fuente considerable de variación inter laboratorio en la realización

de la prueba, lo que incide en la calidad del diagnóstico así como en la comparabilidad de los resultados entre instituciones³⁷. Por ejemplo, en el segundo estudio colaborativo europeo de PCR para *T. gondii*, se incluyeron 15 grupos de trabajo, en los que se evidenció la falta de homogeneidad entre los protocolos. De ello se resalta la necesidad de un control de calidad externo. Cada grupo recibió 12 muestras (cuatro negativas y ocho positivas) de líquido amniótico impregnado de taquizoitos de *T. gondii*. Cada grupo hizo su propio protocolo de PCR (todos eran distintos). En nueve laboratorios detectaron al menos un parásito, dos de ellos encontraron todas las muestras negativas, y los cuatro restantes hallaron uno o más controles falsamente positivos³⁸. En otro estudio realizado en Francia, se evaluaron 25 centros hospitalarios que hacían pruebas caseras de PCR para el diagnóstico prenatal de toxoplasmosis durante un periodo de tres años. Se encontraron al menos 35 métodos distintos, incluso nueve hospitales hacían de dos a tres pruebas diferentes. Todos estos laboratorios tuvieron diferencias en al menos uno de los pasos en el proceso de la prueba. Hubo diversidad en las secuencias utilizadas, predominio del Gen B1 y REP 529, con una tendencia al aumento del uso de la segunda secuencia, debido a que varios estudios han demostrado una mayor sensibilidad con el uso de la secuencia REP 529²⁹. También hubo un aumento significativo en el uso de técnicas con PCR en tiempo real, comparado con la PCR convencional; sin embargo, se emplearon al menos seis juegos comerciales distintos para la extracción del ADN³². Esta falta de consenso entre diferentes laboratorios y hospitales, explica por qué la técnica en sí no está completamente estandarizada, así como es difícil el control de calidad externo y la comparabilidad de los resultados^{37,38}. A pesar de que existan en el mercado marcas comerciales de pruebas para PCR en tiempo real, es difícil evaluar la correlación entre sus resultados y su desempeño, debido a la diversidad que muestran en el proceso, razón que explica también el amplio rango de sensibilidad que se ha reportado en la literatura especialmente en el estudio de la toxoplasmosis congénita³⁹. Como la tendencia de nuevas técnicas es creciente, es probable que persista este problema. Por eso, más que estandarizar los métodos existentes, sería mejor evaluar su desempeño con materiales básicos comunes y calibrados. Esto puede lograrse con pruebas de calidad externas que permitirían no solamente verificar que el laboratorio esté reportando bien los resultados, sino, también, estimar la sensibilidad de sus métodos³⁷. Igualmente, es importante que las técnicas tengan incluido un control interno para evaluar la correcta amplificación del ADN y ausencia de inhibidores de la prueba, así como controles negativos y positivos que permitan hacer una adecuada interpretación del resultado obtenido de la

muestra de los pacientes³⁷⁻³⁹. La aparición de pruebas comerciales, no disponibles a principios de la década pasada, también puede ayudar para que la efectividad de la prueba sea mejor en un futuro.

Aplicación de los métodos diagnósticos en los escenarios clínicos producidos por la toxoplasmosis

La infección por *T. gondii* puede presentarse en varios escenarios distintos. Está la mujer embarazada con toxoplasmosis, quien transmite la infección a su bebé (toxoplasmosis congénita), también el paciente inmunosuprimido con infección diseminada, los pacientes con toxoplasmosis ocular y, finalmente, el paciente inmunocompetente, previamente sano en el que la infección es usualmente asintomática^{10,14}. En cada uno de ellos el diagnóstico inicial se hace con la serología, pero es recomendable apoyarla con otro método diagnóstico^{1,2,10,11,13}.

El tipo de prueba y la muestra clínica más recomendables se simplifican en la Tabla 1.

En Colombia está disponible el diagnóstico molecular de toxoplasmosis en algunos pocos centros de referencia. El Hospital Pablo Tobón Uribe de Medellín, Colombia, cuenta con la prueba de PCR en tiempo real para diagnóstico de toxoplasmosis desde el año 2006. Esta prueba es cuantitativa e identifica la secuencia repetitiva. Desde entonces se han realizado 45 pruebas diagnósticas (6% de las pruebas moleculares), de las cuales han sido positivas diez (cuatro en LCR, dos en líquido amniótico, dos en biopsia cerebral, un lavado broncoalveolar y una muestra sanguínea).

Diagnóstico prenatal de toxoplasmosis congénita

La toxoplasmosis, por ser endémica, se convierte en un problema de salud pública, como resultado de la transmisión de la infección de la madre al feto durante

Tabla 1. Aplicación de métodos diagnósticos en toxoplasmosis.

Paciente	Contexto clínico	Aproximación diagnóstica	Técnica	Muestra	Rendimiento
Inmunocompetente, receptor trasplante, embarazada	Infección primaria o detección de estado inmune	Serología	IgG, IgM Elisa. Avidéz, IgA, Dye Test, ISAGA*	Sangre	S y E ≥ 70%
Feto	Infección primaria materna	Detección directa del parásito	PCR	Líquido amniótico	S 80% - E 98% VPP 98% VPN 87%
Neonato	Infección primaria materna	Detección directa del parásito	PCR	Varios†	S y E > 90%
		Serología	IgM, IgA, IgG Elisa (Muestras pareadas) Western blot	Sangre de cordón o periférica	S 50 - 80% E ≥ 90%
Inmunocomprometido	Infección cerebral o diseminada	Detección directa del parásito	PCR	Varios†	S 80% en sangre, S 60% en LCR. E ≥ 98%
		Serología	IgG, IgM. CGW‡, Western Blot	Sangre-humor vítreo/Acuoso	S 50 - 80% E ≥ 90%
Inmunocompetente o inmunocomprometido	Retinocoroiditis	Detección directa del parásito	PCR	Humor vítreo, sangre	S ≥ 60% E ≥ 90%

Adaptado de referencia⁴

* Se realizan solo en laboratorios de referencia

† Sangre, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar, tejidos, otros

‡ Coeficiente de Goldmann Witmer

S = Sensibilidad. E = Especificidad. VPP = Valor predictivo positivo. VPN = Valor predictivo negativo

el embarazo. Por eso es vital, desde el punto de vista gubernamental, la implementación de políticas para la detección temprana de la infección con el fin de mejorar el pronóstico vital y funcional de los niños infectados³⁷.

La mayoría de países con políticas para la prevención de la toxoplasmosis congénita, realiza tamización serológica sistemática para todas las mujeres embarazadas durante el primer trimestre³². Si la mamá tiene títulos IgG antes de quedar embarazada, se considera que no hay riesgo durante el embarazo, pues el riesgo mayor para el feto es cuando la infección se adquiere durante el primer trimestre. Si los estudios iniciales dan negativos, la serología se repite de forma seriada durante el embarazo, con el último control, dos a tres semanas después del parto, para verificar la ausencia de infección periparto¹⁰. En caso de detectarse IgM, se hacen mayores esfuerzos para la interpretación de resultados, ya sea por estudios pareados, implementación de técnicas serológicas avanzadas en laboratorios de referencia o empleo de técnicas moleculares¹⁰. El Test de avidéz es útil en estos casos, pues al realizarse antes de la semana 16, si la prueba es alta, indica que la infección fue hace más de 4 meses, antes de que la materna quedara en embarazo, lo que disminuiría el riesgo del feto. Si la prueba es baja, dado que permanece así hasta por un año, debe continuarse la evaluación diagnóstica¹⁸.

La amplificación de ácidos nucleicos por medio de la PCR ha revolucionado el diagnóstico de la infección fetal por *T. gondii*, puesto que permite un diagnóstico temprano y evita procedimientos más invasivos al feto^{13,40}. Anteriormente se utilizaba la cordocentesis para obtener sangre del feto, procedimiento que tiene riesgos para el bienestar fetal. Ahora, con PCR en líquido amniótico, se puede hacer el análisis de forma menos invasiva³⁷.

Cuando una infección materna adquirida durante el embarazo está claramente establecida o la sospecha es alta, la práctica vigente es iniciar tratamiento con espiramicina de forma profiláctica hasta el parto y proponer un diagnóstico prenatal. Se debe hacer ecografía gestacional mensual para evaluar el desarrollo fetal. El diagnóstico prenatal se fundamenta en técnicas moleculares basadas en la PCR para encontrar el ADN del parásito¹⁰. Se realiza la prueba en la paciente con serología positiva o hallazgos ecográficos sugestivos (hidrocefalia o calcificaciones). Esta muestra es tomada por amniocentesis, con el fin de estudiar el líquido amniótico. Usualmente se toma luego de la semana 18 y al menos cuatro semanas después de la infección materna. Si el resultado es positivo, y de acuerdo con la edad gestacional, se toman decisiones en cuanto a cambio de tratamiento en la mujer embarazada de espiramicina a sulfonamida-pirimetamina, pero también, en países donde el aborto terapéutico está legalizado, pudieran tomarse decisiones en cuanto a la

continuación o terminación del embarazo de acuerdo con el pronóstico que se establezca con el resultado de la PCR en conjunto con los hallazgos ecográficos. Si el resultado es negativo, debe confirmarse la ausencia de enfermedad, luego del nacimiento, con las pruebas pertinentes¹⁰.

La sensibilidad del diagnóstico molecular aumenta con la edad gestacional en el momento de seroconversión, y hay un mejor rendimiento si la infección fue adquirida entre la semana 17 y 21 de gestación, pero no es influenciada por el tratamiento o por el momento en que se realice la amniocentesis^{14,39}. En general, la sensibilidad y especificidad acumuladas reportadas en la literatura es del 80% y 98%, respectivamente²⁰. La sensibilidad de la PCR en líquido amniótico fue del 58% en mujeres con conversión serológica en la semana 12 y se elevó al 78% en aquellas con seroconversión a la semana 30. La especificidad fue del 96%. El resultado de una PCR positiva aumentó el riesgo de infección fetal del 9 al 84%³⁹. En el trabajo de Hohlfdld y colaboradores, se encontró una sensibilidad del 97% y un valor predictivo negativo del 99% para el diagnóstico de infección fetal con la realización del PCR en muestras de líquido amniótico, muy superior frente a los métodos convencionales (inoculación de líquido amniótico y sangre fetal en ratón, cultivo celular de líquido amniótico e identificación de IgM específica en sangre fetal) cuya sensibilidad es hasta 89.5%⁴¹. En un estudio multicéntrico prospectivo, se demostró que la técnica de qPCR REP-529, permite detectar parásitos en el líquido amniótico de 92% de fetos infectados⁴². Sin embargo, los falsos negativos en diferentes estudios han demostrado estar en el rango del 10 al 35%^{37,39,43}. Esto se explica probablemente por la presencia de una baja densidad parasitaria en el líquido amniótico o por transferencia retardada del parásito a través de la placenta, más que por dificultades en la técnica^{37,44}. En otro estudio, en Brasil, se evaluaron cuatro técnicas de diagnóstico molecular (PCR cualitativa, PCR-Hibridación, semiNesteds-PCR y PCR cuantitativa en tiempo real, tecnología TaqMan) en 183 muestras de pacientes embarazadas a quienes se les confirmó o descartó toxoplasmosis por medio de serología pareada IgG-IgM. De las cuatro técnicas, la PCR en tiempo real mostró los mejores resultados, con una sensibilidad del 48.5% y una especificidad del 95%⁴⁵. Romand y colaboradores, por otro lado, obtuvieron una sensibilidad del 64%, valor predictivo negativo del 87.8%, especificidad y valor predictivo positivo del 100%⁴⁴. Esto demuestra la variabilidad que puede existir en las técnicas según el laboratorio donde se procese la muestra^{44,45}. La qPCR tiene un valor predictivo negativo cercano al 100% cuando se realiza en el primer o segundo trimestre del embarazo. Igualmente, el valor predictivo positivo se acerca a 100% cuando la PCR es hecha en un laboratorio acreditado en donde se impida al máximo la contami-

nación^{43,46}. Los resultados ofrecidos por la qPCR en el diagnóstico prenatal ayudan a establecer el pronóstico en el feto porque se correlacionan con los estudios ecográficos y porque altos títulos se correlacionan con signos clínicos de severidad en el feto y en el neonato¹⁷. Por lo tanto, se concluye que las técnicas basadas en PCR son efectivas para ayudar a definir el tratamiento apropiado y hacer vigilancia. Tiene una muy alta especificidad, por eso un resultado positivo confirma la infección, pero la sensibilidad no es tan alta. Un resultado negativo no la descarta completamente, en especial en la segunda mitad del embarazo, cuando es mayor la transmisión materno-fetal. Por lo tanto, el seguimiento postnatal es necesario en el primer año de vida, con el fin de excluir completamente la infección en niños cuya PCR fue negativa⁴².

Diagnóstico postnatal

La tamización neonatal postnatal debe complementar al diagnóstico prenatal cuando éste se realiza. También, es una alternativa importante en países donde no se hace la tamización serológica a las madres, así como la opción obligada en neonatos en los cuales no se pudo hacer el diagnóstico prenatal, situación que actualmente es alta por la falta de recursos y disponibilidad de la técnica diagnóstica en muchos países en vía de desarrollo^{14,42}.

Cuando un neonato tiene riesgo de tener infección por *T. gondii*, usualmente se evalúa clínicamente para buscar hallazgos sugestivos (hidrocefalia, coriorretinitis, microftalmia, entre otras). Se acompaña de un estudio imaginológico, que usualmente es una ecografía cerebral, con el fin de buscar calcificaciones cerebrales, en cuyo caso muchas veces se complementa con una tomografía^{10,11,24}. También se realiza evaluación oftalmológica durante la primera semana, y de forma repetida cada tres a cuatro meses durante el primer año¹¹. Esta evaluación se acompaña con el análisis serológico del recién nacido, o con la detección del parásito mediante técnicas moleculares^{10,14}. En el primer caso, se toman muestras sanguíneas para demostrar la presencia de anticuerpos específicos, que sugieren infección intrauterina o simplemente la transmisión pasiva de anticuerpos maternos (específicamente IgG). La prueba se repite al mes de vida y cada 2 a 3 meses. Si el recién nacido no está infectado, se observará el descenso de los títulos IgG maternos que desaparecen del quinto al octavo mes y no se detecta IgM o IgA. Un neonato infectado se determina por la presencia de IgM o IgA, por la falta de descenso en los títulos de IgG luego de 6 meses, o por su persistencia luego de 12 meses¹⁰. En la evaluación serológica del neonato, los marcadores más específicos son IgM e IgA, los cuales no atraviesan la placenta, y cuya aparición en el periodo neonatal explicaría una infección activa del neonato, que

se confirma si los títulos son crecientes en dos muestras separadas^{10,11,13}. Si la sangre fue tomada de cordón, existe el riesgo de contaminación con sangre materna durante el parto. Esto se aclara con la repetición de serología diez días después, ya que es corta la vida media de estas inmunoglobulinas o, también, existe la alternativa de evaluar de forma pareada el suero del neonato y de la madre en el momento del parto para buscar la presencia de IgG e IgM específicas por medio de la técnica Western blot, con el fin de determinar si las inmunoglobulinas detectadas son idénticas, lo que supondría contaminación o, por el contrario, si los patrones son específicos para la madre y el bebé, indicaría infección neonatal¹⁰. El rendimiento de la serología en el recién nacido muestra resultados dispares, con estudios que reportan sensibilidades del 50 al 80%¹⁷, y una especificidad cercana al 100%. Cuando las técnicas convencionales, se combinan con el Western blot u otras técnicas serológicas como el Isaga, la sensibilidad es mayor y podría detectarse hasta el 94% de los neonatos infectados en los primeros tres meses de vida¹⁷. Aunque la serología ha sido el método convencional para el diagnóstico postnatal de la toxoplasmosis, su principal desventaja radica en no demostrar una infección de forma temprana en un paciente con resultados no concluyentes. Por lo tanto, es imprescindible correlacionar los resultados con la clínica del paciente y confirmar los hallazgos serológicos con otras técnicas. Por este motivo las técnicas moleculares constituyen una excelente alternativa para el diagnóstico en estos pacientes, ya que, con una muestra de sangre periférica, líquido cefalorraquídeo u orina, se obtiene un resultado rápido, altamente sensible y un costo efectivo para confirmar el diagnóstico, o para establecerlo en un bebé que tiene la sospecha^{14,47}.

Diagnóstico en personas inmunocomprometidas

El paciente inmunocomprometido constituye una categoría especial. El diagnóstico de toxoplasmosis cerebral ha sido insatisfactorio durante mucho tiempo por diversas razones¹⁰. Entre ellas, el uso de imágenes para soportar la sospecha clínica puede no ser útil, especialmente en pacientes con VIH, quienes pueden tener otras enfermedades infecciosas con compromiso cerebral. El estudio patológico de muestras *postmortem*, así como la respuesta al tratamiento antiparasitario, se usan en conjunto con las imágenes para el diagnóstico de toxoplasmosis, con múltiples desventajas^{10,14}. La serología, usualmente, es ambigua y poco útil en estos pacientes. La detección directa del parásito por métodos no moleculares es dispendiosa e insensible³⁷. Por esto, y debido a que la toxoplasmosis en pacientes inmunosuprimidos puede ser letal, es fundamental hacer un diagnóstico urgente.

La PCR se puede utilizar con seguridad en pacientes con diferentes tipos de inmunosupresión. En estos pacientes en quienes la toxoplasmosis es diseminada, la muestra se obtiene de cualquier fluido o de cualquier tejido^{4,11}. La detección molecular permite una identificación más temprana de la infección, evaluar la respuesta al tratamiento, incluso, ayudar a monitorizar la carga del parásito, en el contexto de pacientes que requieren reducción de la terapia inmunosupresora para permitir el tratamiento de la infección⁴⁸⁻⁵⁰, y determinar el momento de reiniciar el tratamiento para la enfermedad de base. Con este fin, la PCR demuestra una sensibilidad superior al 80% y especificidad del 98% con muestras tomadas de sangre y una sensibilidad del 60% con muestras de líquido cefalorraquídeo^{10,11,48-51}. Sin embargo, el rendimiento parece no ser tan alto cuando el paciente ya ha recibido tratamiento previo porque algunos estudios demuestran que la sensibilidad cae hasta el 13-25% ante este escenario⁵².

Diagnóstico de toxoplasmosis ocular

La coriorretinitis toxoplásmica se advierte en el contexto de una infección congénita o en enfermedad adquirida postnatal como resultado de infección aguda o reactivación⁵³.

El diagnóstico se basa en el examen oftalmológico. La presencia de lesiones focales con inflamación vítrea, junto con una serología positiva para *T. gondii*, soporta el diagnóstico y justifica el inicio del tratamiento^{53,54}. Sin embargo, hay pacientes con lesiones atípicas, sintomatología clínica inespecífica o falta de respuesta al tratamiento, que se beneficiarían otras pruebas. Existen tres alternativas. La primera es la detección de inmunidad directamente en el ojo^{10,53}. Esto se hace con la toma de serología IgG total y específica para *T. gondii*, pareada en sangre y humor acuoso, se calcula el coeficiente de Goldmann Witmer (CGW)⁵⁴. Esta técnica tiene una sensibilidad variable entre el 50 y 80%. En segundo lugar, está la técnica Western blot, también en muestras pareadas de humor acuoso y suero, con una sensibilidad similar al CGW⁵⁵. Finalmente, está la detección molecular del ADN del parásito directamente en humor vítreo. Aunque algunos estudios reportan sensibilidad del 16 al 55%^{10,55}, otros demuestran detección del parásito por encima del 70%⁵⁵. Parece que la efectividad de la PCR depende del momento en que se tome la muestra y es más efectiva en los primeros días de inicio de los síntomas, del estado inmune del huésped, aparentemente, en personas inmunocomprometidas y de acuerdo con el tamaño de las lesiones. Son más efectiva cuando éstas son mayores de dos diámetros de disco óptico⁵⁰. Esto también se cumple para las otras dos técnicas, cuyo rendimiento parece ser mejor en fases más tardías. Se encontró que la combi-

nación de las tres técnicas aumenta de forma notoria el rendimiento diagnóstico con pruebas biológicas, pues han llegado a ser del 83 al 85%^{55,56}. Por eso, lo ideal sería emplear las tres¹⁰. Sin embargo, en la mayoría de situaciones, es escasa la cantidad de líquido intraocular. Algunos autores proponen un algoritmo para optimizar el uso de las pruebas y sugieren priorizar la PCR durante los primeros diez días del cuadro, especialmente si el paciente es inmunosuprimido y si las lesiones son grandes^{10,53-55}. Usar preferiblemente el CGW si el cuadro es superior a diez días, si hay cicatrices, si la reacción de la cámara anterior es leve a severa, y asociarla con PCR en lesiones grandes. Finalmente, usar Western blot en muestras tomadas luego de 30 días del inicio de los síntomas⁵⁵. Dada la invasividad de la punción ocular, la detección del DNA en sangre parece una alternativa atractiva. Sin embargo, la demostración del parásito en sangre en episodios de retinocoroiditis, es exitosa en casos limitados, especialmente en inmunosuprimidos, en donde la enfermedad diseminada se espera más⁵²⁻⁵⁴. En el paciente inmunocompetente, la enfermedad ocular parece ser más por reactivación de quistes retinianos, con diseminación limitada. Por lo tanto, se requiere de más estudios para determinar la efectividad de la PCR específicamente en esta situación¹⁰.

Diagnóstico en personas inmunocompetentes

Como en pacientes inmunocompetentes la infección, regularmente, es asintomática, la detección o aislamiento del parásito es menos común, excepto para pacientes que tienen enfermedad severa con falla multiorgánica^{1,10}. En pacientes inmunocompetentes, el diagnóstico se fundamenta en la serología. Este permite un diagnóstico retrospectivo y se usa para determinar el estado inmune en algunas situaciones como el embarazo, especialmente durante fases tempranas, en pacientes con uveítis o retinocoroiditis sin historia de infección congénita, en el contexto de donación de órganos, para el estudio de donantes y receptores^{10,11}. También, en pacientes con síntomas inespecíficos como fiebre y adenopatías, la serología sigue siendo importante para realizar el diagnóstico diferencial con otras infecciones como citomegalovirus, Epstein Barr y VIH, así como de otras enfermedades hematológicas¹⁰.

Dada la poca relevancia clínica de la infección por *T. gondii* en personas sanas, el uso de métodos moleculares es limitado en estos pacientes. Sin embargo, es de gran interés para entender mejor la fisiopatología de la enfermedad, particularmente en relación con la diseminación del parásito, por ejemplo, en el contexto madre-feto^{10,20}.

Avances recientes

El uso creciente de la biología molecular y sus técnicas para el diagnóstico no solo de la toxoplasmosis sino de muchas enfermedades hereditarias e infecciosas en los últimos 10 años, permite hacer diagnósticos más precisos. Las pruebas descritas hasta ahora no brindan más información, aparte de decir si la infección está o no presente. Por eso, cada vez hay más interés en tener información sobre la clasificación genética, para entender mejor la epidemiología del parásito, su patogenicidad y virulencia^{17,18}. La genotipificación también juega un papel importante en estudios de biología poblacional, estudios epidemiológicos e identificación de fuentes de infección. La correlación entre el genotipo y el patrón de enfermedad también sería muy importante desde el punto de vista clínico²⁰.

Las nuevas técnicas basadas en identificación de alta resolución (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción PCR RFLP, microsatélites y tipificación de secuencias multilocus MLST), son importantes en estos estudios. Se basan en técnicas para detectar polimorfismos simples de nucleótidos y pequeñas mutaciones e identificar aislamientos genéticamente muy relacionados de *T. gondii*. Los dos primeros son más simples y costos efectivos^{21,36}. Más recientemente, las técnicas de secuenciamiento del ADN permiten una mejor caracterización genómica de fragmentos específicos del parásito²⁰. El avance de estas pruebas moleculares, permitió la descripción de tres genotipos del parásito. Tipo I, II y III, los cuales difieren aparentemente en comportamiento biológico y patrones epidemiológicos. Los genotipos tipo I y II se encuentran en casos de toxoplasmosis congénita, mientras que el tipo III se describió en animales^{17,18}. La recombinación sexual entre dos líneas clonales también facilita la evolución natural de la virulencia¹⁸. En modelos animales se ha encontrado que el genotipo I parece ser más virulento que los otros. También se ha descifrado, en parte, la distribución geográfica^{14,18}. El tipo II es el más común en Norteamérica y Francia, mientras que en Suramérica predomina el tipo I. Esto indicaría que existen diversidades en la virulencia, lo que explica la variación en la frecuencia y las manifestaciones de la enfermedad en distintas poblaciones. Es probable que con estudios futuros se pueda aclarar qué importancia tienen estas diferencias genotípicas en cuanto al riesgo de transmisión, de enfermedad, así como la respuesta al tratamiento médico¹⁸. También se implementan nuevas técnicas que aprovechan la técnica de la PCR Multiplex, en donde se utilizan varios cebadores que reconocen tres secuencias objetivo como el gen B1, REP 529 e ITS1 de forma simultánea, con alta sensibilidad y especificidad y ofrece resultados igual de rápidos para

mejorar el rendimiento en el diagnóstico⁵⁷. Otra técnica prometedora recientemente descrita es la amplificación isotérmica mediada por asas (del inglés Loop Mediated Isothermal Amplificación, LAMP)⁵⁸. Esta poderosa técnica de amplificación génica emerge como una herramienta de diagnóstico rápido y simple para la detección e identificación temprana de enfermedades infecciosas. El procedimiento es simple y puede completarse en menos de una hora con condiciones isotérmicas y con varios cebadores diseñados específicamente para reconocer varias secuencias del gen objetivo que se incuban en una sola reacción para detectarlas en una electroforesis en gel de agarosa y visualizarlas con tinción fluorescente, sin necesidad de un termociclador y se hace en un bloque calentador. Con estas ventajas y su operación, LAMP tiene aplicaciones clínicas potenciales en la vigilancia de enfermedades infecciosas, incluida la toxoplasmosis, en países en vías de desarrollo que carecen de equipos sofisticados y personal entrenado⁵⁸. Varios estudios muestran sensibilidades tan altas como el 87% para esta técnica con especificidad cercana al 100%, lo que sugiere que, cuando se compara con la PCR en tiempo real, LAMP tendría una efectividad comparable^{59,60}. Incluso, aplicarse como método de seguimiento y respuesta a tratamiento que busca el ADN en una muestra de orina, según estudios preliminares realizados en ratones⁶¹. Esto sugiere que LAMP puede ser una técnica promisoriosa para el diagnóstico de toxoplasmosis; sin embargo, se requieren más estudios que corroboren estos resultados iniciales, así como la validación de los mismos en humanos^{60,61}.

CONCLUSIÓN

La toxoplasmosis continúa siendo una enfermedad importante en todo el mundo, cuyos avances en el diagnóstico tienen una relevancia permanente enfocada hacia la prevención de enfermedad en la mujer embarazada, así como en el paciente con VIH o con otra forma de inmunosupresión.

Aunque los métodos diagnósticos convencionales continúan vigentes, además de ser la única alternativa en centros hospitalarios, su interpretación puede ser difícil en múltiples ocasiones. Por tal motivo, la biología molecular se presenta como una alternativa para disminuir este vacío en la identificación del parásito y se hace necesario que estas técnicas sean accesibles para toda la población, en especial en las personas que requieren pruebas confirmatorias para hacer el diagnóstico. Se necesita más investigación en las técnicas moleculares, no solamente la proveniente de otros países, sino, también, en nuestro medio para contribuir con el mejoramiento de las pruebas moleculares existentes y técnicas más estandarizadas, con mejor nivel de sensibilidad, comparables entre sí y que

dispongan de un control interno adecuado. La generación de conocimiento también se hace necesaria para la implementación de guías diagnósticas diseñadas con los mejores estándares de calidad, con el objetivo de tener el mejor rendimiento de las técnicas moleculares a la hora de evaluar a los pacientes con sospecha de toxoplasmosis. Igualmente, los avances en la biotecnología, ingeniería genética y medicina de laboratorio, deberán contribuir a crear cada vez mejores pruebas diagnósticas basadas en las técnicas moleculares para entender mejor la fisiopatología de la enfermedad, el comportamiento epidemiológico del parásito, así como las interacciones entre éste y su hospedero.

Algunos métodos serológicos como el Test de avididad tiene una baja disponibilidad en el país, y las técnicas moleculares, aunque son realizadas por algunos centros de referencia, son subutilizadas. Por otro lado, existe desconocimiento, por una parte importante del gremio médico, acerca de la existencia y aplicabilidad de estas pruebas en nuestro medio. Es por esto que es menester la difusión de este material científico con el fin de que la comunidad médica las conozca y que su buena utilización contribuya a un diagnóstico más temprano y a la prevención de secuelas en la población en riesgo. ■

REFERENCIAS

1. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96 Suppl 1:S205-1.
2. Remington JS, McLeod R, Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infants.* 4. ed. Philadelphia: Saunders; 1995. p. 140-267.
3. Maschke M, Dietrich U, Prumbaum M, Kastrup O, Turowski B, Schaefer, *et al.* Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*1999;23(11):1167-176.
4. Juliao O, Corredor A, Moreno GS. Estudio nacional de salud: toxoplasmosis en Colombia. Bogotá: Ministerio de Salud;1988.
5. Gómez-Marín J, Montoya de Londoño MT, Castaño-Osorio JC. A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío, Colombia and application of mathematical models to estimate incidences using age-stratified data. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57:180-186.
6. Rosso F, Les JT, Agudelo A, Villalobos C, Chaves JA, Tunubala GA, *et al.* Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Mar;78(3):504-8
7. Gallego-Marín C, Henao AC, Gómez-Marín JE. Clinical validation of a Western Blot assay for congenital toxoplasmosis and newborn screening in a hospital in Armenia (Quindío) Colombia. *J Trop Pediatr.* 2005; 52: 107-112.
8. Gómez-Marín JE, de-la-Torre A, Angel-Muller E, Rubio J, Arenas J, Osorio E, *et al.* First Colombian, multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e1195.
9. Gómez JE, Ruíz B, Silva P, Beltrán S, Cortés J, Montoya J, *et al.* Guía de práctica clínica para toxoplasmosis durante el embarazo y toxoplasmosis congénita en Colombia. *Infectio.* 2007;11(3):129-141.
10. Robert Gangneux F, Laure M. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):264-296.
11. Schwartzman J, Weller PF, McGovern BH. Diagnostic assays for toxoplasmosis infection [Internet]. Philadelphia: UpToDate; 2012 [citada 2013 Sep 17]. Disponible en:<http://www.uptodate.com.consultaremota.upb.edu.co/contents/diagnostic-assays-for-toxoplasmosis-infection>
12. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (toxoplasma). *Science.* 1948 Dec 10;108(2815):660-3
13. Palo Alto Medical Foundation. Guideline to clinicians [Internet]. Palo Alto, CA: Palo Alto Medical Foundation;2012 [citada 2013 Sep 17]. Disponible en: <http://www.pamf.org/Guideline>
14. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363:1965-76.
15. Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Mäkelä O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis.* 1989;159:736.

16. Lappalainen M, Koskela P, Koskiniemi M, Ammälä P, Hiilesmaa V, Teramo K, *et al.* Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J Infect Dis.* 1993 Mar;167(3):691-7
17. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (3): 941 – 945.
18. Rosso F, Agudelo A, Isaza A, Montoya JG. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colomb Med.* 2007;38(3):316-337.
19. Frenkel JK. Toxoplasmosis. In: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HJ, Lack EE, editors. *Pathology of Infectious Diseases.* Stamford: Appleton & Lange; 1997. p.1261.
20. Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:170 – 176.
21. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving Towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parásitology.* 2010;137:1–11.
22. Montoya MT, Gómez JE, Castaño JC, Marx C, Aubert D, Bonhomme A, *et al.* Avances diagnósticos en toxoplasmosis: PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas. *Act Med Col.* 1996;21(3):127-138.
23. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Identification Of Parasites Of Public Health Concern. Toxoplasmosis: *Toxoplasma gondii* [Internet]. Atlanta, GA: CDC; 2010 [citada 2010 Dic 17]. Disponible en: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxoplasmosis.htm>
24. Boyer KM. Diagnostic testing for congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20:59.
25. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware IL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1988;141:3584-3591.
26. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:1787-1792.
27. Cristina N, Derouin F, Pelloux H, Pierce R, Cesbron-Delauwn MF, Ambroise-Thomas P. Detection of *Toxoplasma gondii* by "Polymerase Chain Reaction" (PCR) technique in AIDS infected patients using the repetitive sequence TGR1E. *Pathol Biol Paris.* 1992;40:52-55.
28. Guay JM, Dubois D, Morency MJ, 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 – 207.
29. Homan WL, 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.
30. Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernaut 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.
31. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, Reischer GH, Kratochwill K, Förster-Waldl E, *et al.* Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63:10-15.
32. Bastien P, Jumas-Bilak E, Varlet-Marie E, Marty P. Three years of multi-laboratory external quality control for the molecular detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid in France. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:430–433.
33. Nagy B, Bán Z, Beke A, Nagy GR, Lázár L, Papp C, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. *Clin Chim Acta.* 2006;368:131-137.
34. Menotti J, Garin YJF, Thulliez P, Se´rugue MC, Stanislawiak J, Ribaud P, *et al.* Evaluation of a new 5¢-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:363-368.
35. Jenum PA, Holberg-Petersen M, Melby KK, Stray-Pedersen B. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. *AI'MIS.* 1998;106:680-686.
36. Turcekova L, Spisak F, Dubinsky P, Ostro A. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* in pregnant women. *Bratisl Lek Listy.* 2012;113(5):307- 10.
37. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Brun S, Dalle F, *et al.* Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *toxoplasma gondii* from simulated specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3216-3222.
38. 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- 247.
39. Thalib L, Gras L, Romand S, Prusa A, Bessieres MH, Petersen E, *et al.* Prediction of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *BJOG.* 2005; 112: 567–574.
40. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol.* 1990;28(10):2297–2301.

41. Hohlgedld P, Daffso F, Cosat JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med.* 1994;331:695-699.
42. Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissoud C, Peyron F, Garcia-Meric P, *et al.* Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet Gynecol.* 2010;115(4):727-33
43. Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol.* 2001;97:296-300.
44. Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:797-802.
45. Kompalic C. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramienta molecular en el diagnóstico de la toxoplasmosis aguda. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2006.
46. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Marty P. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1594-1602
47. Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pralong F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(2):74 – 6.
48. Khalifa KES, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke VK. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2813-2819.
49. 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(10):5044 – 7.
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.* 2010; 59(6):641-7.
51. Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C, Jiménez N, Pinillos T, Dorta-Contreras AJ, *et al.* Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2009 Mar 6;6:2.
52. Ponce NC, Gomez 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. *Infectio.* 2003; 7(1): 8 – 14.
53. Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.* 1996; 23: 277-82.
54. Garweg JG, Jacquier P, Boehnke M. Early aqueous humor analysis in patients with human ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 996 – 1001.
55. Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, *et al.* Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2131 – 2135.
56. Villard O, Filisetti D, Roch-Deries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 3537 – 3541.
57. Rahumatullah A, Khoo BY, Noordin R. Triplex PCR using new primers for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol.* 2012;131 (2): 231 – 8.
58. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008;18(6):407-21.
59. Lau YL, Meganathan P, Sonaimuthu P, Thiruvengadam G, Nissapatorn V, Chen Y. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3698 – 702.
60. Lin Z, Zhang Y, Zhang H, Zhou Y, Cao J, Zhou J. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Vet Parasitol.* 2012; 185 (2-4): 296 – 300.
61. Hu X, Pan CW, Li YF, Wang H, Tan F. Urine sample used for detection of *Toxoplasma gondii* infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Folia Parasitol (Praha).* 2012 Feb;59(1):21-6.