

Avances diagnósticos en toxoplasmosis

PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas*

María Teresa Montoya, Jorge Enrique Gómez, John Carlos Castaño, Cathy Marx, Dominique Aubert, Annie Bonhomme, Jean Michel Pinon

El diagnóstico de la toxoplasmosis requiere la realización de pruebas de laboratorio; en esta revisión se presenta un resumen de las técnicas que han aparecido en los últimos años y que han aportado nuevos criterios para afirmar la presencia de una infección clínicamente importante. Se discute la cinética de anticuerpos y los límites y ventajas de las técnicas de detección de anticuerpos y del parásito, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se presenta una guía para la interpretación de resultados en las diversas manifestaciones clínicas de esta infección. Grandes avances y mejorías notables en las técnicas de diagnóstico se han realizado pero se hace aún necesario mejorarlas y simplificarlas para lograr un mayor acceso a su aplicación.

Introducción

La toxoplasmosis humana es provocada por el *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular obligado de la familia de las coccidias (Figura 1). La infección por *Toxoplasma gondii* es benigna en el adulto con adecuado sistema inmunitario, y es generalmente asintomática o con síntomas no específicos; sin embargo existe la necesidad de hacer un diagnóstico precoz de infecciones recientes en varias situaciones. En el caso de la primoinfección en el embarazo por el riesgo de transmisión al feto, lo cual puede llevar a una toxoplasmosis congénita en 17 a 25% de los casos, si se adquiere en el primer o segundo trimestre y 65% en el tercero (1). En los pacientes inmunocomprometidos por el riesgo de desarrollar una complicación grave (por ejemplo la toxoplasmosis cerebral) debido a reactivación con proliferación no controlada del parásito. En los recién nacidos con síntomas de síndrome TORCHS (sigla que agrupa los signos y síntomas producidos por las infecciones congénitas por toxoplasma, rubéola, citomegalovirus, herpes virus, sífilis u otros) debido a las se-

cuelas que puede ocasionar si no se hace un diagnóstico oportuno que permita el tratamiento precoz y que evite la aparición de las secuelas tardías como el retardo en el desarrollo psicomotor o la retinocoroiditis (1).

La importancia de esta parasitosis en Colombia se puede apreciar en las estimaciones basadas en los estudios sobre la frecuencia de adquisición durante el embarazo (2), que permiten establecer que cada año pueden nacer en el país entre 600 y 3.600 niños con la infección congénita y los informes (3) que señalan a

*Trabajo realizado durante la pasantía de estudios de María Teresa Montoya, financiada por el programa de Formación de Investigadores "Crédito BID-Colciencias", en el Laboratorio de Parasitología del Hospital "Maison Blanche", Centro Hospitalario Universitario, en Reims (Francia).

Dra. María Teresa Montoya: Becaria Programa BID-Colciencias, Docente Investigadora. Centro de Investigaciones "Manuel Elkin Patarroyo". Facultad de Medicina de la Universidad del Quindío; Dr. Jorge Enrique Gómez: Becario Programa BID-Colciencias Laboratoire de Parasitologie "Hôpital Maison Blanche" y Equipo 4, Unidad INSERM U-314, "Conformations Cellulaires et Moléculaires". Reims (Francia); Dr. John Carlos Castaño: Docente investigador, Centro de Investigaciones "Manuel Elkin Patarroyo". Facultad de Medicina de la Universidad del Quindío; Dres. Cathy Marx, Dominique Aubert, Annie Bonhomme, Jean Michel Pinon: Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, et Equipe 4 INSERM U-314, Hôpital Maison Blanche. Reims (Francia).

la toxoplasmosis como la segunda causa de síndrome TORCHS después de la sífilis. No existen trabajos sobre la frecuencia de encefalitis toxoplásmica en los pacientes con SIDA pero el impacto debe ser grande si se tiene en cuenta que 50% de la población colombiana ha tenido contacto con el parásito (4). Sabiendo que 30 a 40% de los pacientes con SIDA que han tenido la infección en el pasado desarrollan una encefalitis por este parásito (5) y que hay 50.000 casos de infección por HIV estimados por el Ministerio de Salud; por lo menos entre siete y 10.000 pacientes tendrían el riesgo de desarrollar esta forma clínica.

Debido a que no existen síntomas específicos de esta infección, la sospecha clínica requiere siempre confirmación por laboratorio. La estrategia diagnóstica puede basarse en técnicas serológicas que midan anticuerpos específicos o métodos cualitativos y semicuantitativos que establezcan perfiles inmunológicos comparados, que pueden distinguir entre anticuerpos maternos y fetales o una neoproducción. Cuando se sospecha un déficit inmunitario o una producción débil de anticuerpos, como en los casos de inmunosupresión o infección fetal se puede emprender la detección directa del parásito tanto en ratón como en cultivo celular o evidenciar su presencia por la amplificación de un segmento del ADN del parásito. En esta revisión tuvimos como objetivo hacer una puesta al día sucinta sobre los avances recientes en las técnicas diagnósticas utilizadas para la toxoplasmosis humana, con énfasis en los que han aparecido en los últimos diez

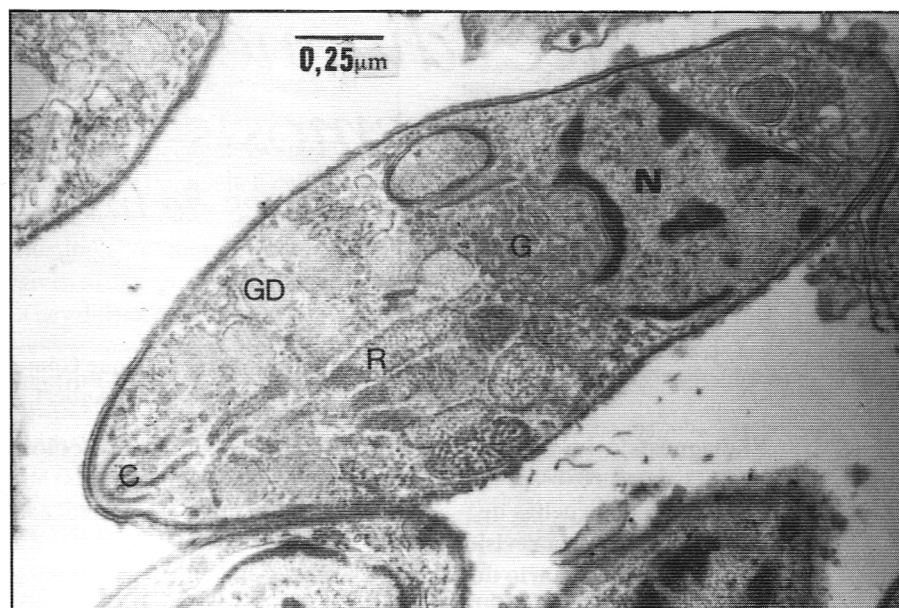


Figura 1. Ultraestructura de un taquizoíto de *Toxoplasma gondii* ($\times 27.000$). Corte longitudinal. Contraste con acetato de uranilo. N= Núcleo; G= Aparato de Golgi; GD= Granulos Densos; R= Rhoptrías; C= Región conoide. (Equipo 4 "Relaciones Huésped-Parásito". Unidad 314 INSERM, Reims Francia).

años, analizando sus limitaciones, ventajas y los criterios aportados. Por un enfoque práctico nos hemos limitado a las pruebas que han demostrado una real utilidad y aplicación cotidiana, por ello no discutimos la detección de antígeno circulante que ha demostrado muy pobre eficiencia para el diagnóstico (6). Tampoco discutimos las técnicas que miden IgG las cuales son ampliamente conocidas y extendidas en su aplicación. Sólo presentamos un breve comentario sobre la estrategia de medición de la avidéz en IgG y el test de aglutinación diferencial (AC/HS) ya que son de introducción más reciente.

Cinética de los anticuerpos

El diagnóstico se puede basar en pruebas serológicas que evidencian la presencia de inmunoglobulinas específicas IgG, IgM,

IgA e IgE. Es importante conocer la cinética de aparición de los anticuerpos (Figura 2) y el tiempo de duración de cada isotipo de inmunoglobulinas para realizar la interpretación de las pruebas serológicas y datar el inicio de la infección. Como se mencionó, las infecciones clínicamente importantes pertenecen (salvo en el caso de los inmunosuprimidos) a infecciones recientes. La cinética va a depender de la técnica de detección de anticuerpos que se utilice y los métodos de fabricación del antígeno. El patrón que se menciona a continuación se refiere a lo que se halla por inmunofluorescencia indirecta (IFI) o las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) o en la aglutinación de alta sensibilidad (ADHS) en el caso de la IgG y a las técnicas de inmunocaptura (IC) en los otros casos. La IgG aparece una a tres semanas des-

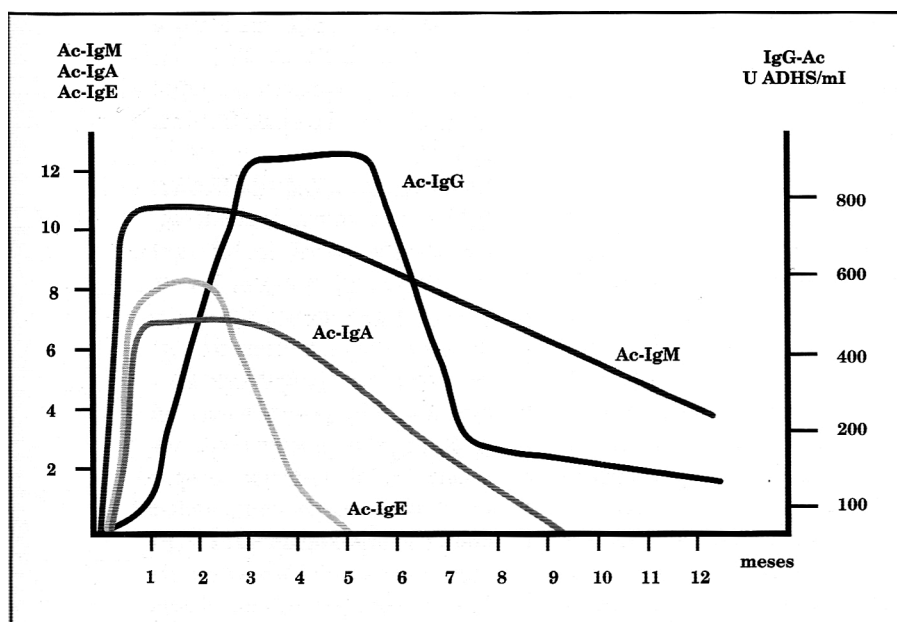


Figura 2. Evolución de los títulos de anticuerpos IgG (técnica ADHS), resultados presentados en unidades por ml y de anticuerpos IgM, IgA e IgE según la técnica de IC con resultados presentados en cruces (nivel de aglutinación 0 a 12) en 52 casos de seroconversión (Laboratorio de Parasitología, Grupo Pluridisciplinario de Toxoplasmosis, Hôpital Maison Blanche, Reims).

pués de adquirida la infección y alcanza su máximo nivel tres a seis meses después para luego descender y quedar en niveles bajos por el resto de la vida. La elevación de IgG específicas para *Toxoplasma* en muestras tomadas con un intervalo de cuatro semanas puede ser utilizado como criterio diagnóstico pero tiene el inconveniente de que retarda el diagnóstico. La detección de IgM fue propuesta como marcador de infección activa. Inicialmente fue realizada a través de la inmunofluorescencia indirecta (IFI-IgM o prueba de Remington) pero no tiene una buena sensibilidad ya que la detección puede ser bloqueada por la presencia de altos niveles de IgG o de factor reumatoideo; sólo 10 a 25% de las toxoplasmosis agudas son positivas por esta técnica (7). Más adelante se propuso la estrategia de IC la cual detecta la IgM a partir de la

primera o segunda semana de infección y mejoró notablemente la sensibilidad, pero con ella la IgM permanece detectable entre seis a 18 meses e incluso, dependiendo de variaciones individuales, hasta uno a dos años después de la primoinfección. Adicionalmente pueden existir "IgM naturales" (inmunoglobulinas circulantes del isotipo IgM que reconocen al *Toxoplasma* aún sin haber ocurrido una infección). Buscando otros marcadores serológicos que posibiliten el diagnóstico de una infección aguda desde la primera muestra, se propuso la determinación de IgA e IgE las cuales tienen una duración más corta en circulación y permiten ser utilizadas en el diagnóstico de infección reciente. Los anticuerpos IgA aparecen dos semanas después de la IgM y persisten de seis a ocho meses, la tasa más alta se alcanza al mes. Las IgE

son más precoces, alcanzan un nivel máximo 15 días a tres semanas después de la infección y tienen una regresión rápida, inferior a cuatro meses. Otra ventaja de estos isotipos es que no existen anticuerpos IgA o IgE naturales (7, 8).

Técnicas serológicas

IgG de avidez

Esta técnica es una adaptación de la prueba de ELISA IgG para medir la avidez del anticuerpo. Se basa en que los anticuerpos producidos durante la fase aguda de la infección tienen una menor avidez. El antígeno es soluble, puede ser citoplasmático o de membrana. La elución del antígeno puede hacerse con urea o dietilamina, siendo seis M la concentración de urea óptima para la separación de índices de avidez (9). Una dilución del suero se incubaba sobre estas eluciones. Después de lavar se añade un conjugado anti IgG unido a la enzima y la reacción colorimétrica se lee en el espectrofotómetro. Las lecturas de absorbancia de las placas lavadas con el agente de elución (AE) y tampón de fosfatos (PBS) son utilizadas para calcular el índice de avidez (IA):

$$IA = \frac{\text{Absorbancia después de lavar AE}}{\text{Absorbancia después de lavar PBS}} \times 100\%$$

En el caso de la toxoplasmosis aguda, el índice de avidez es menor de 45%, y en el caso de la toxoplasmosis crónica se ha informado índices de avidez mayores de 50% (8). La toxoplasmosis ganglionar de menos de tres meses de duración se asocia con IgG de avidez baja, con sensibilidad de 76% y especificidad de 96% para el diagnóstico (9).

No se encuentran diferencias significativas de IgG de avidez en pacientes HIV positivos con o sin toxoplasmosis cerebral. Medidas seriadas de IgG de avidez permiten la distinción entre los anticuerpos producidos en niños con toxoplasmosis congénita y los pasivos, provenientes de la madre en los niños no infectados. Los niños infectados congénitamente muestran un marcado descenso de la IgG de avidez en el primer año de vida a diferencia de los no infectados que no muestran cambio con el incremento de la edad (9).

Para la toxoplasmosis adquirida durante el embarazo el valor predictivo positivo en una cohorte finlandesa evaluada por varias técnicas fue de 100%. El límite de esta técnica es que requiere la presencia de IgG, que la hace de poca utilidad para el diagnóstico precoz. El principal aporte es su especificidad para la fase aguda (10).

Técnica de aglutinación diferencial (AC/HS)

La técnica de AC/HS compara los títulos obtenidos con taquizoítos fijados en formalina (antígeno HS) con aquellos fijados en acetona o metanol (antígeno AC) (11). Suzuki et al (12), informaron que la preparación AC contiene antígenos estadio-específicos del ciclo vital del parásito, que son reconocidos por anticuerpos IgG en la fase precoz de la infección. Este método se utiliza sólo en adultos, cuyos sueros contienen tanto IgG como IgM y en los cuales es necesario definir si existe una infección reciente. En un estudio reciente esta prueba identificó a todas las mujeres que seroconvirtieron durante el em-

barazo aunque el patrón agudo había sido evidente primero con las pruebas para IgM, IgE o IgA (11).

Técnicas de inmunocaptura (IC)

El principio de IC se basa en una separación inicial del isotipo de anticuerpos del cual se quiere realizar la detección. Para ello un anticuerpo monoclonal antiisotipo humano se fija en una placa, el suero sometido a la prueba se añade e incuba con la placa, un lavado elimina todos los otros isotipos no fijados. La revelación se puede realizar tanto inmunoenzimáticamente (ELISA doble sandwich o reversa) o utilizando el principio de aglutinación (técnicas IC) añadiendo el parásito formalizado entero (antígeno figurado). Con este mismo principio se pueden cuantificar anticuerpos de isotipos IgM, IgA e IgE. La suspensión de antígeno, en las IC, se añade en tres pozos, utilizando en cada uno cantidades crecientes. Cuando hay anticuerpos antitoxoplasma los parásitos se adhieren a la pared del pozo y forman un velo; cuando no hay anticuerpos los parásitos se depositan formando un botón en el fondo del pozo. La lectura se expresa en cruces que van de cero a cuatro en cada pozo, según el grado de aglutinación; así el puntaje máximo que se puede obtener es 12. Se considera positivo para IgM un puntaje siete o más, para IgA un puntaje dos o más y para IgE un puntaje 0.5 o más. Tiene como ventajas que es una reacción simple, no afectada por factores reumatoideos y que la lectura puede ser automatizada (13). Sus inconvenientes son la lectura difícil si no se cuenta con un

equipo lector de aglutinación que elimine la subjetividad y en que es sensible a la presencia de IgM residuales, en el caso de ISAGA-IgM (14).

Inmunocaptura IgM: la ISAGA IgM al ser comparada con técnicas clásicas como la IFI IgM (prueba de Remington) y la hemaglutinación indirecta con 2-mercaptoetanol, muestra una excelente especificidad (98.4%); esto se explica por la utilización de anti-IgM monoclonal y la ausencia de falsos negativos por los fenómenos de competición con IgG antitoxoplasma (13). El mayor valor de la detección de IgM es para determinar si una mujer embarazada no se ha infectado recientemente (15). Una prueba negativa descarta virtualmente la infección reciente a menos que el suero sea tomado en una fase tan temprana que la respuesta de anticuerpos no se haya desarrollado. Setenta a setenta y cinco por ciento de los recién nacidos con infección congénita tienen IgM. Puede ocurrir traspaso de IgM materna al momento del parto, como hemos tenido la experiencia en un estudio de seguimiento de madres con la infección adquirida durante el embarazo, en el Quindío. Una muestra a partir del tercer día de nacido confirmará si la IgM es fetal o materna. Toda muestra positiva por IgM ISAGA en cordón umbilical debe ser confirmada.

Inmunocaptura IgA: la IgA por IC puede detectarse en toxoplasmosis aguda en 80 a 95% de los casos y son más raramente detectables en una infección crónica que los IgM (8). Su mayor interés reside en el diagnóstico de la infección congénita (16). En nuestra experiencia en la Uni-

versidad del Quindío encontramos el hijo de una mujer con infección adquirida y diagnosticada durante el embarazo, cuyo examen IgM era negativo, pero la prueba para IgA antitoxoplasma fue reactiva. Esto está de acuerdo con la experiencia publicada por otros autores. La mitad de los casos congénitos sin IgM durante el primer mes de vida tienen IgA (17,18).

Inmunocaptura IgE: la detección de anticuerpos IgE específicos es muy útil. Bierer (19) en un estudio bioclínico demostró que 90% de los pacientes con signos clínicos y 60% de los asintomáticos, tenía IgE específicas asociadas con IgG, IgM e IgA durante la fase aguda de la enfermedad. Como las IgA estos anticuerpos son detectados en inmunidades viejas sólo en contextos clínicos particulares. En 23 pacientes estudiados por Pinon et al (20) los IgE no persistieron más allá de cuatro meses. Sin embargo pueden existir variaciones individuales excepcionales, Wong et al (21) informaron una paciente con IgE detectable 38 meses después de la seroconversión, y nosotros (Montoya MT et al, datos no publicados) tuvimos una paciente con IgE detectable 36 meses después de haber dado a luz a un niño con toxoplasmosis congénita.

Los IgE se hallan en la presentación clínica inicial (67% por IC en una muestra de 12 niños) o en la recrudescencia de la toxoplasmosis congénita; en adultos con linfadenopatía persistente (88% por IC en 17 pacientes) y en casos de retinoroiditis (25% por IC en 11 pacientes), es así un marcador de toxoplasmosis evolutiva (20, 21). En una serie

de 52 niños con la infección congénita fue encontrado en 25% de los casos y siempre asociado a IgM o a IgA; por lo tanto no constituyó un criterio adicional de diagnóstico (7).

Durante la infección adquirida en el embarazo, Pinon et al (20) encontraron IgE en 25 (86%) de 29 mujeres y Wong et al (21) en 100% de ocho madres estudiadas. En retinoroiditis asociada a presencia de IgM o IgA Wong et al (21) encontraron IgE en nueve de nueve pacientes. En encefalitis toxoplásmica la IgE fue detectada en 83% de 12 adultos por IC y en 50% por ELISA. En resumen, los resultados del estudio de Wong et al (21) muestran que la IgE ELISA es más sensible en los casos congénitos, linfadenopatías y coriorretinitis y la IgE por IC en el estudio de la embarazada. La IC fue más precoz y detectó por menos tiempo esta inmunoglobulina.

Estudios en sangre fetal: La búsqueda de los diferentes isotipos en sangre fetal a través de las técnicas IC, asociada a la investigación del parásito con cultivo o PCR, son útiles para el diagnóstico y tratamiento precoz de la toxoplasmosis congénita (22, 23). Aunque la síntesis de IgM fetal es lenta y débil, estudios prospectivos han revelado que ésta se detecta en 25% de los fetos infectados (24). La investigación de IgA específica aporta un complemento al diagnóstico, en presencia o no de IgM específica. Las IgE antitoxoplásmicas son igualmente detectadas en estas muestras; su dosificación constituye entonces una ayuda para afirmar la contaminación del recién nacido (25).

Perfiles inmunológicos comparados por la técnica de inmuno filtración enzimática - Enzyme Linked Immuno Filtration Assay-(PIC-ELIFA)

Este método de detección de anticuerpos consiste en realizar primero una electroforesis con antígeno soluble de *Toxoplasma gondii* y luego una filtración con anticuerpos anti IgG, IgM, IgA o IgE marcados con una enzima (fosfatasa alcalina) y la revelación de los arcos de precipitación obtenidos (Figura 3). Se considera positiva cuando se observan uno o más arcos. Permite comparar varios sueros frente a diferentes complejos antígeno-anticuerpo. Se utiliza en el diagnóstico de toxoplasmosis congénita tanto prenatal, donde se compara la sangre fetal y la de la madre, como después del nacimiento, donde se comparan el suero de la madre en el momento del parto, la sangre del cordón umbilical y la sangre del bebé en los días uno, siete y diez. La aparición de un arco diferente en el suero del bebé o presente en la madre pero más marcado en el niño, indica neosíntesis de anticuerpos y, por lo tanto, evidencia de una toxoplasmosis congénica (26).

La síntesis de anticuerpos IgG, IgM e IgE antitoxoplasma son claramente demostrables en niños infectados al nacer. La comparación de perfiles inmunológicos de la madre con el niño y los anticuerpos de isotipos IgG, IgM e IgE representan un criterio potencial de infección fetal. Existen muchas combinaciones que permiten la diferenciación de anticuerpos transmitidos por la madre, de los fetales o los del neonato. Por esta razón los PIC-ELIFA presentan 84% de posi-

tividad desde el día cero hasta el 45. lo cual la hace mejor que la ISAGA IgM. la ELISA IgM doble o reversa, con las cuales la contaminación fetal sólo es detectada en 76% de los casos durante los primeros cinco meses de vida (26).

Publicaciones posteriores refieren que los niños con toxoplasmosis congénita son positivos en 89% entre el día cero y el 150 por ELIFA, 71% por ISAGA IgM y 14% por IFI IgM. La detección por ELIFA de IgM o IgE específicas en líquido cefalorraquídeo (LCR) al nacer constituye un signo de mal pronóstico (hidrocefalia); lo mismo la aparición o reaparición, aun recibiendo tratamiento, de IgM o IgE séricas, lo cual debe inducir a la búsqueda de coriorretinitis (27). La asociación del método ELIFA y la técnica de ISAGA IgM obtiene una sensibilidad y especificidad de 90% de los casos congénitos al día 60 (28). Recientemente se utilizó PIC ELIFA para comparar sueros tomados en forma consecutiva de pacientes inmunosuprimidos y pudo detectar una variación en 12 de 16 pacientes, mientras que la técnica corriente para IgG lo detectó sólo en nueve (29).

Detección del parásito

La detección directa del parásito puede ofrecer un criterio adicional a los métodos serológicos y es muy útil en casos particulares en los cuales, debido a la inmadurez o la alteración del sistema inmunitario, haya una producción insuficiente de anticuerpos. El parásito puede detectarse en diferentes muestras así: en la toxoplasmosis congénita del líquido amniótico, sangre fetal, placenta o sangre de cordón um-

bilical. En la toxoplasmosis de los pacientes inmunosuprimidos a partir de sangre, médula ósea, LCR, lavado broncoalveolar o de biopsia cerebral.

A continuación se discuten los diferentes métodos para poner en evidencia el parásito en estas muestras.

Inoculación en ratón

Puede realizarse tanto en muestras de líquidos biológicos por ejemplo líquido amniótico o sangre fetal; y a partir de tejidos obtenidos por biopsia después de digestión con tripsina; los resultados se conocen alrededor de 30 a 45 días. A partir del séptimo día después de la inoculación se puede buscar el parásito en el líquido peritoneal del ratón. A las cuatro semanas se pueden realizar pruebas serológicas al ratón por aglutinación directa. IFI o ELISA. A la sexta semana se buscan los quistes intracerebrales (taquizoítos o bradizoítos de *Toxoplasma*) sacrificando el ratón (30, 31).

Cultivos celulares

El cultivo celular es una técnica delicada y sensible a contaminaciones, pero evidencia más rápidamente que la anterior los parásitos a partir de diferentes muestras: líquido amniótico, sangre fetal, sangre de la madre, biopsias, lavado broncoalveolar, etc. Las células más utilizadas son los fibroblastos embrionarios humanos adherentes (tipo MRC5) o la línea celular proveniente de leucemia monocítica humana no adherente (THP 1). El examen directo de los cultivos al microscopio invertido aporta poca información porque el efecto citopatógeno provocado por los

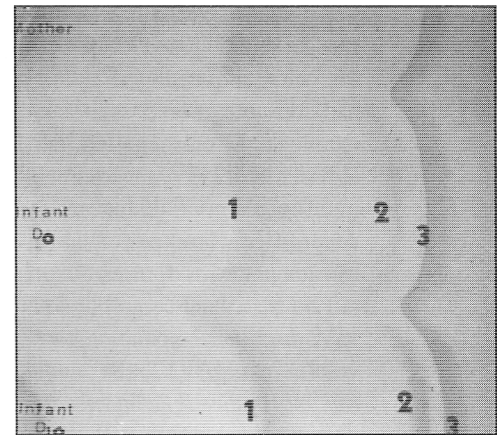


Figura 3. PIC ELIFA para IgG en un caso de toxoplasmosis congénita. Suero de la madre al momento del parto, arriba; suero del niño al día 0 (mitad, D0) y al día 10 de vida (abajo, D10). Estos sueros dieron el mismo resultado por IFI IgG (160 UI/ml). El PIC muestra la existencia de anticuerpos fetales (1) -arco sin correspondiente materno- y transmisión de anticuerpos maternos más una neosíntesis fetal (2) -arco con correspondiente materno, se observa una continuidad con el arco materno pero migra más adelante lo cual indica una concentración más importante en el suero el feto-, el arco (3) muestra igual intensidad y posición, evidencia clara de anticuerpos transmitidos por la madre sin neosíntesis fetal (Laboratorio de Parasitología, Hôpital Maison Blanche, Reims).

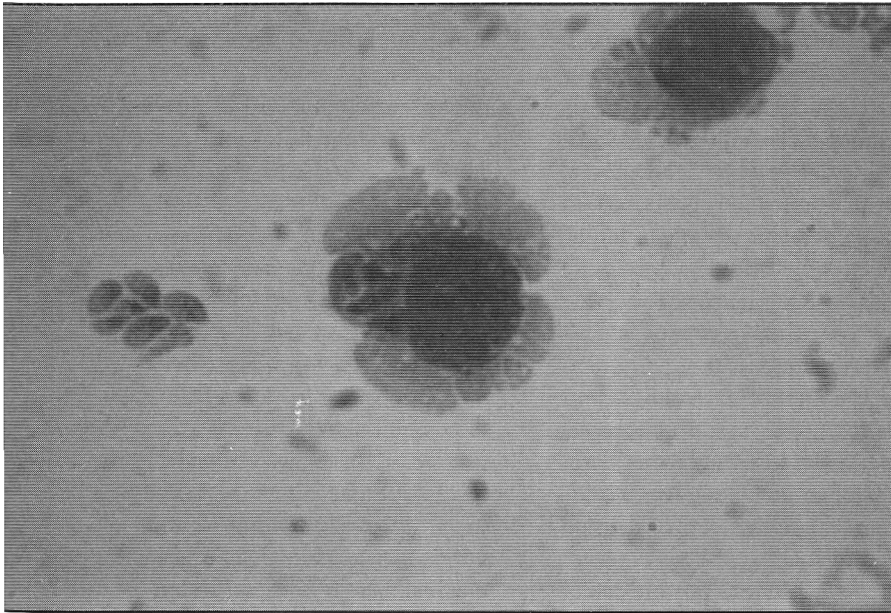


Figura 4. Células de la línea proveniente de leucemia monocítica humana, THP1 en cultivo celular (microscopio de luz, x 40). Se observan taquizoítos extracelulares de *Toxoplasma gondii* y una célula con varios parásitos dentro de una vacuola parasitófora.

toxoplasmas en desarrollo es poco característico y tardío, pero la coloración de los cultivos por Giemsa e inmunofluorescencia directa permiten sin equivocación identificar los parásitos después del cuarto día de incubación (31) (Figura 4). El cultivo en células THP1 es más sensible que en células MRC5 y al ser comparado con la inoculación en ratón esta última es la que tiene mayor sensibilidad (32, 33). La sensibilidad de las técnicas de cultivo para el diagnóstico es del orden de 75% para sangre fetal y 70% para el líquido amniótico cuando las pruebas serológicas no son concluyentes (22). La demostración rápida en cultivo celular del *Toxoplasma* en sangre o tejidos en casos de toxoplasmosis congénita o en pacientes inmunosuprimidos, se ha mostrado como una ayuda crucial para el inicio precoz de

la terapia (34). El cultivo en fibroblastos MRC5 a partir de lavado broncoalveolar ha sido utilizado conjuntamente con el examen directo de extendidos coloreados con azul de metileno rápido e inmunofluorescencia directa (detección del parásito) en el diagnóstico de toxoplasmosis en pacientes con SIDA; los autores estiman que son métodos de gran ayuda para determinar la incidencia de manifestaciones pulmonares en estos pacientes (35).

Sin embargo el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral debe establecerse lo más pronto posible por el hallazgo de varios parámetros clínicos, radiológicos, serológicos y por la investigación del parásito en el LCR o en biopsia cerebral (36).

Biología molecular

La técnica de PCR ha sido adaptada al diagnóstico de la toxo-

plasmosis, utilizando como blancos de amplificación genes únicos (P30) (37, 38) o repetidos como el gen B1 (39, 40), la secuencia TGR1E (41) o el ADNr 18S (42, 43) del ADN de *Toxoplasma gondii*. Una de las grandes ventajas de la reacción de PCR es su extrema sensibilidad, que permite la detección a partir de un solo parásito que equivale a 0.05-0.2 picogramos de ADN (44). El esporozoito de *T. gondii* contiene aproximadamente 0.1 pg de ADN; este es el ADN contenido en todos los estados del parásito excepto en el cigoto que es diploide (45). Esta gran capacidad de detección crea la necesidad de utilizar estrictos protocolos para impedir resultados falsos positivos (46). El método que ha demostrado mayor eficacia es la utilización de sistemas químicos alternativos que identifican posibles contaminaciones como la técnica basada en la utilización de nucleótidos UTT en lugar de dTTP y la posterior utilización de la enzima UNG (uracil-N-glicosilasa). También es importante la detección de inhibidores de la reacción de amplificación que pueden originar resultados falsos negativos (47). La técnica de PCR en el diagnóstico de la toxoplasmosis aporta un progreso indiscutible en aquellos casos donde los exámenes clínicos y serológicos son inoperantes, así como una mayor rapidez para realizar el diagnóstico, dando resultados en 24 horas (48).

En el trabajo reciente de Hohlfeld et al (49) en París, en 2632 mujeres con infección adquirida durante el embarazo, se encontró una sensibilidad de 97.4% para el diagnóstico de infección fetal con la realización del PCR

en muestras de líquido amniótico, lo cual la coloca en un rango muy superior frente a los métodos convencionales (inoculación de líquido amniótico y sangre fetal en ratón, cultivo celular de líquido amniótico e identificación de IgM específica en sangre fetal) cuya sensibilidad no llegó sino hasta 89.5%. Los estudios de Johnson (37) tuvieron resultados limitados con la detección de PCR positivo en muestras de placenta y sangre de cordón umbilical en niños no infectados, debido a la contaminación de los especímenes con sangre materna. En el trabajo de Hoffheld et al (49) esto se superó mediante un sistema selectivo de tampón de lisis que permitía la detección de las muestras contaminadas con sangre materna, esto explica la sensibilidad de 97.4% y el valor predictivo negativo para ese grupo de pacientes de 99.7%. Así el protocolo propuesto por este grupo permite una mejoría significativa del método y una disminución de los riesgos debidos a la cordocentesis, pues estos resultados se logran con la sola muestra de amniocentesis.

En Alemania Khalifa et al (50) en un estudio de 148 pacientes inmunosuprimidos con sospecha clínica de toxoplasmosis cerebral o extracerebral evaluados por PCR, concluyeron que el examen de sangre por PCR puede ser muy útil para el diagnóstico pues la mayoría de estos casos estuvieron asociados con diseminación de los parásitos en sangre periférica. El análisis de sangre por PCR en pacientes con toxoplasmosis cerebral tiene valor solamente si el paciente no está recibiendo tratamiento profiláctico o terapéutico o si la in-

fección está asociada con diseminación del parásito o encefalitis severa lo cual, sin embargo, no es común en los casos resultantes de reactivación local de quistes cerebrales latentes.

Otros autores (51) describen un caso donde fue posible la amplificación, en sangre y suero, de ADN específico para *Toxoplasma* varios días después de iniciar tratamiento con pirimetamina sulfadiazina, en un paciente con SIDA y toxoplasmosis diseminada; los resultados fueron rápidamente obtenidos permitiendo un tratamiento específico oportuno.

Mediante PCR es posible detectar parásitos en diferentes especímenes clínicos. La PCR puede aportar un criterio diagnóstico adicional en el humor acuoso de pacientes con retinocoroiditis por *Toxoplasma* (52). Cazenave et al (53) en 65 casos encontraron una sensibilidad de 38% por PCR y 42% utilizando el coeficiente de Witmer (relación anticuerpos humor acuoso con anticuerpos en suero), sin embargo cuando ambos criterios, PCR y Witmer fueron utilizados, el diagnóstico se logró en 38 casos (58%). No hubo falsos positivos en el humor acuoso de 10 pacientes con una uveitis no toxoplásmica. La mayor limitante fue la cantidad de la muestra para lograr la detección del parásito. También es posible el estudio por PCR de tejidos fijados en formalina, esto es una ventaja cuando el material debe ser transportado o almacenado y es posible aunque el ADN se haya degradado (54).

Recientemente se ha introducido una mejoría técnica combinando el principio de filtración en membrana utilizado para el

ELISA al PCR, esto ha reducido notablemente el tiempo de hibridización (Figura 5) (55). Vistos en conjunto, estos reportes demuestran la manera contundente como se ha introducido el PCR al diagnóstico de la toxoplasmosis humana, como lo ha hecho en otras infecciones. Una vía de desarrollo futuro para la amplificación génica es la diferenciación entre cepas. Sibley y Boothroyd (56) demostraron la posibilidad de diferenciar entre cepas virulentas y no virulentas. Aunque aún no se ha demostrado que las formas clínicas humanas sean debidas exclusivamente a la cepa virulenta, lo cual permitiría definir el pronóstico y decidir qué pacientes es necesario tratar. Se ha demostrado que las diferencias entre cepas son importantes en el diagnóstico. Gross et al (57, 58) reportan varias situaciones en las cuales el diagnóstico serológico fue impedido por la presencia de anticuerpos específicos para una cepa y que no reconocían el antígeno utilizado en el ELISA o el ISAGA convencional. Esto podría explicar muchos casos de falsos resultados negativos dado el hecho de que la mayoría de las técnicas comercializadas utilizan solamente la cepa RH como fuente de antígeno.

Criterios diagnósticos

A continuación se presentan algunos criterios diagnósticos, incluyendo los aportados por las nuevas técnicas, que pueden servir como guía para la interpretación de resultados. Sin embargo, éstos dependerán finalmente de las técnicas escogidas para el estudio, la validación de los resultados que se obtienen de un laboratorio a otro y de la situa-

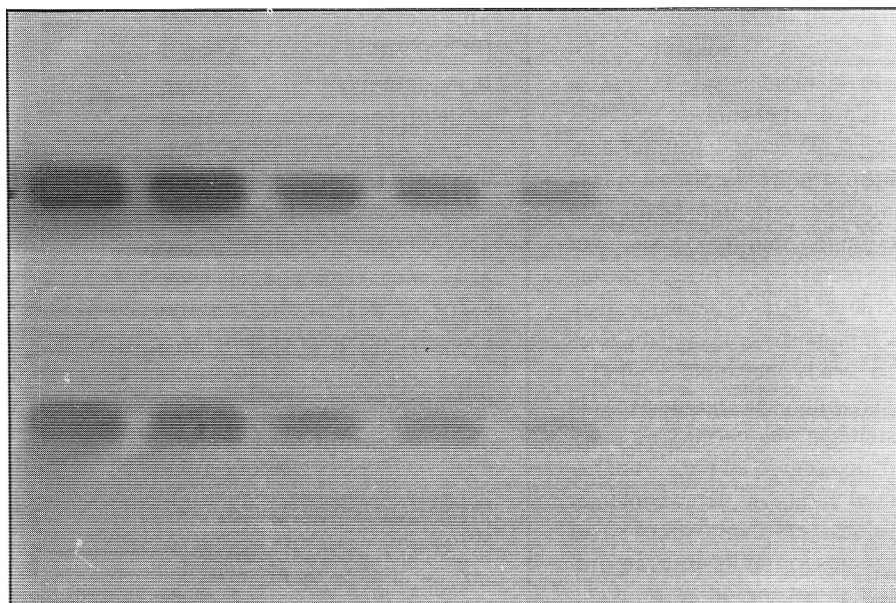


Figura 5. Resultados de PCR convencional y PCR ELIFA. Amplificación del gen B1 de *Toxoplasma gondii*: 200, 100, 75, 50, 25 y 10 fentogramos de ADN toxoplásmico (líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente). Línea 7: Control negativo (agua destilada). Hibridización por filtración sobre membrana por PCR-ELIFA (B). Los resultados son obtenidos en 1 hora y 30 minutos en comparación con la revelación convencional que requiere por lo menos 20 horas (A). "Laboratorio de Parasitología. Hôpital Maison Blanche. Reims).

ción particular o contexto clínico en la cual se quieren aplicar.

Toxoplasmosis en la mujer embarazada

Seronegativa (IgG < 10UI/ml).

Lo cual según la ley francesa se debe realizar por dos técnicas diferentes. Control mensual para detectar seroconversión durante el embarazo se debe continuar hasta la quinta semana después del parto para descartar infección al final del embarazo, *Seropositivas (ELISA IgG - 10UI/ml o su equivalente por otra técnica sin IgM específica).* Se consideran sin riesgo toxoplásmico (inmunidad adquirida antes del embarazo) excepto si hay historia de manifestaciones clínicas (adenopatías) en los meses de la concepción o en mujeres con defectos inmunitarios.

Seropositivas con riesgo toxoplásmico. Pacientes con eviden-

cia serológica de infección reciente como las siguientes.

-Seroconversión (prueba IgG no reactiva pasa a reactiva en una muestra subsiguiente) durante el embarazo o muy próxima a la concepción con adenopatías o trastornos inmunitarios.

-IgG elevada (más de 300 UI/ml) y/o aumento del título de anticuerpos en más de dos diluciones en IFI IgG o en tasa significativa por ELISA en dos muestras tomadas con un intervalo de tres semanas y realizadas en las mismas condiciones técnicas (preferiblemente en paralelo). Hay que realizar la búsqueda de otro marcador serológico.

-Presencia de IgM específica y/o IgA específica y/o IgE específica. Si la IgM es el único isotipo presente es necesario realizar técnicas de avididad o HS/AC para confirmar una infección reciente. En ausencia de disponibili-

dad de estas técnicas la única opción es vigilar el embarazo y seguir al recién nacido después del nacimiento como si existiera un riesgo confirmado. Con los otros isotipos presentes, IgA o IgE, cualquiera de ellos confirma una infección reciente.

Toxoplasmosis congénita

En caso de madres con riesgo toxoplásmico se hace diagnóstico prenatal por punción de sangre fetal y amniocentesis en la semana 22 de gestación para el estudio inmunológico (IC IgM, IgA e IgE, PIC-ELIFA), inoculación en cultivo celular y en ratón, además investigación del ADN toxoplásmico por PCR. Si se obtienen resultados positivos a partir de estas pruebas se confirma una contaminación fetal. En caso de resultados negativos la vigilancia inmunológica se continúa hasta el nacimiento, en los meses dos, tres, seis y nueve de gestación para descartar la infección congénita (59). En ambos casos se realiza inoculación de la placenta. Cuando el diagnóstico no se hizo durante el embarazo sino después del nacimiento con manifestaciones clínicas (ej: síndrome de TORCH) se realizan las mismas pruebas diagnósticas enunciadas anteriormente.

Pacientes inmunosuprimidos

Perfil inmunológico IgG -10 UI/ml con presencia o no de las demás inmunoglobulinas. En caso de que la respuesta inmunológica no sea evidente se busca el parásito circulante por PCR, cultivos celulares, inoculación en ratón a partir de sangre, LCR, biopsias o exudado broncoalveolar según sea la sospecha clínica.

Conclusiones y perspectivas

En conclusion, nuestra experiencia (Montoya et al, Diagnóstico prenatal y postnatal, Newborn Screening Program, Massachusetts, datos no publicados) y la de otros autores (25, 60) nos ha mostrado la necesidad de incluir varios marcadores serológicos para afirmar la existencia de una situación de infección reciente o evolutiva. Es necesario hacer énfasis sobre el hecho de que los títulos de IgM, IgA o IgE luego de una infección aguda varían considerablemente entre individuos y no se correlacionan necesariamente con la severidad o qué tan recientemente ha ocurrido la infección. Por lo tanto un panel de muestras casi siempre es necesario para la evaluación de una mujer embarazada con una prueba anormal en una primera muestra, idealmente dicha muestra debe ser nuevamente analizada y los resultados interpretados por un laboratorio de referencia.

El diagnóstico de la toxoplasmosis ha evolucionado de manera positiva en los últimos años gracias a las nuevas estrategias aportadas por la inmunología y la biología molecular. Estudios de seguimiento de pacientes con las técnicas basadas en el principio de inmunocaptura han hecho cambiar los criterios que se tenían para una toxoplasmosis de adquisición reciente y congénita: la IgM puede durar hasta dos años en el adulto y hasta 30% de los recién nacidos con la infección congénita son negativos para ella. La IgA e IgE han aportado dos nuevas posibilidades para aclarar el diagnóstico así como la estrategia ELIFA que permite comparar el suero ma-

terno con el fetal. La introducción del cultivo celular ha mejorado la rapidez con la que se puede aislar el parásito y el PCR representa un indiscutible adelanto para decidir si el feto está infectado, con sólo la muestra de líquido amniótico y sin tener que recurrir a los riesgos de una cordocentesis. Igualmente para el inmunosuprimido el PCR es una ayuda inestimable, aunque todavía no se ha logrado una sola estrategia que permita un diagnóstico seguro en ellos. Así, hacia el futuro se deberá intentar mejorar el diagnóstico en el inmunosuprimido. El gran problema que nos queda es cómo extender los beneficios de esta mejoría en el diagnóstico al tamizaje prenatal en masa. La mayoría de los avances que se han desarrollado son para su aplicación en el tercer nivel o de referencia, pero aún no existe una técnica que permita su incorporación en programas de salud pública nacional. Es necesario desarrollar una técnica comparable al VDRL para lograr su uso en los laboratorios del nivel primario de atención en salud.

Abstract

Laboratory diagnosis is the only mean to establish definitively, and accurately a significant infection by the protozoan *Toxoplasma gondii*. This paper discusses the most recent advances in techniques and methods, their advantages and limitations. The principles and applications of avidity IgG, immunocapture test for the detection of IgM, IgA and IgE immunoglobulins. Compared Immunologic Profiles by Enzyme Linked-Immuno Filtration Assay (CIP-ELIFA), cellular culture, mice inoculation and

Polymerase Chain Reaction (PCR), are discussed. A significant improvement in the diagnosis of *Toxoplasma* human infection has been achieved through these recent immunological and molecular strategies but the development of simpler, easier and low cost techniques is necessary to permit the massive screening in countries with lower income and high prevalence of the infection.

Referencias

1. Frenkel JK. Toxoplasmosis in human beings. *JAMA* 1990; **196**: 240-248.
2. Gómez JE, Castaño JC, Montoya MT. Toxoplasmosis congénita en Colombia: un problema subestimado de salud pública. *Colombia Médica* 1995; **26**: 66-70.
3. Romero J. El síndrome TORCHS en perinatología. *Pediatría* 1990; **25**: 51-61.
4. Juliao O, Corredor A, Moreno GS. Estudio Nacional de Salud: Toxoplasmosis en Colombia, Ministerio de Salud. Imprenta Instituto Nacional de Salud 1988.
5. Hunter, Remington JS. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 1994; **170**: 1057-1067.
6. Araújo FG, Remington JS. Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1980; **141**: 144-150.
7. Pinon JM, Marx C, Foudrinier F, et al. Intérêt de la recherche poly-isotypique d'anticorps spécifiques IgG, IgM, IgA et IgE. *Spectra Biologie* 1994; **5**: 69-75.
8. Francis JM, Joynson DHM. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by Enzyme Linked Immunoassay and Immunosorbent Agglutination Assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; **12**: 556-559.
9. Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. *Epidemiol Infect* 1994; **112**: 399-408.
10. Lappalainen M, Koskela P, Majaleena K, et al. Toxoplasmosis acquired during pregnancy. Improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J Infect Dis* 1993; **167**: 691-697.
11. Danneman B, Vaughan WC, Thulliez P, Remington JS. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1928-1933.
12. Suzuki Y, Thulliez P, Demonts G, Remington JS. Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma* infection in humans. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 901-905.
13. Tran Manh Sung R, Raberin H, Garin JP. Intérêt de l'Isaga dans la detection des

Diagnóstico en toxoplasmosis

- IgM anti toxoplasmiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 1985; **2**: 107-110.
14. **Desmots G.** Les recherches d'anticorps IgM spécifiques par immunoadsorption, Colloque international sur l'immunologie de la toxoplasmose. *Lyon Médical* 1982; **248**: 37-41.
15. **Seguela JP, Bessières MH.** Problèmes posés lors de la détection d'anticorps IgM dans la sérologie de la toxoplasmose: anticorps spécifiques ou non. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 1983; **1**: 119-122.
16. **Gross U, Bohne W, Schröder J, Roos T, Heesemann J.** Comparison of a commercial enzyme immunoassay and immunoblot techniques for detection of immunoglobulin A antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; **12**: 636-639.
17. **Stepick-Biek P, Thulliez P, Araújo FG, Remington JS.** IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 2632-2636.
18. **Decoster A, Darcy F, Caron A, Capron A.** IgA antibodies against p30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* 1988; **ii**: 1104-1107.
19. **Bierer F.** Evaluation d'un test d'immunocapture des IgE dans la toxoplasmose acquise et congénitale, Thèse Pharmacie. Université de Toulouse 1990.
20. **Pinon JM, Toubas D, Marx C, et al.** Detection of specific IgE in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1739-1743.
21. **Wong SY, Hadju MP, Ramirez R.** Role of specific Immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2952-2959.
22. **Cazenave J, Bessières MH.** Le diagnostic anténatal de toxoplasmosis aspects récents de la biologie. *Revue Française des Laboratoires* 1992; **240**: 95-102.
23. **Bessières MH, Roques C, Berrebi A, Llauro C, Seguela JP.** Dosage des immunoglobulines et isolement du parasite par inoculation à la souris et culture cellulaire du sang foetal: Intérêt comparatif dans le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 1987; **5**: 27-32.
24. **Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovski M, et al.** Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med* 1988; **318**: 271-275.
25. **Pinon JM, Marx C, Quéreux C, Talmud M, Leroux B, Choisy H, Trenque T, Dupouy D, Dorangeon PH.** Diagnostic de la toxoplasmose materno-foetale, ses conséquences. Mémoire Colloque Reims 1994; 1-21.
26. **Pinon JM, Thoannes H, Gruson N.** An enzyme-linked immunofiltration assay used to compare infant and maternal antibody profiles in toxoplasmosis. *J Immunol Methods* 1985; **77**: 15-23.
27. **Pinon JM, Poirriez J, Leroux B, Dupouy D, Quereux C, Garin JP.** Diagnostic précoce et surveillance de la toxoplasmose congénitale. *La Presse Médicale* 1987; **16**: 471-474.
28. **Pinon JM, Chemla C, Villena I, et al.** Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: Value of comparative enzyme linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for post-natal therapeutic strategies. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 579-583.
29. **Pinon JM, Foudrinier F, Mougeot G, et al.** PIC-ELISA et isotypes spécifique IgA ou IgE dans l'évaluation des risques toxoplasmiques chez les sujets immunodéprimés. *Revue Française des Laboratoires* 1991; **223**: 103-107.
30. **Diego JA, Vázquez JJ, Penin P, Fernández J, Sánchez S, Gamallo C.** Use of murine subinoculation for the diagnosis and isolation of toxoplasmosis in HIV-infected patients with persistent lymphadenopathy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1993; **87**: 179-184.
31. **Derouin F, Thulliez P.** Diagnostic biologique de la toxoplasmose. *Laborama* 1994; **33**: 2-27.
32. **Wallon M, Sun X, Gandilhon F, Mojon M, Peyron F, Cozon G.** *Toxoplasma gondii* dans le liquide amniotique comparaison de 2 lignées cellulaires pour l'isolement en culture. *La Presse Médicale* 1994; **23**: 1312.
33. **Desmots G, Forestier F, Thulliez PH, Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Chartier M.** Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1985; **i**: 500-504.
34. **Derouin F, Mazon MC, Garin Y.** Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 1597-1600.
35. **Derouin F, Sarfati CL, Beauvais B, Iliou MC, Dehen L, Larivière M.** Laboratory diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 1661-1663.
36. **Roques C, Bessières MH, Seguela JP.** Diagnostic de la toxoplasmose cérébrale par isolement en culture cellulaire de toxoplasmes dans les biopsies cérébrales. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 1988; **6**: 57-63.
37. **Johnson JD, Butcher PD, Savva D, Holliman RE.** Application of the Polymerase Chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. *J Infection* 1993; **26**: 147-158.
38. **Dupuy-Camet J, Bougnoux ME, Lavareda de Souza S, et al.** Comparative value of the polymerase chain reaction and conventional biological test for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Ann Biol Clin* 1992; **50**: 315-319.
39. **Gross U, Roggenkamp A, Janitschke K, Heesemann J.** Improved sensitivity of the Polymerase Chain Reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; **11**: 33-39.
40. **Grover CM, Thulliez P, Remington JS.** Rapid diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction in amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 2297-2301.
41. **Cristina N, Derouin F, Pelloux J, et al.** Détection de *Toxoplasma gondii* chez des patients sidéens à l'aide de la séquence répétée TGR1E. *Path Biol* 1992; **40**: 52-55.
42. **Cazenave J, Cheyrou A, Bequeret J.** Improvement of rDNA based PCR assay to detect *Toxoplasma*. *Prenat Diag* 1993; **13**: 543.
43. **Johnson AM, Murray PI, Illana S, Baverstock PJ.** Rapid nucleotide sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii*: evolutionary implications for the Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol* 1987; **25**: 239-246.
44. **Dupouy J.** La PCR et les parasites, en: Larzul D (Ed), La PCR Un procédé de réplication in vitro. Tec & Doc LAVOISIER, Paris 1993; 342-345.
45. **Wong S-Y, Remington JS.** Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 1993; **7**: 299-316.
46. **Kwok S, Higuchi R.** Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; **339**: 237-238.
47. **Costa JM, Vidaud M.** Les examens biologiques utiles au diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale: Apports de la PCR, en: Larzul D (Ed), La PCR un procédé de réplication in vitro. Tec & Doc LAVOISIER, Paris, 1993; 359-362.
48. **Cazevane J, Broussin B, Venn PH, Tirard V, Cheyrou A, Begueret J.** Apport de l'amplification génique au diagnostic biologique de la toxoplasmose. *La Presse Médicale* 1994; **23**: 573-575.
49. **Hohlfeld P, Daffos F, Costa 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.
50. **Khalifa KES, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K.** Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 2813-2819.
51. **Liesenfeld O, Roth A, Weinke T, Foss HD, Hahn H.** A case of disseminated toxoplasmosis-value of PCR for the diagnosis. *J Inf* 1994; **29**: 133-138.
52. **Aouizerate F, Cazenave J, Poirier L, et al.** Détection directe de Toxoplasmes dans l'humeur aqueuse par amplification génique (PCR). *J Fr Ophtalmol* 1991; **14**: 550-555.
53. **Cazenave J, Cheyrou A, Aouizerate F, Poirier L, Verin P.** Detection of *Toxoplasma* in aqueous humor by using the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 1992; **50**: 357-358.
54. **Van de Ven E, Melchers W, Gamala J, Camps W, Meuwissen J.** Identification

- of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 2120-2124.
55. **Aubert D, Lèpan H, Lemaire P, Foudrinier F, Marx C, Bonhomme A, Pinon JM.** Rapid detection of toxoplasmic nucleic acid by enzyme immunofiltration assay after membrane transfer. *Electrophoresis* 1995; **16**: 354-356.
56. **Sybley LD, Boothroyd JC.** Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprises a single clonal lineage. *Nature* 1992; **359**: 82-85.
57. **Gross U, Roos T, Appoldt D, Heesemann J.** Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A and IgM antibodies against p30 using the immunoblot. *J Clin Microbiol* 1992; **130**: 1436-1441.
58. **Gross U, Muller J, Roos T, Schrod L, Heesemann J.** Possible reasons for failure of conventional test for diagnosis of fatal congenital toxoplasmosis: report of a case diagnosed for PCR and immunoblot. *Infection* 1992; **10**: 149-151.
59. **Gómez JE, Castaño JC, Ríos MP, Montoya MT.** Toxoplasmosis congénita e hidranencefalia. *Acta Med Colomb* 1992; **17**: 457-458.
60. **Wong S-Y, Remington JS.** Toxoplasmosis in Pregnancy. *Clin InfDis* 1994; **18**:853-862.

M.T. Montoya y cols.