

**IDENTIFICACIÓN DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE LA DETECCIÓN
DEL GEN B1 POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR),
EN MUJERES EMBARAZADAS SEROPOSITIVAS DE UNA POBLACIÓN
DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.**

MANUEL ALEJANDRO BENACHI OSORIO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN - CAUCA
2010**

IDENTIFICACIÓN DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE LA DETECCIÓN DEL GEN B1 POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), EN MUJERES EMBARAZADAS SEROPOSITIVAS DE UNA POBLACIÓN DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.

MANUEL ALEJANDRO BENACHI OSORIO

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

MSc. CLAUDIA PATRICIA ACOSTA ASTAIZA
Directora

MSc. LUIS REINEL VÁSQUEZ ARTEAGA
Asesor

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010**

Nota de aceptación

Director MSc.
Claudia Patricia Acosta Astaiza

Jurado MSc
Fabiola González Cuellar

Jurado Dr.
José Enrique Chagüendo

Lugar y fecha de sustentación:

Auditorio Jesús María Otero 10 de septiembre de 2010

*Con el amor que llena mi alma y mi corazón,
agradezco y dedico este logro
a mi Madre, quien fue el motor,
inspiración y razón para culminar una
carrera universitaria, logrando
ser la persona que soy.*

*Con satisfacción levanto mi frente y siento
el orgullo que quizá hubiese tenido en vida, y que
con toda seguridad siente en cualquier
parte donde se encuentre.*

Agradecimientos

En el correr del tiempo, muchos son los obstáculos que se presentan en el camino, grandes son los momentos que nos hacen recordar lo feliz que podemos ser, pero sobre todo, lo que la vida nos puede brindar, oportunidades y éxitos que se pueden alcanzar con esfuerzo y valentía, metas que nos hace crecer como persona y profesional. Existen ciertos momentos que debilitan las ganas de seguir, pero a la vez son los que nos permiten levantar la mirada y afrontar lo que nos impide dar el siguiente paso, pero para esto, se necesita la compañía de los que nos pueden guiar por este camino, en especial, a personas que agradezco de corazón por su interés, compañía y dedicación en mi formación.

Agradezco de forma infinita a mi Dios, el que en momentos de oscuridad encendió la luz que iluminó mis pasos, y permitió darlos firmes y seguro hacia adelante.

A mis maestros gracias doy, porque de cada uno aprendí lo valioso de mi profesión, a comprender lo esencial, lo insignificante y la grandeza de lo más mínimo. De forma especial, quiero agradecer a Luz Stella Hoyos, Patricia E. Vélez, y María Isaura Valdivieso, y Silvio Carvajal, cuatro docentes que con su trayectoria profesional, me permitieron encontrarle un gran significado a la biología y aún más a la genética y sus afines.

Es grato para mí, agradecerle al Mg. Luis Reinel Vásquez, por haber creído en mí y mis capacidades que permitieron llegar al final de este proyecto. De la misma forma y con gran aprecio le doy mis más sinceros agradecimientos a la Mg. Claudia Patricia Acosta, una persona que además de guiarme con sus conocimientos, me enseñó a buscar las salidas más favorables a las dificultades, además de brindarme confianza, me enseñó la gran mujer y profesional que es. Al laboratorio y Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada, que me abrieron sus puertas y me acogieron como un integrante más de la gran familia que son, gracias por sus buenos deseos, apoyo y palabras de aliento que nunca fueron de más.

Con el alma agradezco a mi familia quienes me apoyaron incondicionalmente durante todo este proceso, con su paciencia y sus buenos consejos, a mi padre Juan Benachi mis hermanas Janeth y Pilar y demás familiares que vivieron conmigo esta etapa, velando por mi bienestar. Con admiración, agradezco a una parte de mi vida, de mi ser, a una mujer que con sus palabras, miradas y caricias, acompañó mis pasos, hizo de ésta una experiencia única y llena de sueños que deseo seguir compartiendo, te agradezco a ti Jennifer por haber estado conmigo sin importar los contratiempos.

De esta misma forma agradezco a mis verdaderos amigos Tatiana Arcos, Jhon García, Julián Gutiérrez, David Semanate, Beatriz Sarmiento y Marcela Torres quienes estuvieron conmigo en los momentos que más los necesité, supieron con palabras llenarme de valor y me enseñaron el verdadero significado de la amistad.

CONTENIDO

RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN.....	17
1. JUSTIFICACIÓN.....	19
2. MARCO TEÓRICO.....	23
2.1 Toxoplasmosis.....	23
2.2 Morfología de <i>T. gondii</i>	25
2.3 Ciclo vital de <i>T. gondii</i>	26
2.4 Fuentes de infección.....	27
2.5 Respuesta Inmunológica del huésped intermedio.....	28
2.6 Epidemiología de la infección.....	30
2.7 Métodos de diagnóstico de toxoplasmosis.....	33
2.7.1 Métodos Serológicos.....	33
2.7.2 Diagnóstico de toxoplasmosis por métodos moleculares.....	37
3. ANTECEDENTES.....	42
3.1 Estudios de Seroprevalencia.....	42
3.2 Estudios de identificación y genotipificación de <i>T. gondii</i> por métodos moleculares.....	45
4. OBJETIVOS.....	49
4.1 Objetivo general.....	49
4.2 Objetivos específicos.....	49
5. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	50
5.1 Población de estudio.....	50
5.2 Técnicas Moleculares.....	51
5.2.1 Extracción de ácido nucleico (ADN).....	51
5.2.2 Amplificación del gen B1 por PCR anidada.....	51

5.3 Análisis estadístico.	54
6. RESULTADOS.....	53
6.1 Estandarización de la PCR, como método de diagnóstico en la toxoplasmosis.....	53
6.2 Características Socio-demográficas	56
6.3 Prevalencia de los factores de riesgo.....	58
6.4 Características socio-demográficas y factores de riesgo significativos.	60
7. DISCUSIÓN.....	63
7.1 Estandarización de la PCR.....	63
7.2 Características socio-demográficas de la población.....	65
7.3 Frecuencia de los factores de riesgo.....	68
8. CONCLUSIONES.....	72
9. RECOMENDACIONES.....	73
10. BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTA DE TABLAS.

Tabla N°1. Seroprevalencia en embarazadas inmigrantes en función del lugar de nacimiento. Tomado de “Prevalencia e incidencia de la infección por <i>Toxoplasma gondii</i> en mujeres en edad fértil en Albacete (2001-2007)”	26
Tabla N°2. Distribución de mujeres seropositivas.....	45
Tabla N°3. Secuencias específicas para los genes B1 de <i>T. gondii</i>	46
Tabla N°4. Componentes de la mezcla para la amplificación del gen B1 de <i>T. gondii</i>	47
Tabla N°5. Operacionalización de Variables Socio-demográficas.....	49
Tabla N°6. Operacionalización de la prevalencia de los factores de riesgo en la población.....	51
Tabla N°7. Cuantificación de ADN.....	53
Tabla N°8. Características sociodemográficas de la población.....	56
Tabla N°9. Prevalencia de los factores de riesgo.....	59
Tabla N°10. Régimen de salud y tipo de agua que consume las gestantes...	61
Tabla N°11. Nivel educativo y habito de lavarse las manos antes de preparar los alimentos.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taquizoito, forma del parásito circulante en sangre. Modificado de Organizational Changes of the Daughter Basal Complex during the Parasite Replication of <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Figura 2. Ciclo vital y manifestación del <i>T. gondii</i> . Tomada y modificada de “Estado Actual del Diagnóstico de la Toxoplasmosis en la Mujer Embarazada y su Feto.....	22
Figura 3. Producto de amplificación del gen B1 (97pb) en pacientes gestantes con toxoplasmosis.....	55

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN, por el método de Fenol Cloroformo a partir de 1 mL de sangre periférica.....	88
Anexo 2. Formato de estandarización de PCR para la primera reacción de amplificación del gen B1 específico de <i>T. gondii</i>	90
Anexo 3. Formato de estandarización de PCR anidada para el gen B1 específico de <i>T. gondii</i>	91
Anexo 4. Instrumento de colección de datos.....	92

RESUMEN

La toxoplasmosis es causada por un protozoo denominado *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado capaz de infectar a cualquier vertebrado, siendo de forma oportunista en humanos. Es una zoonosis ampliamente difundida en el mundo, catalogada como un problema de salud pública que se ha descuidado Y que causan más morbimortalidad especialmente en personas inmunocomprometidas como pacientes con SIDA o con trasplante de órganos y niños congénitamente infectados.

Se estableció la frecuencia de gestantes infectadas con *T. gondii*, identificando la presencia del parásito mediante pruebas moleculares (PCR) en sangre periférica en una población del Departamento del Cauca, identificando la prevalencia de algunas características socio-demográficas y de factores de riesgo importantes para adquirir dicha infección.

Se tomó 1mL de sangre periférica de 5mL previamente tomados en tubos de EDTA para extraer ADN por el método de Fenol Cloroformo. Después de cuantificado el ácido nucleico se amplificó mediante PCRs anidadas, con el fin de identificar el gen B1, específico para *T. gondii*, se visualizó el resultado de las reacciones en un gel de agarosa al 2% declarando positiva la muestra con una banda de 97pb que demostró la presencia del genoma del parásito como tal.

Se obtuvo que la totalidad (100%) de las mujeres embarazadas seropositivas fueron portadoras de ADN parasitario, confirmando la infección con el protozoo. La tenencia de gatos y el consumo de carne en especial la de cerdo, prevalecieron como los factores de riesgo más frecuente en la población, presentado un porcentaje de 73,1% y 55,6% respectivamente.

En conclusión la PCR, es una prueba altamente sensible (100%), que permite una identificación del parásito en el paciente (mujer gestante), pero que no permite identificar el momento preciso del contacto con el protozoo por primera vez.

INTRODUCCIÓN.

La toxoplasmosis es una infección dada por un parásito intracelular obligado denominado *Toxoplasma gondii*, que hospeda a diferentes especies vertebradas (Rosso *et al.*, 2008). Esta infección está catalogada como una zoonosis dado a que es transmisible al humano por diferentes animales (Montoya, Liesenfeld, 2004). Entre los animales que transmiten el protozoo se encuentran los de consumo humano como bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves (pollos y gallinas); al igual que productos cárnicos y embutidos (Aspinall *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2000; Charleston, 1994; Daguer *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2005; Fialho, de Araujo, 2003). Por otro lado, los animales domésticos juegan un papel importante en la infección entre ellos el gato, pues es catalogado como el huésped definitivo donde el *T. gondii* lleva a cabo su reproducción sexual para formar finalmente los ooquistes (Isaza, 2007)

La principal vía de transmisión del parásito, es por algunos animales de consumo humano, al ingerir quistes tisulares (bradizoitos enquistados en tejidos) de carne mal cocida (Lora *et al.*, 2007), también puede haber infección por contacto con heces felinas contaminadas, que a su vez pueden infectar aguas y siembras de vegetales para el consumo (Hill, Dubey, 2002). Otra forma de infección es por transmisión vertical causante de la toxoplasmosis congénita, enfermedad en la cual el feto es infectado a través de la placenta, provocando algunas patologías graves, ceguera, sordera y retardo mental en los niños nacidos vivos.

A nivel mundial, la toxoplasmosis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeprimidos e inmunocomprometidos como mujeres embarazadas, convirtiéndose así en un problema de salud pública en donde se ha visto afectado también el territorio nacional (Gómez, 2005). En estudios realizados en la ciudad de Cali, Colombia, demuestran que la toxoplasmosis ocular es una de las principales causas de ceguera infantil para el

Valle del Cauca (Zuluaga *et al.*, 2005). Para el caso del Departamento del Cauca, no se conoce estudios de identificación de *T. gondii* mediante métodos moleculares, debido a que los estudios adelantados hasta el momento se basan en identificación de la infección por medios serológicos, en donde se reporta una prevalencia del 42,8% para los municipios muestreados según el estudio realizado por Vásquez y colaboradores en el 2002.

Dada la variabilidad de diagnósticos en pacientes con sintomatología infecciosa por *T. gondii*, es necesario contar con pruebas sensibles y específicas que permitan la identificación directa del parásito en muestras cuya toma no represente riesgo para el paciente, ya que muestras como el líquido cefalorraquídeo pueden presentar contraindicaciones y poca sensibilidad (Antinori *et al.*, 1997; Eggers *et al.*, 1995; Foudrinier *et al.*, 1996). Por lo tanto, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una prueba de biología molecular que revela directamente el ADN del parásito y ha sido evaluada por diferentes autores, con resultados óptimos y confiables que permiten dar diagnósticos precisos ante las incertidumbres de las otras pruebas. (Dupouy-Camet *et al.*, 1993; Filice *et al.*, 1993; Foudrinier *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 1994). Teniendo en cuenta lo anterior, se empleó una herramienta muy versátil en la biología molecular como la PCR, para detectar la presencia del *T. gondii* en una población de mujeres embarazadas del Departamento del Cauca mediante la identificación del gen B1.

1. JUSTIFICACIÓN.

En diferentes partes del mundo la alta prevalencia de la toxoplasmosis ha hecho que las entidades encargadas de la salud cataloguen a esta infección como un problema de salud pública que afecta a cualquier ser humano y algunas especies de animales que a su vez están en contacto con el hombre, y viceversa. Por tal razón los estudios de toxoplasmosis se han venido implementando con el fin de llegar a métodos rápidos y eficientes en la detección de *T. gondii* puesto que muchas de las formas de diagnósticos son poco útiles al momento de identificar la presencia de parásito en el individuo, en especial en los seres humanos.

Diversas técnicas se han incrementado en estudios que conlleven a una determinación rápida de toxoplasma en pacientes, centrándose más en personas inmunodeprimidas como portadores de VIH, ya que es muy común la presencia de toxoplasma en estos sujetos. Sin embargo, desde hace 12 años se han venido realizando diversos estudios seroepidemiológicos por biólogos, médicos, parasitólogos, en fin la comunidad científica; centrando su atención con estudios en la toxoplasmosis congénita, debido a que esta presenta una alta tasa de morbimortalidad en bebés al nacer y en algunos casos muerte prenatal por aborto (López Castillo *et al.*, 2005). Una de estas técnicas que se ha implementado y por ende la más utilizada es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR, pues ha sido tan útil en la determinación de *T. gondii*, que se ha validado como prueba de diagnóstico para los casos de toxoplasmosis cerebral sobre todo en pacientes tanto inmunocomprometidos como inmunosuprimidos (Ponce, Gómez, 2003), utilizando como indicador, un gen único y específico denominado B1 para firmar la presencia del protozoo.

Las pruebas moleculares como la PCR es una técnica molecular directa utilizada para la detección de material genético (ADN) de *T. gondii*, la cual agiliza la obtención de resultados pues se obtiene en 24 horas, comparada con el tiempo

que se llevaría por inoculación en ratón que es de tres a seis semanas ó el cultivo celular que toma de cuatro a 10 días (Montoya *et al.*, 1996). Esta prueba tiene la capacidad de detectar cantidades mínimas de ADN (0,05pg – 0,2pg), convirtiéndose en una técnica altamente sensible y específica, utilizada para encontrar y determinar la presencia del protozoario, ya que es posible amplificar nuevamente un producto obtenido de una primera reacción, consiguiendo así copias de una región específica de un sector previamente ya amplificado.

En el trabajo de Ponce y colaboradores en el 2003, se encontró que tanto con ADN de *T. gondii* como con las muestras de los pacientes, se pudo determinar que el gen B1 es más sensible que otros genes de identificación y genotipificación como SAG2. Por tal motivo, el gen B1 es de suma importancia para la identificación del parásito debido a que el número de repeticiones (35 copias) que posee comparado con SAG2 (gen con única copia) y otros genes en el genoma, aumenta las posibilidades de detectar el parásito en sangre al haber de esta forma, más sitios blanco para que se dé la anillamiento (Burg *et al.*, 1989), aun sabiendo que la carga parasitaria en sangre de un humano adulto es del 10%, por lo que se ha tomado B1 como gen de referencia y diagnóstico.

En pacientes B1 positivos, los tipos clonales I, II y III que presenta el agente infeccioso son responsables de algunas afecciones sintomatológicas desencadenada por la virulencia de las cepas, puesto que el grado de virulencia varía de una cepa a otra, por lo tanto se ha relacionado las cepas tipo I con toxoplasmosis congénita, los linajes tipo II se ha encontrado en 65% de aislamientos en casos de reactivación en inmunosuprimidos como pacientes con sida, y el tipo III se ha aislado generalmente de animales y, esporádicamente, en humanos infectados (Gallego *et al.*, 2004).

Las pruebas moleculares, se han convertido en grandes herramientas con múltiples funcionalidades y utilidades, pues al permitir una diagnóstico temprano y en lapsos de tiempo relativamente cortos comparado con otras técnicas

(inoculación de ratones, cultivo tisular), las hacen de gran relevancia con aportes concretos sobre los resultados en comparación con otras técnicas como es el caso de las pruebas serológicas, las cuales se basan en la detección de anticuerpos anti-Toxoplasma específicos que reaccionan con antígenos únicos, permitiendo así un análisis cualitativo de la presencia o ausencia del agente infeccioso, teniendo como consecuencias adversas, falsos negativos en los casos donde los títulos serológicos son demasiado bajos como para afirmar una infección con *T. gondii* donde se recomienda repeticiones periódicas de la prueba con el fin de descartar seroconversiones, que suelen presentarse cuando el paciente es infectado de forma aguda.

Para un diagnóstico definitivo de toxoplasmosis, es necesario hacerlo por pruebas de laboratorio que afirmen la presencia del parásito en el individuo, debido a su inespecificidad en la sintomatología del paciente (Montoya, 2002). Por lo tanto, hasta el momento las técnicas disponibles en el laboratorio para el diagnóstico de la infección son múltiples entre las que se encuentran las pruebas serológicas, amplificación de secuencias de ácidos nucleicos específicos (PCR), hallazgos histológicos del parásito o de sus antígenos (por ejemplo, tinción inmunoperoxidasa) o por aislamiento del organismo en cultivos tisulares o en la cavidad peritoneal de ratón (Rosso *et al.*, 2007).

Existen aspectos que se deben tener en cuenta para estas pruebas, pues las limitaciones que presentan se ven marcadas por tiempo para obtener un resultado preciso, sensibilidad y especificidad de la prueba como tal, además, cabe resaltar que las interpretaciones de los resultados deben de ser claros, punto en contra para algunas técnicas.

Una de las pruebas que cumple con lo anterior es la serología, pues esta puede arrojar resultados confusos atribuidos a la generalización de las lecturas; los resultados tienen una variación de paciente a paciente (inmunosuprimidos e

inmunocomprometidos), si tenemos en cuenta que la respuesta inmune a la infección, actúa de forma diferente en cada organismo. En los pacientes inmunodeprimidos no crean los suficientes anticuerpos tal como lo hace un inmunocompetente, lo que permite que el sistema inmune no active los mecanismo de defensa eficazmente, teniendo como resultado una población (pacientes VIH positivos, con trasplante de órganos recientes o en terapias inmunosupresoras como quimioterapia) más vulnerable ante la infección. Por lo tanto, la medición de inmunoglobulinas específicas como la IgG o la IgM, algunas veces deben ser soportadas en casos sospechosos y de alto riesgo, con otro tipo de pruebas para la detección y medición de otros tipos de inmunoglobulinas como la IgA e IgE que esclarecen el contacto por primer vez con el agente infeccioso. Debido a este tipo de complicaciones que se puede presentar ante el diagnóstico puntual de una toxoplasmosis, es pertinente desarrollar y emplear, metodologías precisas, sensibles, eficaces y específicas, que permitan la fácil determinación de la presencia o ausencia del protozoo en el organismo.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 *Toxoplasmosis.*

La toxoplasmosis es un término clínico dado a una de las enfermedades infecciosas más frecuentes a nivel mundial que se transmiten de animales a humanos y viceversa por lo cual es catalogada como una zoonosis, estas a su vez se puede ordenar en dos clases según su ciclo vital; como sinantrópicas cuando tienen un ciclo urbano o exoantrópicas, cuando el ciclo es selvático. En los últimos años se ha observado la emergencia y reemergencia de algunas zoonosis, fenómeno estrechamente relacionado a cambios ecológicos, climáticos y socioculturales que han determinado que la población animal comparta su hábitat con el hombre cada vez con mayor frecuencia. (Dabanch P, 2003).

La toxoplasmosis es ocasionada por un parásito de distribución mundial denominado *Toxoplasma gondii*, microorganismo que se clasifica como un parasitario eucariótico perteneciente al reino protisto, del filo Apicomplejos. Se incluye en el supergrupo Chromalveolata, primer rango Alveolata y en el segundo rango a los Apicomplexa, que incluye a los géneros *Eimeria*, *Isospora* y *Cryptosporidium*, un grupo de parásitos en los cuales la esquizogonia y la esporogonia tienen lugar exclusivamente en células del epitelio intestinal en un solo huésped (coccidias homoxenos). El parásito se caracteriza por la esquizogonia y esporogonia que tienen lugar en el epitelio intestinal de un huésped que en este caso son los felinos y por reproducción asexual puede ocurrir en diferentes tejidos y en un espectro amplio de huéspedes (heteroxeno facultativo).

Catalogado también como un parásito intracelular obligado (Dubey *et al.*, 1998), el protozooario puede causar infecciones leves y asintomáticas, así como infecciones mortales que afectan mayormente al feto, recién nacidos, ancianos y personas

vulnerables por su condición de inmunosupresión, por lo que se ha catalogado a este parásito como oportunista (Martín-Hernández, García-Izquierdo, 2003). La enfermedad es considerada una zoonosis, pues de hecho los huéspedes definitivos son los miembros de la familia Felidae; y de ésta, sólo en 2 géneros que incluyen 7 especies, entre ellas el gato (*Felis catus*, *Felis domestica*) (Gómez *et al.*, 1995). Aunque el *T. gondii* tiene un ciclo sexual en el epitelio intestinal del gato, lo que le permite procesos de recombinación genética y teóricamente esto daría lugar a una gran diversidad de tipos clonales del parásito, cuando se realizan análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) para el gen SAG2 que codifica para el antígeno de membrana (Gallego *et al.*, 2004) se identifican sólo tres linajes: el linaje I que es virulento en ratón y prevalece en América del Sur, el linaje II que es avirulento en ratón y se encuentra prácticamente ausente en América del Sur, pero es el más frecuente en Europa (Velmurugan *et al.*, 2008) y el linaje III que predomina en varios sitios del mundo.

Los análisis por microsatélites en un estudio global realizado en cuatro continentes, sugieren entonces ya no sólo la existencia de tres sino de cuatro poblaciones mayores, dos endémicas para Suramérica (SA1 y SA2), una endémica en Europa (RW) y otra ocupando una distribución global o cosmopolita, denominado WW. Al utilizar como marcadores el estudio de haplotipos, se encuentran 11 haplotipos, cuatro de ellos exclusivos de América del Sur y que confirman la divergencia geográfica norte-sur. Estudios realizados demuestran que el parásito adquirido en Suramérica posee características más virulentas dado que su transmisión fue mucho más lenta a través de félidos silvestres, mientras que en Europa y Asia ocurrió una diseminación mucho más rápida a través del gato doméstico. Esto explicaría que en América del Sur existen cepas mucho más virulentas que en el resto del mundo, pues no lograron atenuarse, como sí ocurrió en el resto del mundo. También es claro que las cepas de *Toxoplasma* son diferentes entre Norteamérica y Suramérica pues de acuerdo a la teoría de deriva continental América del Sur permaneció como continente aislado durante 400

millones de años y sólo hace 3 millones de años hubo unión con Centro y Norteamérica, por lo tanto las cepas del parásito tuvieron oportunidad de evolucionar de manera diferente entre ambos continentes (Lehmann *et al.*, 2006).

2.2 Morfología de *T. gondii*

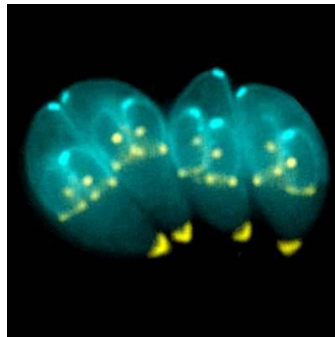
Ooquiste

Forma infecciosa del parásito expulsado de los felinos por sus heces. Los ooquistes son la fase esporulada del parásito. Este es un estado que puede sobrevivir por largos períodos de tiempo (de 7 a 21 días) (Frenkel, 1973) fuera del hospedador por su alta resistencia a factores del medio ambiente.

Taquizoitos.

Figura 1. *Taquizoito, forma del parásito circulante en sangre.*

Modificado de Organizational Changes of the Daughter Basal Complex during the Parasite Replication of *Toxoplasma gondii* (Hu, 2008).



Es la forma motil del parásito, este se caracteriza por ser la forma de rápida reproducción (figura 1) y el encargado de invadir las células del huésped, introduciéndose en el citoplasma celular por medio de su vacuola parasitófora (Dobrowolski, Sibley, 1996) y replicándose ahí para luego diseminarse por torrente

sanguíneo a otros tejidos o células nucleadas como las de la retina en el globo ocular.

Bradizoitos.

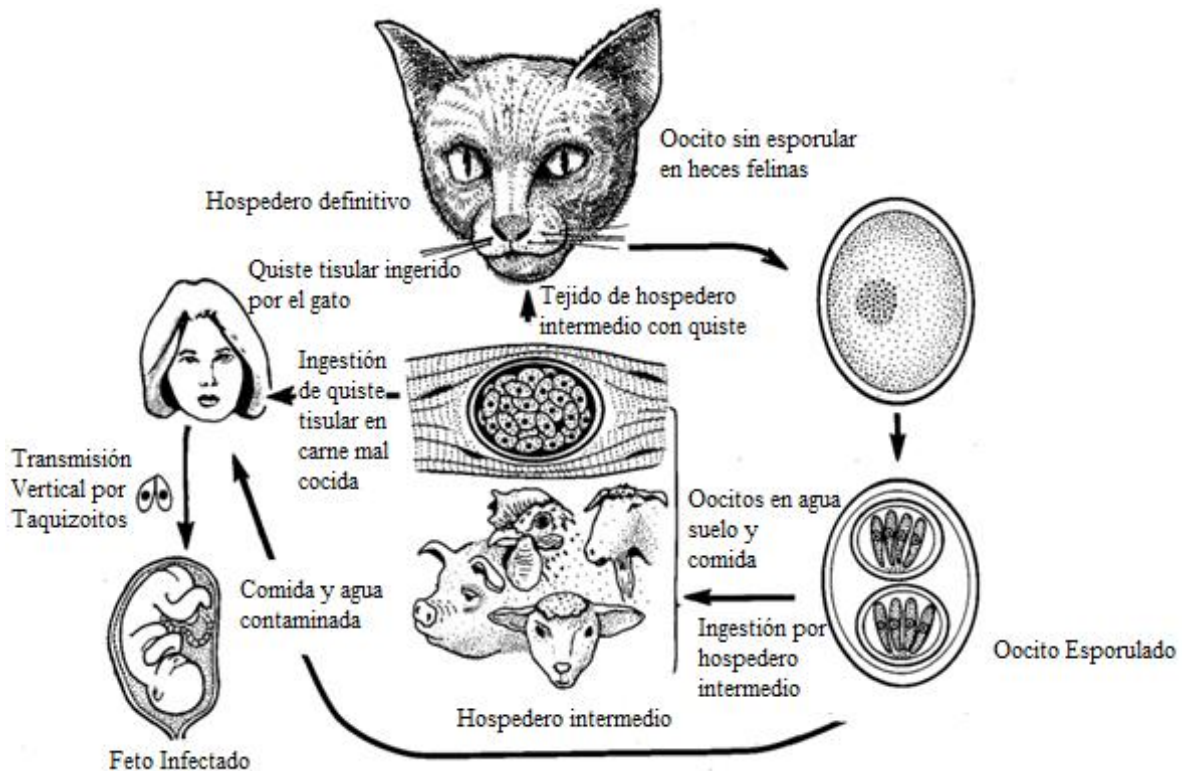
Persisten dentro de los quistes de tejidos infectados, son morfológicamente idénticos a los taquizoitos pero en esta fase la reproducción es lenta por lo que difiere de la fase anterior, se encuentran como quistes tisulares en diferentes partes del cuerpo del hospedador como cerebro o músculos. (Montoya, Liesenfeld, 2004)

2.3 Ciclo vital de *T. gondii*.

El ciclo de vida de *T. gondii* tiene dos fases. La fase sexual del ciclo de vida ocurre solo en miembros de la familia Felidae (gatos domésticos y salvajes), haciendo que estos animales sean los hospedadores primarios y definitivos del parásito. La fase asexual del ciclo de vida puede ocurrir en cualquier animal de sangre caliente, tales como otros mamíferos y aves. Por tal motivo se considera una zoonosis parasitaria. Los humanos y otras especies de animales incluyendo los felinos se les denomina hospedadores intermediarios, los parásitos invaden células, formando un compartimento llamado vacuola parasitófora (Cortázar *et al.*, 2006) que contiene bradizoitos, la forma de replicación lenta del parásito (Dubey *et al.*, 1998). Las vacuolas forman quistes tisulares, en especial en los músculos y cerebro (Ponce, Gómez, 2003). Debido a que el parásito está dentro de las células, el sistema inmune del hospedador no detecta estos quistes. La resistencia a los antibióticos varía, pero los quistes son difíciles de erradicar por completo. El parásito se replica dentro de estas vacuolas por una serie de divisiones binarias hasta que la célula infestada eventualmente se rompe, liberando los taquizoitos. Éstos son mótils, y es la forma de reproducción asexual del parásito. A diferencia de los bradizoitos, los taquizoitos libres son

eficazmente eliminados por la inmunidad del hospedador, a pesar de que algunos logran infectar otras células formando bradizoitos, manteniendo así el ciclo de vida de este parásito. Los quistes tisulares son ingeridos por el gato por carnivorismo (Ajzenberg *et al.*, 2004). Estos quistes resisten la transición por el estómago del felino y infectando así las células epiteliales del intestino delgado en donde se reproducen sexualmente y forman los ooquistes, que son liberados con las heces.

Figura 2. Ciclo vital y manifestación del *T. gondii*. Tomada y modificada de “Estado Actual del Diagnóstico de la Toxoplasmosis en la Mujer Embarazada y su Feto”(Serrano *et al.*, 1999)



Otros animales, incluyendo los humanos ingieren los ooquistes (al comer vegetales no lavados adecuadamente) o los quistes tisulares al comer carne cruda o cocinada inapropiadamente (Lora *et al.*, 2007). Los parásitos entran por las

paredes del intestino para luego distribuirse por la circulación sanguínea y el cuerpo entero, invadiendo así al huésped intermediario, transmitiéndose de esta forma madre hijo por vía placentaria posiblemente, como se representa en la figura 2.

2.4 Fuentes de infección

La familia de los felinos son los únicos que pueden excretar ooquistes en sus heces; aunque el parásito puede infectar prácticamente a todos los mamíferos y aves (Martín-Hernández, García-Izquierdo, 2003), en ellos no ocurre el ciclo definitivo, sólo lo albergan en sus tejidos. La carne poco cocida pueden ser un vector importante para la infección con el parásito, por lo tanto los vectores o fuentes infecciosas más importantes son: el contacto con gatos (sobre todo los menores de seis meses, pues el gato más viejo adquiere inmunidad y luego no transmite la infección), el consumo de carne poco cocida (de pollo, vacuno o cerdo, la importancia de cada una varía de una región a otra) y el consumo de agua no filtrada o sin hervir (Lora *et al.*, 2007).

2.5 Respuesta Inmunológica del huésped intermedio

La respuesta inmune en los huéspedes intermedios es de forma secuencial, y se determina por la presencia de las inmunoglobulinas IgM, IgG, IgA e IgE en la siguiente forma: (Serrano *et al.*, 1999).

- **IgM:** Es la primera en aparecer después de la infección. Se puede detectar en las dos primeras semanas de haber tenido el primer contacto con el parásito; su presencia promedio se encuentra entre cinco días y cuatro semanas, aunque en un 5% de los pacientes puede permanecer positiva hasta por tres años, razón por la cual la determinación de infección activa en la paciente gestantes es ocasionalmente dificultoso. En consecuencia, los altos títulos de

IgM son indicadores en la mayoría de las veces, aunque no siempre, una infección por *T. gondii* en fase aguda (infección reciente).

- **IgG:** Esta inmunoglobulina se presenta generalmente después de la primera o segunda semana después de la infección, logrando entre la semana 6 y 8 sus mayores picos, pasado esto, los niveles de IgG menguan paulatinamente hasta títulos bajos, que posteriormente perdurarán durante toda la vida; por lo tanto si se detectan títulos de IgG estables, se concluye que es una toxoplasmosis latente, con un tiempo prudente de antigüedad o se establece como una infección superada. En pacientes pediátricos menores de 1 año de edad, sus IgG no se logran distinguir de los anticuerpos maternos, los cuales pueden permanecer en el infante durante varios meses.
- **IgA:** La aparición de la IgA se presenta en la fase primaria de la infección (aproximadamente en las dos primeras semanas del contacto con el agente infeccioso), y su vida media se asimila a la de la IgM, inclusive entre el tercer y noveno mes puede no presentarse en el paciente.
- **IgE:** La vida media de esta inmunoglobulina es más corta que la de la IgA, aunque aparecen al mismo tiempo de aparición, presentando positividad hasta las cuatro semanas después del contacto con el parásito por primera vez, por lo cual puede ser útil en el diagnóstico de infección aguda.

La interpretación de forma acertada de los títulos de inmunoglobulinas circulantes, ésta debe realizarse en conjunto de varias determinaciones. Es decir, si en un caso hipotético, se evidencia títulos altos de IgM e IgA simultáneamente, el diagnóstico más probable es que la infección que se encuentra en fase aguda (aproximadamente siete días postinfección), lo que aprobaría un seguimiento y evaluación mejor ante el riesgo de esta parasitemia en la mujer gestante que ponga en riesgo la salud del feto (Thulliez, 1998).

La respuesta inmune específica del recién nacido es caracterizada por la presencia específica de IgM e IgA, ya que no sobrepasa los límites placentarios como lo hace la IgG. Por lo tanto, debido a la baja estimulación antigénica, el nivel de IgA en los primeros 12 meses de vida en niños es sólo del 20% ante el observado en pacientes adultos, en consecuencia, si se registran porcentajes mayores, se podría considerar como indicio de toxoplasmosis congénita (Serrano *et al.*, 1999).

2.6 Epidemiología de la infección

La zoonosis ocasionada por el *T. gondii*, se encuentra mundialmente distribuida, característica que la distingue de otras parásitosis que afectan sobre todo a los países tropicales, además de no ser endémicas en los países desarrollados (Rosso *et al.*, 2007). Sin embargo, hay variaciones en la prevalencia entre las diversas regiones geográficas, la cantidad de adultos que presentan una seropositividad, es decir, que contienen anticuerpos sanguíneos que indican el contacto con el parásito en su ontogenia, esto se demuestra por la alta prevalencia en Latinoamérica como en México, América Central y Sur América con la excepción de las áreas más meridionales y el Caribe (Chacín-Bonilla *et al.*, 2003).

Estudios epidemiológicos de inmigrantes a África occidental permite conocer la gran incidencia de la infección en esta zona del continente (Chesterton, Perkins, 1967). Incluso existe en estas colosales áreas geográficas, una considerable variación de seroprevalencia, dependiendo de la región, la edad, el sexo, el grupo étnico y las condiciones socioeconómicas y sanitarias, en especial el contacto con gatos y la tierra.

Las formas más graves pueden llevar a la muerte intrauterina o causar secuelas graves si la infección de la madre ocurre en la primera mitad de

la gestación. Un estudio en una población en Brasil demostró una mayor cantidad (13,9%) de mujeres embarazadas con toxoplasmosis activa (por la presencia de anticuerpos IgM) que con sífilis y la enfermedad de Chagas (Vaz *et al.*, 1990). De igual forma se identificó en un estudio en España entre mujeres nacidas en ese país y emigrantes donde se estudiaron a 2.623 mujeres gestantes en donde el 21% presentaron anticuerpos antiToxoplasma. Por otro lado seroprevalencia en mujeres nacidas en España fue del 16% y aumentó con la edad desde el 9% en menores de 25 años hasta el 22% en mayores de 34 y el 51% de las mujeres inmigrantes fueron seropositivas (Tabla N°1)(Álvarez *et al.*, 2008).

Tabla N° 1. Seroprevalencia en embarazadas inmigrantes en función del lugar de nacimiento. Tomado de “Prevalencia e incidencia de la infección por *Toxoplasma gondii* en mujeres en edad fértil en Albacete (2001-2007)”(Álvarez *et al.*, 2008)

Lugar de nacimiento	Mujeres seropositivas/total (%)
Latinoamérica	94/155 (61)
Marruecos	17/41 (42)
África subsahariana	1/5
Europa del Este	58/123 (47)
Europa occidental	0/6
China	0/4
No especificado	11/22 (50)

En diferentes países desarrollados hubo comportamientos de disminución en la prevalencia de la toxoplasmosis, al mejorar las condiciones de vida, reduciendo así la infección del parásito en animales para el consumo humano; por el contrario en las zonas donde existe mayor transmisión, la prevalencia de transmisión congénita es mayor, y por tanto la seroprevalencia aumenta desde edades

tempranas. En Europa existe una gran variación en la seroprevalencia entre mujeres embarazadas (Rosso *et al.*, 2007); en Francia alrededor de 54% presentan anticuerpos positivos anti-Toxoplasma, mientras que en Suecia es tan sólo 12% (Gilbert, 2000) demuestra positividad de la infección .

Para el continente americano, las estadounidenses en embarazo, presentaron una prevalencia del 15% en mujeres entre 15 y 55 años (Jones *et al.*, 2001), por otro lado, en la región central del continente, México reporta alrededor de 35% de la población con infección por el parásito (Gilbert, 2000) mientras que en América del Sur, en Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro) se han informado diferentes valores que oscilan entre 59% y 78% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

En Colombia, el único estudio hasta la fecha que ha tenido en cuenta una amplia población de todo el territorio nacional, realizado entre 1977 y 1980 (Juliao *et al.*), la tasa de seroprevalencia observada en mujeres en edad fértil varió entre 42.5% y 54.4%. Esta seroprevalencia tuvo una distribución desigual en las diferentes regiones del país, pues fue mayor en las regiones Atlántica (56.8%-73%) y Oriental (57.7%-66.2%), y menor en las regiones Pacífica (33%- 37.6%) y Central (31.6%-41.7%). Posteriormente Gómez y colaboradores adelantaron un trabajo en el departamento del Quindío que demostró que el 60% de mujeres embarazadas presentaban anticuerpos, producto del contacto con el agente infeccioso (Gomez *et al.*, 1997). El reciente estudio sobre seroprevalencia en embarazadas de la ciudad de Cali (Rosso *et al.*, 2008) encontró 46.2% (IC 95% 42.9%-49.4%). Estos hallazgos sugieren que existe una constante transmisión del parásito en los últimos 25 años, y a diferencia de otros países no hay pruebas de descenso en la prevalencia.

Vásquez y colaboradores en el 2003, realizó un estudio descriptivo seroepidemiológico en el Departamento del Cauca para determinar la prevalencia de toxoplasmosis porcina en diez mataderos municipales del departamento,

analizando cerdos sacrificados en los mataderos municipales de Santander de Quilichao, Mondomo, El Tambo, Popayán, Totoró, Piendamó, El Bordo, Rosas, Silvia y Mercaderes, mediante la técnica IFI para determinar anticuerpos antiToxoplasma en las muestras de suero colectadas acompañado de una encuesta estructurada para los probables factores de riesgo. De 305 cerdos examinados, 60 (19.7%), resultaron positivos; no se presentaron asociaciones entre las variables evaluadas y las muestras de sueros que resultaron positivas a anticuerpos antiToxoplasma. Lo que representaba una gran pérdida económica a los productores de carne porcina. La prevalencia hallada en el estudio permite reconocer que la toxoplasmosis es una parásitosis subvalorada en el medio y más aún en centrales de sacrificio (Vásquez. LR *et al.*, 2003), lo que puede ser un foco importante de infección al humano por el control sanitario escaso en estas centrales de sacrificio.

Métodos de diagnóstico de toxoplasmosis.

2.7.1 Métodos Serológicos

Habitualmente se han presentado controversias relacionadas con las pruebas de serologías incluidas en el tamizaje para las infecciones maternas, debido tanto a la amplia variabilidad en las características de sensibilidad y especificidad de las mismas (Ambrois, Pelloux, 1998; Jenum, Stray-Pedersen, 1998; Thulliez, 1998), como las diferencias de la respuesta inmunológica de cada persona, que en consecuencia, se puede llegar a una inadecuada interpretación de resultados. Un problema común y por lo tanto uno de los principales en la mayoría de los procedimientos serológicos actualmente utilizados, es la estandarización de los antígenos (Ambrois, Pelloux, 1998).

Las casas comercializadoras y proveedoras existentes promocionan un verdadero mosaico antigénico de los diferentes antígenos reactivos específicos para *T.*

gondii, cada uno de los cuales permite la detección de IgG, IgM, e IgA y que en la realidad se están exponiendo una desigualdad en lenguaje común del tema.

Importantes avances se ha logrado con la implementación de varios sistemas específicos de detección, que aún cuando no son infalibles, utilizan siempre los mismos protocolos y agentes reactivos, razón por la cual, los resultados pueden ser comparables entre sí, consecuentemente existe la posibilidad de seguir con precisión, cambios en los títulos de inmunoglobulinas anti-Toxoplasma para los diferentes isotipos esencial para el diagnóstico de la infección en la mujer gestante. Estos procedimientos implican, por ejemplo, la tradicional detección de IgG por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI); y otras como la localización de IgG, IgM e IgA por diversas formas de Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligado a Enzima (ELISA), con sensibilidades que oscila entre el 91 y 98%, dependiendo de los laboratorios y casas comerciales que fabrican las pruebas, y una especificidad hasta de un 99%. La técnica de Ensayo de Inmunoabsorción por Aglutinación (ISAGA), utilizada para la detección de IgM e IgA, presenta un rango de sensibilidad que va desde un 80% hasta un 90% y una especificidad entre 89 y 95%. (Serrano *et al.*, 1999)

De tal manera que el tamizaje ideal con IgG para la detección de pacientes susceptibles a la infección con *T. gondii* convendría efectuarse antes de la concepción. Esto permite detectar gestantes con títulos positivos para IgG, y consiguientemente una primoinfección antes del embarazo, siendo innecesario un seguimiento de rastreo durante el embarazo con estas pruebas a menos que concurridamente exprese estados de inmunodepresión, y aumenten el el riesgo de una reactivación del parásito.

Para un seguimiento Ideal en toda gestante sin infección previa al embarazo con *T. gondii*, el monitoreo debería ser mensual, lo que permitiría identificar posibles seroconversión durante el transcurso del mismo, y principalmente establecer el

instante preciso o aproximado de la infección en relación con el inicio del embarazo (Ambrois, Pelloux, 1998; Decoster, 1992; Thulliez, 1998). Durante el seguimiento serológico de la gestante, los siguientes casos se pueden presentar (Serrano *et al.*, 1999):

- a) **Títulos de IgG hasta 300 U_I/mL** demuestran positividad por la técnica de ELISA o hasta 1024 en IFI, con IgM negativa, corresponden en su mayoría a pacientes con memoria inmunológica, producto de una infección previa. Si este resultado es obtenido antes de la semana sexta de gestación prácticamente excluye la posibilidad de una toxoplasmosis congénita. Sin embargo no se debe descartar una infección en su inicio inmediato, o una reactivación de una infección previa.

- b) **Títulos de inmunoglobulinas IgG mayores a 300 U_I/mL** por ELISA o superiores a 1024 en IFI, se pueden referir a una fase aguda de la infección, entonces para este caso, se lo recomendable es cuantificar los anticuerpos IgM y repetir el test para IgG pasadas tres semanas; sí los títulos son duplicados y la IgM surge positiva se concluye que la paciente se encuentra en una fase aguda o una infección activa. Con la positividad de este esquema se podría considerar que la infección ocurrió dentro de las 2 semanas anteriores; sin embargo esto se confirmará sólo ante la evidencia de una posterior negativización del anticuerpo IgM que debe ocurrir en la fase aguda dentro de dos a cuatro semanas después de la aparición de este título, o al descenso significativo de las inmunoglobulinas IgG e IgM, o la presencia de IgA e IgE con IgM positiva, en estos casos se hace necesario diagnóstico prenatal para confirmar la infección fetal.

- c) **Inexistencia de títulos IgG y aparición de títulos IgM**, en este caso solo se puede tener una conclusión certera con el análisis comparativo después de 10 a 20 días, antes no, pues la no presencia de 1 IgG a las 3 semanas descarta

prácticamente una infección. Su conversión a positivo, al contrario demuestra una toxoplasmosis reciente. En ciertos casos, la producción de inmunoglobulinas G se hacen evidentes aproximadamente una semana después de un resultado negativo. Si esto se presenta, debe descartarse una transmisión vertical por métodos moleculares en líquido amniótico con el fin de instauración de un tratamiento específico que estaría justificado (Thulliez, 1998).

- d) Gestante que no presente niveles de anticuerpos IgG y no seroconvierta,** se considera que no hay primoinfección ni ha tenido contacto con el parásito, por lo cual se debe prolongar el seguimiento en el embarazo, incluyendo prevención ante una posible infección primaria; Con la aparición de cualquier título positivo detectado en este proceso de gestación, se debe comprender como una seroconversión y requiere descartar la infección fetal mediante las técnicas de diagnóstico prenatal (Ambrois, Pelloux, 1998)

Esta diversidad de resultados permite concluir que existe dificultad para establecer el momento exacto de la seroconversión en la madre, motivo por el cual, se han efectuado técnicas complementarias que tengan una aproximación real al diagnóstico; una técnica utilizada con gran utilidad es la prueba de avidéz, la cual aproximadamente 10 años surge para aplicaciones virológicas (Hedman *et al.*, 1989). En la actualidad se aplica para el diagnóstico de toxoplasmosis, consiste en la medición de la avidéz de IgG por el antígeno toxoplásmico, la cual se incrementa mientras envejece la infección por *T. gondii*. Por lo tanto, lo que se hace es medir la intensidad de la reacción de ELISA, antes y después de la acción de un agente disociador (generalmente urea), el cual tendrá un bajo efecto entre enlaces antígeno-anticuerpo con mucha avidéz como inmunoglobulinas primarias sintetizadas por una infección adquirida con mucha anterioridad, contrastando así con un efecto elevado sobre los enlaces con avidéz más débil lo cual involucra una infección reciente. Entonces al comparar los resultados obtenidos con y sin

disociador, se determinará el índice de avididad, y entre más reciente sea la infección, el índice será más bajo. Por supuesto este método no resuelve todas las dificultades encontradas en la serología de la toxoplasmosis, pero desde un punto de vista práctico este resultado tendría valor puesto que se evitaría la administración de tratamientos inútiles, adicionalmente es posible establecer de manera más exacta si una gestante ha adquirido la infección durante el embarazo, demostrando en una serología, altos títulos de IgG o a la presencia de IgM, y posiblemente anticuerpos IgA.

2.7.2 Diagnóstico de toxoplasmosis por métodos moleculares.

Desde hace más de 3 décadas, la introducción de la tecnología de DNA recombinante como una herramienta para las ciencias biológicas revolucionó el mundo científico para el estudio de la vida. La duplicación molecular permitió el estudio del material genético inmerso en los genes de cada organismo vivo; sin embargo estas técnicas eran dependientes de la obtención de una gran cantidad relativamente de DNA puro. Esto dependió de la réplica del ADN de plásmidos o de otros vectores durante la división de célula de microorganismos (Arnheim, Erlich, 1992).

Los investigadores encontraron considerablemente laborioso y difícil de obtener un DNA específico en cantidad de la abundancia de los genes presentes en una muestra biológica (Appenzeller, 1990). Por lo tanto, implementaron nuevas técnicas que permitiera obtener resultados analíticos, cuantitativos, cualitativos de muestras de ADN. Una de estas técnicas es basada en la replicación del material genético, lo cual permite identificar secuencias específicas como genes por varios ciclos de amplificación llamada reacción en cadena de la polimerasa PCR por sus siglas en inglés, que con el tiempo se han complementado con otras técnicas que ayudan a identificar de forma más precisa fragmentos objetos de estudio mediante

enzimas que reconocen secuencias específicas, cortándolas o induciendo al sitio de restricción, o por el contrario inhibiendo los sitios de restricción.

2.7.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena polimerasa (PCR) es una técnica que fue descrita por primera vez por Mullis y colaboradores en 1986 (Mullis, Faloona, 1987), la cual busca amplificar de manera rápida un gen o un fragmento de éste o de cualquier segmento del DNA, convirtiéndose así en una herramienta muy utilizada en la biología molecular que va desde la identificación de genes claves para prevención de enfermedades como expresión de oncogenes, hasta el diagnóstico de infecciones por bacterias, virus o parásitos como la toxoplasmosis.

Esta técnica molecular consiste en básicamente en la amplificación exponencial del ADN de cualquier organismo, mediante una polimerasa termoestable y una combinación de temperaturas esenciales para la desnaturalización del material genético, emparejamiento de los primers (secuencias cortas de ADN complementario que se hibridan con el ADN molde) o cebadores y elongación de las cadenas. (**Cousillas et al.**, 1999; Rieger et al., 2006). La amplificación es limitada a un fragmento del ADN por dos primers u oligonucleótidos que se unen de forma complementaria a los extremos de una región específica de la cadena de ADN. Actualmente la enzima más universalmente empleada es la ADN polimerasa del microorganismo *Thermus aquaticus* (DNA polimerasa Taq), que permite la síntesis de ADN a temperaturas por encima de los 70°C y resiste perfectamente los 94 - 95°C necesarios para separar las dos hebras de ADN (**Cousillas et al.**, 1999). La PCR es una técnica sensible que debido a la amplificación exponencial del materia inicial, se puede obtener como resultado millones de copias de un solo fragmento de ADN después de 30 o más ciclos estándar. Es por lo tanto una herramienta versátil y de fácil uso, puesto que se puede analizar de forma molecular cualquier célula con material genético.

Para el diagnóstico de toxoplasmosis se implemento esta técnica conociendo las secuencias de ambos lados de la región del DNA toxoplásmico que se desea amplificar, permitiendo que la región definida entre estos dos extremos conocidos sea amplificada las veces que se desee. Por lo tanto es necesaria tan solo una copia de DNA de interés para ser detectado, lo que hace que esta técnica sea extremadamente sensible, pudiendo revelar la presencia de cantidades diminutas del ADN del parásito.

Esta técnica fue utilizada por primera vez para el diagnóstico prenatal de toxoplasmosis en 1990; amplificando el gen B1 (secuencia de referencia para la presencia del parásito en el huésped intermedio) del protozoo a partir de muestras de líquido amniótico. Aunque se presentaron reacciones falsas positivas esporádicas, la PCR fue más sensible que la inoculación en ratones o el cultivo tisular, e identificó correctamente el *T. gondii* en 8 de las 10 muestras de líquido amniótico, en casos comprobados de infección congénita (Grover *et al.*, 1990).

En 1994, esta técnica fue modificada por Hohifeld y colaboradores, haciéndola más sensible. Estos investigadores informan datos sobre 339 muestras consecutivas de líquido amniótico de mujeres infectadas durante el embarazo. La PCR se dirigió al gen B1 y se utilizó descontaminación específica para evitar contaminación sobreagregada, además de un control interno, la secuencia de DNA MI 3mpl8, para determinar la sensibilidad de cada muestra. Cada muestra de líquido amniótico se estudió con esta PCR y fue inoculada en ratón y cultivo tisular; además se determinó al mismo tiempo IgM en sangre fetal, la cual también se inoculó en ratones. Se demostró infección congénita en 34 fetos por métodos convencionales y la PCR fue positiva en todos los 34 casos. En tres casos adicionales, la PCR fue la única prueba positiva; la infección congénita fue finalmente confirmada mediante hallazgos de autopsia en dos casos y por pruebas de seguimiento serológico del niño, en un caso. No hubo ningún resultado falso positivo de la PCR (Hohifeld, 1994).

Por lo tanto, la identificación de ADN toxoplásmico en líquido amniótico es una prueba definitiva de infección fetal, siendo más sensible que las otras pruebas específicas: inoculación a ratones con líquido amniótico o sangre fetal, determinación de IgM o IgA en sangre fetal, consideradas por separado o en conjunto. Otras ventajas adicionales de esta prueba es que los resultados pueden ser obtenidos con gran rapidez, en 24 horas posterior a la toma de la muestra. La muestra de líquido amniótico requerida para el estudio es muy pequeña, entre 3 a 5 cc, esto sumado a su alta especificidad permite tener la oportunidad de iniciar un tratamiento específico y de manera oportuna. Además, la amniocentesis es un procedimiento sencillo, ambulatorio, el cual puede ser realizado a partir de semana 14 de gestación, con riesgos mínimos tanto para el feto como para la madre (Grether, Zavaleta, 1991). Sin embargo aún con la PCR, algunos casos de infección fetal no se identifican, probablemente por una transmisión tardía del microorganismo al feto por medio placentario. Esto lleva a concluir que un diagnóstico prenatal negativo no excluye la posibilidad de una infección congénita y por consiguiente, se enfatiza en la necesidad de no suspender el seguimiento del feto durante la gestación, y del niño posterior al nacimiento (Thulliez, 1998).

2.7.2.2 Electroforesis

La electroforesis se basa en la migración de solutos iónicos bajo la influencia de una corriente eléctrica; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), dependiendo de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Cabe destacar que a nivel analítico, las técnicas electroforéticas son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza(Sánchez, Ramírez, 2006).

Un gel de agarosa tamiza (separa) los fragmentos de acuerdo a su tamaño por peso molecular) mediante electroforesis. En una placa se colocan las moléculas sobre un gel. Se aplica una diferencia de potencial. Los nucleótidos contienen fosfatos con carga negativa que son atraídos hacia el polo opuesto mientras que el gel genera fricción que impide su avance. La densidad de carga (número de fosfatos en cada nucleótido) es constante para las cuatro bases, por lo que la distancia que recorre cada molécula depende de su tamaño (peso molecular) y forma. La doble cadena de ADN siempre adopta la forma de una doble hélice rígida, pero las cadenas sencillas pueden tomar varias formas dependiendo de la atracción (enlaces de hidrógeno) entre bases complementarias. Después de un tiempo estandarizado, se tiñe el resultado. Se obtiene lo que se conoce como patrón de restricción. Las moléculas grandes avanzan poco, debido a la fricción; los fragmentos menores llegan más lejos. Utilizando marcadores de peso molecular (moléculas de peso conocido) se ha descubierto que los fragmentos avanzan una distancia que es directamente proporcional a su peso.

3. ANTECEDENTES

3.1 Estudios de Seroprevalencia.

Los estudios correspondientes al tema de la toxoplasmosis muestran que a nivel mundial esta infección se distribuye de tal forma que afecta a cualquier humano sin discriminar raza, sexo y edad. Para Latinoamérica la toxoplasmosis se encuentra ampliamente distribuida, presentando anticuerpos anti *T. gondii* positivos hasta en 65% en la población. Se han descrito elevadas prevalencias en países como: Chile (Contreras *et al.*, 1996; Schenone *et al.*, 1986), Brasil , Ecuador (Frenkel *et al.*, 1984), Panamá (Sousa *et al.*, 1988), Costa Rica (Frenkel, Ruiz, 1980), México (Velasco *et al.*, 1992), Cuba (Hernández, Izquierdo, 2003) y Venezuela (Méndeza *et al.*, 2009; Varela *et al.*, 2009).

En la isla de la República de Cuba la infección con el protozoo es abundante, y la presencia de anticuerpos específicos varía entre 50-75% en relación al área geográfica analizada y especialmente de la técnica empleada. En el 2003 Hernández e Izquierdo realizaron un estudio seroepidemiológico en 922 donantes Banco de sangre del Municipio Marianao, Ciudad de la Habana, con el fin de conocer la prevalencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii*, sus concentraciones formuladas en U/ml y el comportamiento de la positividad con la edad; encontrando una prevalencia de inmunoglobulinas reactivas de 73,43%, además de un incremento de la positividad con la edad y una disminución de los porcentajes de reactividad en la medida que incrementan los títulos. La presencia de anticuerpos IgG específicos se comportó de manera similar para los grupos etáreos de 20-24, 25-29 y 30-34 años, no se encontró diferencias significativas entre ellos, sin embargo, las edades de 35-39 y de 40 ó más años difirieron significativamente ($p < 0,05$), pero no difirieron entre sí (Hernández, Izquierdo, 2003).

La gran distribución espacial del parásito ha llevado a que se adelanten medidas que se inclinan a la prevención de esta infección, de esta forma se han adelantado estudios que permiten identificar el estado de esta zoonosis. En Venezuela se adelantó un estudio descriptivo de corte transversal donde se determinó el comportamiento de la infección toxoplásmica en la Comunidad de Charallave, municipio Bermúdez, Estado de Sucre, el período comprendido entre abril y septiembre del año 2006. Analizaron 343 pacientes seleccionados por muestreo aleatorio simple caracterizando la población del estudio de acuerdo a variables sociodemográficas. Se determinó la prevalencia serológica de anticuerpos IgG anti *T. gondii*, mediante hemaglutinación indirecta y se identificaron los principales factores de riesgo asociados a la infección toxoplásmica. Los resultados obtenidos mostraron que predominó el grupo etáreo de 16 a 30 años, el sexo femenino y el Estrato III de nivel socioeconómico. La tasa de prevalencia serológica de anticuerpos IgG anti *T. gondii* fue de 63.56/100 habitantes y los factores de riesgo de infección toxoplásmica que más influyeron fueron: convivencia conjunta con gatos y perros, consumo de frutas y vegetales crudos o sin lavar y consumo de agua no potable (Varela *et al.*, 2009).

En contraste en este mismo país, en una comunidad marginal del Municipio Maracaibo, Estado Zulia, se analizó si existía asociación entre los factores de riesgo e infección con *T. gondii*. Se realizó una encuesta epidemiológica que incluyó datos personales, condiciones sanitarias de la vivienda y convivencia con gatos y se examinaron 254 muestras de suero de individuos de ambos sexos, con un rango de edad de 8 meses a 76 años. La determinación de anticuerpos anti-*T. gondii* se realizó a través de la técnica de hemaglutinación indirecta. La prevalencia de infección fue de 36,6%, observándose que el 21,5% de los sueros positivos presentaron títulos considerados no significativos (1:64), 51,6% títulos intermedios (1:128 a 1:512), 24,8% títulos altos (1:1024 a 1:4096) y 2,1% títulos muy altos (1:8192). El mayor porcentaje de seropositividad (50%) se observó en el grupo de 46 años. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en

relación al sexo y las pruebas de Chi cuadrado reveló que no existe asociación estadísticamente significativa entre los factores de riesgo (convivencia con gatos, condiciones sanitarias de la vivienda) y la presencia de infección (Suárez *et al.*, 2009).

Estudios seroepidemiológicos realizados con diferentes pruebas inmunológicas, han evidenciado la elevada prevalencia de la toxoplasmosis a nivel mundial y alrededor de un 40% de mujeres en edad fértil tienen riesgo de sufrir una primoinfección por *T. gondii* durante el embarazo (Suárez *et al.*, 2009)

En Brasil se han encontrado prevalencias en población general de 50 a 76%, y la frecuencia de toxoplasmosis congénita varía de 0,2 a 2%. En Colombia, según estudios realizados en diferentes regiones, las frecuencias en el embarazo van de 0,6 a 3%. Actualmente, el Ministerio de Protección Social en Colombia no tiene reglamentación para la realización de pruebas durante el embarazo para la toxoplasmosis e igual situación ocurre en otros países de América Latina. En el estado Rio Grande Do Sul, en Brasil, existe un programa de tamizaje neonatal pero este se ofrece solo a población que pueda pagar por él.

En Colombia, según el Estudio Nacional de Salud realizado en 1980, la prevalencia en la población general es de 47%. La prevalencia aumenta con la edad y existen variaciones importantes entre las regiones. Así la prevalencia más alta fue encontrada en la región de la costa Atlántica con un 63% mientras que en la región pacífica fue de 36%.

En la ciudad de Armenia (Quindío) se ha instaurado un programa de la Secretaría de Salud de Armenia para la población vinculada que cubre alrededor de 900 gestantes y se detectan entre dos a cinco casos cada año. En esta ciudad se ha encontrado que se presenta mortalidad neonatal en la población no cubierta por el programa pero no en los hijos de madres detectadas y tratadas. En el resto del

país en ausencia de intervención terapéutica entre 800 a 3.000 recién nacidos nacen infectados cada año, así en Sincelejo (Departamento de Sucre, Colombia) en 100 gestantes se encontraron dos seroconversiones y entre los hijos de estas madres se presentó un mortinato (Gómez *et al.*, 1995).

3.2 Estudios de identificación y genotipificación de *T. gondii* por métodos moleculares

En el 2003, Gómez y colaboradores estandarizan y validan clínicamente la prueba de PCR para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por VIH. Utilizando un estudio de casos y control reclutados en los centros hospitalarios de referencia (tercer nivel) de Bogotá y Armenia con 15 casos de toxoplasmosis cerebral y 75 controles, todos fueron pacientes con infección por VIH, para las mediciones de las pruebas se utilizó la amplificación del gen B1 se realizó con una PCR anidada y la de SAG2 con una PCR simple. Obteniendo como resultados que con los iniciadores para el gen B1 se detectaron hasta 10 fg de ADN de la cepa de *T. gondii* diluída en agua, la sensibilidad disminuyó a 1 pg si se diluía en sangre. Con los iniciadores para el gen SAG2 se detectó 1 pg de ADN del parásito purificado. Dentro del grupo de casos dos muestras de sangre amplificaron con los iniciadores del gen B1, para una sensibilidad de 13,3% y ninguna muestra con los iniciadores para el gen SAG2. La especificidad fue del 100%, concluyendo así que los resultados presentados, muestran que la prueba de PCR en sangre de pacientes infectados por el VIH tiene un valor limitado para el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral pero confirma un diagnóstico clínico cuando es positivo (Ponce, Gómez, 2003).

Hacia el 2004, se presentaron resultados de una caracterización biológica de una nueva cepa de *T. gondii* (CIBMUQ/HDC), basada en cultivo *in vitro* y análisis de virulencia en ratón, y la identificación por métodos moleculares (PCR) fue obtenida amplificando el gen de múltiples copias específico B1 para *T. gondii*; siguiendo así

con la genotipificación por RFLP del gen que codifica para el antígeno de membrana SAG2 y el análisis por microsatélites de un aislamiento clínico de toxoplasmosis congénita ocurrido en Armenia (Colombia). Este análisis de virulencia en ratón demostró que esta cepa tenía una dosis letal (DL_{100}) de 10 taquizoítos. La genotipificación y el análisis por microsatélites dieron como resultados que esta cepa pertenecía al tipo o grupo clonal 1 y denominándola así HOM/CTCO/2002/CIBMUQ/BL/HDC (nombre abreviado: CIBMUQ/HDC). Esta nueva cepa CIBMUQ/HDC se encuentra disponible como linaje de referencia del país para estudios tanto a nivel nacional como internacional (Gallego *et al.*, 2004).

Un análisis genético del locus SAG2 se realizó para determinar la prevalencia de los genotipos principales de *Toxoplasma gondii* (SAG2 tipos I, II y III), asociada con los humanos, gatos, pájaros y la toxoplasmosis en conejillo de India. Esta tipificación se realizó directamente de muestras precedentes de pacientes y tejidos de autopsia de humanos o animales. Un total de 50 de 146 muestras fueron positivas por el ensayo de PCR para la identificación del gen B1 específico para toxoplasma y luego fueron analizadas por PCR-RFLPs para la amplificación y restricción de gen SAG2, necesario para la genotipificación de las cepas. La caracterización de los genes SAG2 tuvo éxito en 33 (66%) de las muestras, la genotipificación indicó que 31 muestras (93,9%) fueron SAG2 tipo I, 1 fue SAG2 tipo III y 1 fue atípico. En las aves y los gatos de todas las muestras fueron I. Los resultados SAG2 soportan un predominio del SAG2 *Toxoplasma* tipo I circulante en humanos y animales en América del Sur (Gallego *et al.*, 2006). Hasta hace poco, el *T. gondii* se consideró clonal con muy poca variabilidad genética. Puesto que estudios recientes indican que el parásito aislados de Brasil son genéticamente y biológicamente diferentes los aislamientos de EE.UU. y Europa (Dubey *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2006).

La genotipificación de *T. gondii* en los 53 aislamientos con 10 marcadores utilizando PCR-RFLPs (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, 358,

PK1 y Apico) reveló 57 cepas con 15 genotipos. Cuatro corderos tuvieron infecciones de dos genotipos de *T. gondii*. Veintiséis (45,6%) cepas pertenecen al linaje de tipo II, ocho (15,7%) cepas pertenecen al linaje del Tipo III. Los restantes 22 cepas fueron divididos en 11 genotipos atípicos. Estos resultados indican la prevalencia del parásito de alta y una alta diversidad genética de *T. gondii* en los corderos, que tiene importantes implicaciones en la salud pública. Por lo tanto esta fue la primera en profundidad el análisis genético de *T. gondii* aislados de ovejas en los EE.UU. (Dubey *et al.*, 2007)

Existe poca información disponible sobre la presencia de *T. gondii* viable en los tejidos de los corderos en todo el mundo. La prevalencia del parásito se determinó en 383 corderos (<1 año de edad) de Maryland, Virginia y Virginia Occidental en EE.UU. Los corazones de 383 corderos fueron obtenidos de un matadero el día del sacrificio. La sangre extraída de cada corazón se puso a prueba para anticuerpos antiToxoplasma mediante la prueba de aglutinación modificada (MAT). Los corazones de 68 corderos seropositivos fueron utilizados para el aislamiento de microorganismos viables por bioensayo en gatos y/o ratones. Para los bioensayos en gatos, el miocardio o 500 gramos de peso fue picado para alimentar a los gatos, se les dio un corazón por gato y las heces de los gatos fueron examinadas por presencia de ooquistes. En el caso de los bioensayos en ratones, se alimentaron con 50 g de miocardio digerido en solución de pepsina. En total, 53 cepas del agente infeccioso se obtuvieron a partir de 68 corderos seropositivos (Dubey *et al.*, 2007).

En este estudio, se genotipificó 19 aislamientos del protozoo en pollos de seis países africanos (Egipto, Kenya, Nigeria, Congo, Malí y Burkina Fasco) con 10 marcadores PCR-RFLP (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, 358, PK1, y Apico). Los resultados muestran cuatro genotipos. Trece aislados pertenecientes al linaje tipo III, cinco con alelos de tipo II en todos los loci, excepto el Apico y que pertenecen al linaje del tipo II. Una cepa de Nigeria se determino

como atípica. En general, estas cepas eran en su mayoría de clones de tipo III, II y cepas que predominan en América del Norte y Europa. La secuenciación del ADN en varios loci de los aislamientos representativos, confirmó los resultados de la PCR-RFLP (Velmurugan *et al.*, 2008).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

- Detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en una población de mujeres embarazadas en el departamento del Cauca mediante la identificación del gen B1 específico a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.2 Objetivos específicos.

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del gen B1 específico para *T. gondii*.
- Establecer la frecuencia de toxoplasmosis mediante la identificación por PCR del gen B1 específico para *T. gondii*, en muestras seropositivas para toxoplasmosis de sangre periférica de la población a estudio.
- Identificar la frecuencia de los factores de riesgo epidemiológicos en mujeres embarazadas en el Departamento del Cauca.

5. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Las muestras de sangre colectadas son provenientes de un estudio epidemiológico previo, donde fue establecida la seroprevalencia de toxoplasmosis, por la detección de anticuerpos IgG e IgM antiToxoplasma utilizando la técnica de ELISA en mujeres gestantes de 14 municipios del departamento del Cauca. (Morales *et al.*, 2009)

5.1 Población de estudio.

Las muestras de sangre periférica objeto de análisis provinieron de 160 mujeres embarazadas pertenecientes a 12 municipios del Departamento del Cauca a las cuales se les informó y explicó de manera clara las finalidades del estudio y beneficios de este. Las participantes firmaron voluntariamente un consentimiento informado donde donaban dos vacuntainer (uno para las pruebas serológicas y otro para las pruebas de PCR), cada uno de 5mL de sangre periférica por venopunción con riesgos mínimos en la toma de la muestra, las cuales fueron seropositivas para toxoplasmosis sin reporte de seroconversión; los municipios que participaron en el estudio fueron, Santander de Quilichao, El Tambo, Popayán, Totoró, Piendamó, El Bordo, Rosas, Silvia, Cajibío, Morales, Caldon, Timbio, Jambaló y Toribío. Las mujeres que participaron en este estudio están distribuidas por municipios como lo presenta el Tabla N°2.

Tabla N°2. Distribución de mujeres seropositivas.

Municipio de procedencia de las mujeres embarazadas seropositivas	n (%)
Popayán	35 (21,9)
Cajibío	3 (1,9)
Caldono	26 (16,3)
El Tambo	9 (5,6)
Rosas	1 (0,6)
Santander de Quilichao	6 (3,8)
El Bardo	28 (17,5)
Silvia	8 (5,0)
Timbío	6 (3,8)
Totoró	6 (3,8)
Morales	7 (4,4)
Piendamó	25 (15,6)
Total	160 (100)

5.2 Técnicas Moleculares.

Las pruebas moleculares utilizadas, se basaron en la extracción de ADN y amplificación del material genético con el fin de identificar en un gel de agarosa por electroforesis el agente infeccioso en sangre periférica de los pacientes objeto de estudio.

5.2.1 Extracción de ácido nucleíco (ADN).

La extracción del material genético de las muestras de sangre conservadas durante 8 meses en nevera, se realizó mediante la técnica tradicional de Fenol Cloroformo, utilizando el protocolo descrito previamente (Duque *et al.*, 2001; Montenegro *et al.*, 2006) y estandarizándolo para las condiciones del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca (ver anexo 1).

5.2.2 Amplificación del gen B1 por PCR anidada.

Para las condiciones de amplificación del gen B1 se estandarizó, tomando como base la metodología planteada por Lora y colaboradores en el 2007, la cual consta de una PCR anidada, donde se emplearán 4 tipos de oligonucleótidos específicos (Tabla N°3), Toxo N1 y Toxo C1, para una primer reacción de amplificación, posteriormente una segunda amplificación del producto inicial mediante los iniciadores Toxo N2 y Toxo C2 (Lora *et al.*, 2007).

Tabla No 3. Primers de amplificación para el gen B1 de *T. gondii*. Tomado de “Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero, 2007” (Lora *et al.*, 2007).

Gen	Primer	Longitud	Secuencia Primer
B1	N1	21bp	5' GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG 3'
	C1	20bp	5' TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC 3'
	N2	21pb	5' TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG 3'
	C2	23pb	5' GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC 3'

La preparación de la mezcla necesaria para la reacción de amplificación (Master Mix), se preparó en las cantidades y concentraciones presentadas en la tabla 4. La reacción se llevo a cabo en un termociclador (PTC-100, Bio-Rad) con las condiciones finalmente estandarizadas para la primera PCR en la amplificación del gen B1, las cuales fueron: una primera fase de iniciación a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos distribuidos de la siguiente manera: Desnaturalización a 94°C por 1 minuto, con un alineamiento de primers de 53°C durante 50 segundos y una extensión y elongación en 72°C por 1 minuto. Finalmente se llevara a una Extensión final en 72°C durante 10 minutos (ver anexo 2).

Tabla N°4. Componentes de la mezcla para la amplificación del gen B1 de *T. gondii*.

Reacción	Componente	Volumen
Primera reacción de PCR	Agua desionizada (Mili Q)	8,0µL
	Dinucleotidos Trifosfatados libres (dNTPs) a 2µM	2,5µL
	Primer Toxo-N1® (Promega)	2,5µL
	Primer Toxo-C1® (Promega)	2,5µL
	Buffer 1X (Green GoTaq®, Promega)	2,5µL
	Cloruro de Magnesio (MgCl ₂ ®, Promega)	3,0µL
	DNA Taq Polimerasa (GoTaq FLEXI DNA polimerasa®, Promega)	0,3µL
	ADN genómico	2,0µL
	Volumen Total	23,3µL
Segunda reacción de PCR (Anidada)	Agua desionizada (Mili Q)	8,0µL
	Dinucleotidos Trifosfatados libres (dNTPs) a 2µM	2,5µL
	Primer Toxo-N2® (Promega)	2,5µL
	Primer Toxo-C2® (Promega)	2,5µL
	Buffer 1X (Green GoTaq®, Promega)	2,5µL
	Cloruro de Magnesio (MgCl ₂ ®, Promega)	3,0µL
	DNA Taq Polimerasa (GoTaq FLEXI DNA polimerasa®, Promega)	0,3µL
	Amplificado de la primera reacción	2,0µL
	Volumen Total	23,3µL

Para la segunda reacción (PCR anidada) se emplearon los mismos volúmenes requeridos en la primera reacción, y 2 µL del producto amplificado. Las condiciones del amplificación para esta reacción fueron: Una fase de Iniciación a 94°C por 5 minutos, seguido de 14 ciclos que comprenden una desnaturalización a 94°C por 1 minutos, un alineamiento o anillado de primers a 53°C durante 30 segundos y una extensión y elongación en 72°C durante 30 segundos, y una fase de extensión final a 72°C durante 10 minutos (ver anexo 3).

Se determinó positiva la muestra con una banda de 97pb, producto de la reacción total que indicará la presencia del parásito en sangre circulante. Se utilizo como

control positivo ADN de *T. gondii* tipo I, (Cepa RH) donada por el Grupo de Investigación en Parasitología Molecular del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, y como control negativo se utilizó agua desionizada. El resultado del amplificado se visualizó en un gel de agarosa (SeaKem®, Cambex) al 2% sumergido en TBE 0,5X en una cámara electroforética horizontal (Bio-Rad, Mod. Sub-Cell GT Mini) y corrida a un voltaje de 130 V durante 25 min.

5.3 Análisis estadístico.

En este estudio descriptivo observacional transversal, se analizó una serie de casos representativos con un diagnóstico inicial de toxoplasmosis por serología, reafirmando este diagnóstico con métodos moleculares.

La prevalencia y frecuencia de cada una de las variables socio-demográficas y factores de riesgo relacionados a la toxoplasmosis en mujeres embarazadas con presencia del gen B1 (secuencia de referencia para la presencia de *T. gondii* en sangre periférica), se analizó mediante estadística descriptiva, con el fin de hallar los promedios y frecuencias con sus respectivos porcentajes.

Tabla N° 5. Operacionalización de Variables Socio-demográficas.

Variable	Naturaleza	Escala de medición	Tipo	Indicador
Procedencia de la paciente	Cualitativa	Nominal	Independiente	Popayán Cajibío Caldono El Tambo Rosas Santander de Quilichao El Bardo Silvia Timbío Totoró Morales Piendamó
Procedencia de la paciente (categórica)	Cualitativa	Nominal	Independiente	Norte del Cauca Oriente del Cauca Centro del Cauca Sur del Cauca
Edad	Cuantitativa	Escala	Independiente	Años cumplidos de las pacientes
Edad (categórica)	Cuantitativa	Categórica, Nominal	Independiente	< 20 años De 21 a 25 años De 26 a 30 años > 30 años

Tabla No 5 (Continuación). Operacionalización de Variables Socio-demográficas.

Edad Gestacional (Semanas)	Cuantitativa	Numérica	Independiente	Semanas de gestación cumplidas
Edad Gestacional (categórica)	Cuantitativa	Categórica, Ordinal	Independiente	Primer trimestre de gestación Segundo trimestre de gestación Tercer trimestre de gestación
Ocupación	Cualitativa	Nominal	Independiente	Ama de casa Comerciante Agricultura Secretaria Estudiante Auxiliar de Laboratorio Odontóloga Docente Medica Militar
Régimen de Salud	Cualitativa	Nominal	Independiente	Régimen vinculado Régimen subsidiado Régimen contributivo Desplazado
Escolaridad	Cualitativa	Nominal	Independiente	Ninguna Primaria Secundaria Técnica Universitaria

Tabla No 6. Operacionalización de Factores de Riesgo Prevalentes en la Población.

Variable	Naturaleza	Escala de medición	Tipo	Indicador
Gen de <i>T. gondii</i>.	Cualitativa	Nominal	Dependiente	Gen B1 de 97pb que determina la presencia de <i>T. gondii</i> .
Agua para el consumo en el hogar	Cualitativa	Nominal	Independiente	Acueducto Rio o Laguna Pozo Tanque Aljibe Embotellada
Consumo de carne	Cualitativa	Nominal	Independiente	Si consume No consume
Tipo de carne que consume	Cualitativa	Nominal	Independiente	No Consume Res Cerdo Conejo Curí Aves de Corral Otros
Forma de consumo de carne	Cualitativa	Nominal	Independiente	Cruda Poco cocida Bien cocida No consume

Tabla No 6 (Continuación). Operacionalización de Factores de Riesgo Prevalentes en la Población.

Hábitos de higiene (lavarse las manos) al preparar alimentos	Cualitativa	Nominal	Independiente	Nunca A veces Siempre No prepara
Hábitos de higiene (lavarse las manos) antes de consumir alimentos	Cualitativa	Nominal	Independiente	Nunca A veces Siempre No prepara
Hábitos de higiene (lavarse las manos) después de salir del baño	Cualitativa	Nominal	Independiente	Nunca A veces Siempre No prepara
Lavar vegetales para consumo	Cualitativa	Nominal	Independiente	Nunca A veces Siempre No consume
Lavar frutas para el consume	Cualitativa	Nominal	Independiente	Nunca A veces Siempre No consume
Estado del Agua al beber	Cualitativa	Nominal	Independiente	Hervir Sin hervir Mixta
Tenencia de Gatos	Cualitativa	Nominal	Independiente	Si tiene No tiene

6. RESULTADOS.

Después de adaptado el protocolo de extracción de ADN por la técnica de Fenol Cloroformo, se procesaron 160 muestras de sangre periférica para la extracción del ácido nucleico. Se tuvo en cuenta la concentración del material genético extraído con el fin de evitar al máximo, el no encontrar rastro del genoma del parásito. Para este estudio, todas las extracciones de ADN se cuantificaron por medio de un cuantificador de ácidos nucleídos que utiliza los principios de la espectrofotometría para hallar la concentración de estas moléculas.

Tabla N°7. Cuantificación de ADN.

ADN	Media	± D.S.	Mínimo concentración µg/µL	Máxima concentración µg/µL
Concentración	1,8063899	0,22630754	0,00095	1,48180
Pureza	0,2493965	0,35194785	0,73077	2,70000

Los resultados obtenidos, nos mostró que la cantidad mínima de ADN humano y parasitario amplificado en cada reacción varió desde $0,00095^{\mu\text{g}}/\mu\text{L}$ hasta $1,48180^{\mu\text{g}}/\mu\text{L}$ (tabla 7), lo cual es superior que lo reportado por la literatura como necesario para encontrar taquizoitos circulantes en sangre, asumiendo que se logró extraer el ácido nucleico de los taquizoitos circulantes.

6.1 Estandarización de la PCR, como método de diagnóstico en la toxoplasmosis.

Los resultados de este estudio se obtuvieron después de estandarizar las pruebas moleculares que permitieron la identificación del gen B1 del genoma de *T. gondii* (figura 3), que muestra una infección del parásito en el organismo.

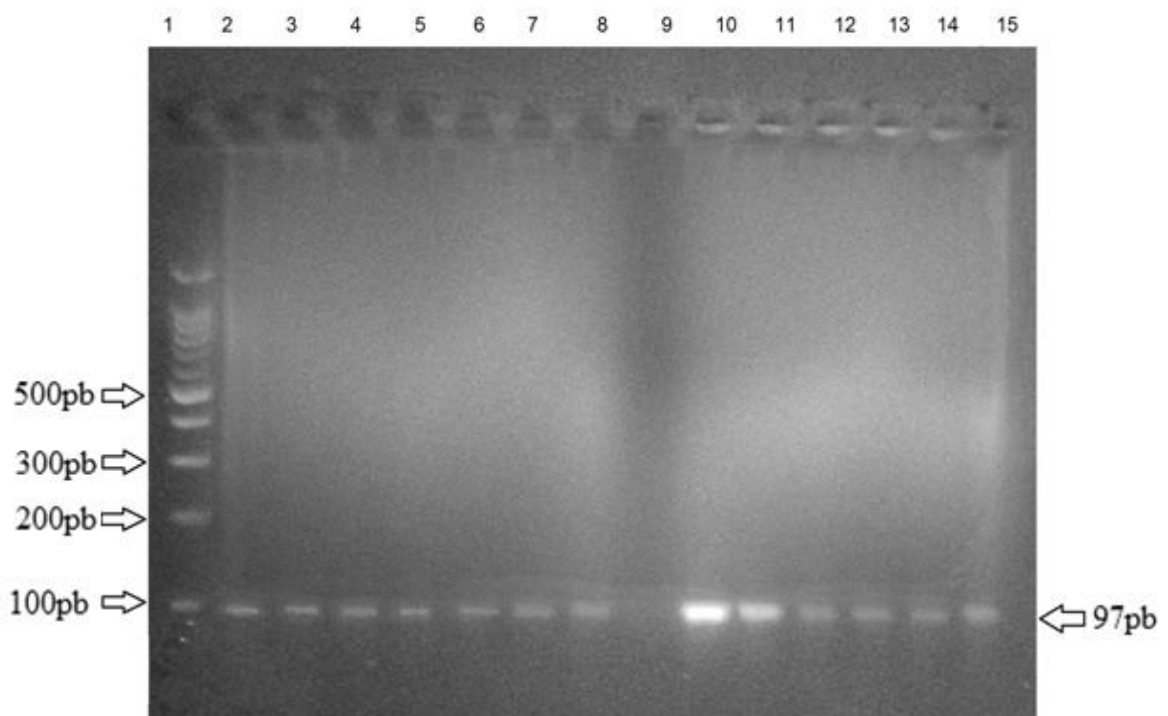
El proceso de estandarización se logró, modificando las cantidades, concentración y condiciones de amplificación, para ello se llevó a cabo la preparación de reactivos y componentes necesarios para la reacción de PCR, en cámara de flujo laminar previamente esterilizada con hipoclorito al 10%, posteriormente con alcohol al 70% y finalmente irradiada con luz ultravioleta junto con los demás materiales necesarios (puntas, micropipetas, gradillas, etc) durante un periodo de 20 a 30 minutos. Se tomó en cuenta la metodología de preparación de la mezcla de amplificación del gen B1, definida por el Grupo de Estudios en Parasitología Molecular GEPAMOL en el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío.

El primer paso para la estandarización fue identificar la cantidad correcta de la fuente energética de la reacción, el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) se aumentó y disminuyó en $0,5\mu L$ del volumen planteado en los protocolos de referencia, con el propósito de desaparecer las bandas inespecíficas, sin embargo no hubo alteración en el resultado final, por lo que se decidió trabajar con el volumen establecido inicialmente (tabla 4); por otra parte el tiempo de alineación de los primers, que varió de 1 minuto inicialmente a 50 segundos a la misma temperatura ($53^{\circ}C$) en la primera reacción, ayudó al perfeccionamiento de emparejamiento de los iniciadores a la secuencia que contiene la región diana (gen B1), por lo tanto mejoraron los patrones de bandas en las electroforesis (ver anexo 2).

La segunda reacción (PCR anidada), no tuvo modificaciones, y se identificó con éxito la banda esperada (97pb) como lo muestra la figura 3. La estandarización de esta prueba tuvo como resultado una sensibilidad del 100% puesto que el resultado para todas las muestras de las pacientes fueron positivas para la presencia del protozoo. Para los controles negativos, se utilizó agua molecular en remplazo de ADN parasitario, el cual se tuvo en cuenta para detectar posibles contaminaciones con material genético de otro organismo en la reacción (ver anexo 3).

El control positivo (cepa RH, ADN genómico del agente infeccioso tipo I) determinó el patrón de banda específico para la presencia de *T. gondii* (97pb) que equivale al tamaño del gen B1, utilizado para la identificación del protozoo en organismos que este parasita. la alta concentración de ADN puro del parásito, hizo que la presencia de la banda fuera más pronunciada (brillante), y esto debido a la gran cantidad de moléculas de ADN amplificado, razón por la cual se distingue a las demás, por otro lado, las muestras de las pacientes con positividad en la PCR, muestran una patrón de bandas más tenues que el control positivo, y se debe a que al encontrar menos taquizoitos en circulación, se obtiene de estos una menor concentración de ADN

Figura N°3. Producto de amplificación del gen B1 (97pb) en pacientes gestantes con toxoplasmosis. 1) Marcador de peso molecular de 100pb, pozo 2 al 8 y del 11 al 15, son pacientes con infección por el parásito, 9) Control Negativo (agua desionizada), 10) Control Positivo (Cepa de *T. gondii* tipo I, RH).



Como se ve en la figura 3, la presencia del parásito es evidente excepto en el pozo 9 (control negativo) debido a que no contiene ningún tipo de muestra (material genético), lo que descarta cualquier tipo de contaminación en la

reacción, los pozos restantes (del 2 al 8 y del 11 al 15), pertenecen a pacientes con infección por *T. gondii*, y esto es válido afirmarlo debido a que la banda formada por el producto concuerda con la banda del control positivo que corresponde con tamaño del gen B1 teniendo como parámetro de medición el marcador molecular de 100pb en el primer pozo.

6.2 Características Socio-demográficas

Las características socio-demográficas de la población evaluadas, fueron cedidas con su información complementaria para la ejecución de esta segunda etapa de la investigación, donde de las encuestas realizadas a las pacientes en la primera fase del estudio por Morales y colaboradores en el 2009 (primera fase), se retomaron algunas de las características de importancia y se analizaron por estadística descriptiva, de la siguiente manera:

El promedio de edad en la población de 24,43 (\pm D.E 6,441) y las mujeres muestreadas estuvieron en un rango de edad que osciló entre los 14 años y los 45 años de edad. La constante en esta población fue el estado de gestación, la cual obtuvo un promedio de 27,64 (\pm D.E 9,373) semanas de gestación, donde la paciente con menor edad gestacional era de 5 semanas y la de mayor edad era de 40. Se identificaron los cuartiles en la edad de las embarazadas para poder identificar los rangos de los años cumplidos de las mujeres; esta edad, se categorizó en 4 grupos (Tabla N°8), donde se obtuvo que 54 (33,8%) mujeres estaban en un rango de menor a 20 años el cual es el mayor número de gestantes del grupo total. Y la minoría se presentó en mayores de 31 años con 29 (18,1%), lo que nos indica que la infección puede iniciar en edades tempranas y por lo tanto aumenta el riesgo de contagio a el feto (toxoplasmosis congénita) en caso de embarazo en jóvenes si las madres no han desarrollado la suficiente inmunidad ante el parásito. Al categorizar el departamento del Cauca, se encontró que el área que más presentaba positividad era el centro del departamento, con 94 mujeres infectadas con toxoplasmosis de 160 totales para el estudio, estas equivalen al 58,8% de la población total. Mientras que en el sur del Cauca se presenta la infección en 26 (16,3%) gestantes. Como se muestra en la tabla 7, los municipios de la parte occidental del departamento no

presentan ningún dato, esto es debido a que la toma de las muestras se hicieron en 14 municipios, de las cuales solo fueron tomados 12 ya que dos de ellos no reportaron

seropositividad en las muestras pues las únicas pacientes que reportaban (una paciente por cada municipio), era seronegativa, y no cumplía con el requerimiento (resultados seropositivos) para hacer parte del análisis del estudio.

Tabla N° 8. Características socio-demográficas de la población.

Variables		n (%)
Procedencia de la Población (Zona del Cauca)	Norte y Oriente del Cauca	40 (25)
	Centro del Cauca	94 (58,8)
	Sur del Cauca	26 (16,3)
Edad del Paciente	≤ 20 años	54 (33,8)
	21 a 25 años	44 (27,5)
	26 a 30 años	33 (20,6)
	≥ 31 años	29 (18,1)
Régimen de Salud	Vinculado	39 (24,4)
	Subsidiado	109 (69,1)
	Contributivo	12 (7,5)
Ocupación	Ama de Casa	111 (69,4)
	Agricultura	9 (5,6)
	Otros	30 (28,9)
Nivel de Educación	Ninguna	9 (5,6)
	Educación Básica	131 (81,9)
	Educación Superior	20 (12,5)
Edad Gestacional	Primer Trimestre	17 (10,6)
	Segundo Trimestre	39 (24,4)
	Tercer Trimestre	104 (65)

El perfil de la población en cuanto a su tipo de afiliación a los diferentes tipos de régimen de salud (vinculado, subsidiado y contributivo), mostró que la mayoría de población estudiada se encontraban en un régimen subsidiado con 109 (69,1%) mujeres, lo que demuestra un nivel socioeconómico bajo en la población, pues tan solo 7 pacientes (12,5%), pertenecen a un régimen contributivo. Las actividades que más presentaron presencia del parásito fueron las mujeres que se dedicaban al hogar (amas de casa), donde se obtuvo

111 gestantes que ejercían esta acción, siendo el mayor porcentaje (69,4%) del grupo estudiado. Se identificó que un porcentaje de 28,9% (30 gestantes) presentaron positividad en la PCR, estas pacientes desarrollaban oficios como odontología, medicina, y empleos de oficina; seguido a esto el 5,6%, es decir 9 pacientes tenían empleos donde la agricultura estaba en sus actividades diarias, Los niveles educativos reportados en este estudio, muestran que la mayoría de mujeres con toxoplasmosis, escasamente han terminado sus estudios básicos, pues el 81,9% de la población total, había terminado o estaba cursando la secundaria, y en algunos casos (59 gestantes que pertenecen al 36,9%) cursaban o habían terminado tan solo la primaria y en el peor de los casos, se encontró que había pacientes que no habían tenido ningún tipo de estudio (9,6% de las gestantes), sin embargo se presentaron mujeres con estudios superiores a nivel tecnológico y universitario, con el 12,5% de la población estudiada.

6.3 Prevalencia de los factores de riesgo

Los factores de riesgo presentados en este estudio, se identificaron de la primera fase del mismo (Morales *et al.*, 2009), donde se tomó una población de 653 mujeres embarazadas de 14 municipios del Departamento del Cauca y se establecieron los factores de riesgo para esta población por métodos serológicos. Las variables que se tuvieron en cuenta para este estudio, fueron cedidas junto con la información complementaria recolectada en el estudio de Morales y colaboradores, con el fin de identificar la prevalencia de estos factores de riesgo (Tabla N°9), en mujeres solamente con diagnóstico de toxoplasmosis por serología y reconfirmadas por biología molecular (PCR). Los datos arrojados por los análisis de estadística descriptiva mostró que la mayoría de las mujeres 128 (80%) aunque obtenían el agua del acueducto pero el tratamiento de estas aguas en muchos de estos municipios el tratamiento es mínimo y en algunos casos nulos, por lo que convierte el consumo directo del líquido sin tratar se convierte en un foco de infección para la población (Arcos, Garcia, 2009). El consumo de agua sin tratar en este estudio mostró que el 59,4% de las gestantes la ingerían sin hervir o rara vez la hervían por lo tanto obtuvo el mayor porcentaje de mujeres positivas para el parásito en esta

categoría, seguido, el consumo de agua tratada (hervida o agua embotellada) presentó el 40,6% de las embarazadas.

Tabla N°9. Prevalencia de los factores de riesgo.

Factores de Riesgo		n (%)
Lugar de obtención del agua	Acueducto	128 (80)
	Pozo	12 (7,5)
	Río o laguna	10 (6,3)
	Tanque	6 (3,8)
	Aljibe	4 (4,3)
Tipo de agua	Tratada	65 (40,6)
	Sin Tratar	95 (59,4)
Tenencia de gatos	No tiene gatos	43 (26,9)
	Tiene gatos	117 (73,1)
Consume de carne	No consume carne	23 (14,4)
	Consume carne	137 (85,6)
Tipo de carne que consume	No consume carne	13 (8,2)
	Res	43 (26,8)
	Cerdo	98 (61,3)
	Conejo	6 (3,7)
Como consume la carne	Cruda o poco cocida	26 (16,2)
	Bien cocida	121 (75,6)
	No consume carne	13 (8,1)
Se lava las manos antes de comer	Nunca o A veces	67 (41,8)
	Siempre	83 (58,2)
Se lava las manos antes de preparar alimentos	Nunca	40 (25)
	A veces	120 (75)
Se lava las manos después de salir del baño	Nunca o A veces	38 (23,8)
	Siempre	122 (76,2)
Lava frutas y verduras	Nunca	120 (75)
	A veces	33 (20,6)
	Siempre	4 (2,5)
	No consume	3 (1,85)

En este estudio se observó que el consumo de carne de las participantes fue alto, tal como se registra en la tabla 9, pues el 85,6% de la población objeto de estudio, afirmó el consumo de carne, lo que es congruente con las costumbres colombianas y mundiales en general. El tipo de carne que más consumen las gestantes es la de cerdo pues un 61,3% de la población, asevera consumirla, y el 26,8% dice consumir carne de res. Si a esto le sumamos que la preparación

de la carne para el consumo no es la adecuada, crece los niveles de riesgo de contagio; los resultados de las frecuencias de los factores de riesgo asociados a la toxoplasmosis muestran que de la población encuestada para este estudio, 26 mujeres que equivalen el 16,2% de la población total, consume la carne poco cocida o cruda, mientras que 121 (75,6%) consume la carne bien cocinada situación que favorece al individuo de posibles contagios.

Los hábitos de higiene de la población estudiada en general, son bueno en cuanto al lavado de las manos antes de comer y salir del baño, pues la mayoría de las mujeres 83 (58,2%) y 122 (76,2%) respectivamente, siempre se lavaban las manos, lo que indica que existe un grado favorable de conciencia en los beneficios de mantener buenos hábitos de higiene, sin embargo para estas mismas variables 67 (41,8%) y 38 (23,8%) correspondientemente, no consideran la higiene como un factor protector a enfermedades como la toxoplasmosis lo que puede ser un foco importante de transmisión. Las frecuencias de gestantes que lavan los alimentos (frutas y verduras) antes consumirlos es preocupante pues 120 embarazadas (75%) nunca lava los vegetales y el 20,6% a veces los lavan. Lo que demuestra el alto riesgo de contagio de la población por este medio.

6.4 Características socio-demográficas y factores de riesgo significativos.

Al hacer el análisis con las pruebas de chi cuadrado en tablas de contingencia se encontraron que había asociación entre dos características sociodemográficas y dos factores de riesgo frecuentes en la población con toxoplasmosis como lo muestran las tablas 10 y 11.

Tabla N°10. Régimen de salud y tipo de agua que consumen las gestantes.

Régimen de Salud del Paciente		Tipo de Agua que Consume el Paciente		Total
		Tratar	Sin Tratar	
Vinculado	Frecuencia	8	31	39
	% dentro de Régimen de Salud del Paciente	20,5%	79,5%	100,0%
Subsidiado	Frecuencia	49	60	109
	% dentro de Régimen de Salud del Paciente	45,0%	55,0%	100,0%
Contributivo	Frecuencia	8	4	12
	% dentro de Régimen de Salud del Paciente	66,7%	33,3%	100,0%
Total	Frecuencia	65	95	160
	% dentro de Régimen de Salud del Paciente	40,6%	59,4%	100,0%
Prueba de Chi Cuadrado de Pearson	Valor de <i>p</i> IC 95%	0,005		

Los valores que muestra la tabla 10 surgen del cruce entre la tipo de agua que consume la población encuestada con positividad para toxoplasmosis, y demuestra que hay una significancia estadística ($p=0,005$) entre estas características; el régimen subsidiado y vinculado son las que más consumen agua sin tratar al tener 60 y 31 gestantes respectivamente que no consumen el agua hervida o con algún tipo de tratamiento previo al consumo, mientras que las personas que pertenecen al régimen contributivo consumen el agua hervida o embotellada lo que es un factor protector ante la infección.

Tabla N°11. Nivel Educativo y Lavarse las manos antes de preparar los alimentos

Nivel de Educación del Paciente		Se lava las manos antes de preparar los alimentos		
		Nunca	A veces	Total
Ninguna	Frecuencia	3	6	9
	% dentro de Nivel de Educación del Paciente	33,3%	66,7%	100,0%
Educación Básica	Frecuencia	19	101	120
	% dentro de Nivel de Educación del Paciente	15,8%	84,2%	100,0%
Educación Superior	Frecuencia	8	8	16
	% dentro de Nivel de Educación del Paciente	50,0%	50,0%	100,0%
Total	Frecuencia	30	115	145
	% dentro de Nivel de Educación del Paciente	20,7%	79,3%	100,0%
Chi cuadrado de Pearson	Valor de <i>p</i> IC 95%	0,004		

La tabla 11 muestra la relación significativa estadísticamente entre el nivel educativo y los hábitos de higiene como lavarse las manos antes de preparar los alimentos ($p= 0,004$), donde vemos que las costumbres de limpieza en los niveles educativos inferiores como las personas analfabetas y los que cursan o no terminaron su educación básica favorece en la adquisición de la infección con el parásito, pues las gestantes de educación media básica tienen el mayor porcentaje, pues el 84,2% de las gestantes que cursan ya sea primaria o secundaria, rara vez se lavan las manos antes de preparar los alimentos, y el 15,8% nunca lo hace, lo cual demuestra que no se tiene en cuenta el contagio por este medio.

7. DISCUSIÓN.

7.1 Estandarización de la PCR.

Con la estandarización de la PCR, se obtuvo un 100% de positividad en las muestras de sangre periférica, identificando de forma satisfactoria el gen de referencia para *T. gondii* (B1) bajo la condiciones de los laboratorios del Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada, de la facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad del Cauca. Además, se ha referenciado por la literatura citada, donde en otros estudios se ha aplicados métodos moleculares para la identificación y diagnóstico de toxoplasmosis en muestras de sangre periférica (Ponce, Gómez, 2003), de líquido amniótico (Gómez, 2005; Marín, 2007; Serrano *et al.*, 1999), y líquido cefalorraquídeo (LCR)(Zambrano *et al.*, 2006), muestran que la PCR, tiene una especificidad que oscila entre 60% y el 99% (Bessières *et al.*, 2009; Castaño-Osorio *et al.*, 2007; Vidigal *et al.*, 2002).

Los métodos serológicos actualmente utilizados, presentan limitaciones que permiten a la biología molecular ser implementada en el protocolo del diagnóstico de la toxoplasmosis, en casos donde la variación de anticuerpos (bajos títulos que no representen positividad para la infección con el parásito o haya casos de seroconversión) son cruciales para el diagnóstico acertado de la toxoplasmosis, dado así, versatilidad a la prueba, además, por la técnica de PCR anidada, se puede obtener resultados en corto tiempo (24 - 48 horas después de tomada la muestra) (Serrano *et al.*, 1999) comparada con el tiempo que se llevaría por inoculación en ratón que es de tres a seis semanas ó el cultivo celular que toma de cuatro a 10 días (Montoya *et al.*, 1996).

Las diferentes manifestaciones de la infección en el humano, ha hecho que métodos como la PCR, sea esencial y necesario para el diagnóstico de algunos tipos de toxoplasmosis, como es el caso de la toxoplasmosis congénita (Okay *et al.*, 2009), toxoplasmosis ocular (De la Torre *et al.*, 2005; Martín-Hernández,

García-Izquierdo, 2003) y toxoplasmosis cerebral (Eggers *et al.*, 1995; Ponce, Gómez, 2003; Roth *et al.*, 1994), entre otras.

La identificación del parásito por presencia de ADN de este en el líquido amniótico es una manifestación clara de la infección del feto, lo que puede desencadenar un conjunto de patologías graves en el desarrollo embrionario. Motivo por el cual, se han implementado técnicas con bajo riesgo en la toma de la muestra tanto para la madre como para el bebé (Serrano *et al.*, 1999).

Estas metodologías tienen como finalidad, evidenciar la infección fetal mediante el reconocimiento de genes o fragmentos de ellos que identifiquen al material genómico del protozoo en este medio, y la prueba mundialmente utilizada para este caso, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pues gracias a la alta sensibilidad, se ha logrado identificar a partir de un solo taquizoito que equivale a 0,05 - 0,2pg de ácido desoxirribonucleico para el caso del gen B1 referente para toxoplasmosis (Torres, 2007)

Actualmente, la secuencia de B1 es utilizada universalmente para la identificación del parásito tanto en quistes tisulares o cerebrales, como en cualquier tipo de fluido corporal (sangre, humor acuoso, LCR, líquido amniótico), no obstante por medio de la biología molecular, el tema de la toxoplasmosis ha tenido avances en el conocimiento del desarrollo, virulencia y biología del protozoo. Secuencias específicas en diferentes proteínas ha permitido analizar el comportamiento del parásito tanto al momento de la infección (diseminación por torrente sanguíneo), como en el cambio de la homeostasis del huésped al alojarse de manera definitiva en él.

Otros genes se han utilizado para la identificación del parásito en huéspedes intermedios como el gen P30, y el gen 18S rDNA, que han mostrado menos sensibilidad que el gen B1, debido a que en el genoma del parásito, las secuencias para B1 se repiten 35 veces (Ponce, Gómez, 2003), mientras que el gen P30 y el gen ribosomal 18S, son genes de única copia, razón por la cual disminuye la sensibilidad de identificación del *T. gondii*. Otra ventaja que han

determinado la especificidad del gen, es el de poseer una secuencia que permite la unión de primers específicos, pues en diferentes trabajos se ha utilizado para medir la especificidad de los iniciadores haciendo reacciones con ADN bacteriano y fúngico sin tener ningún resultado positivo (Jones *et al.*, 2000). Otros estudios han demostrado que la PCR, tiene alta sensibilidad en el reconocimiento de fracciones de ADN, pues las cantidades mínimas para el gen B1 en especial, van desde 10fg (Lora *et al.*, 2007; Ponce, Gómez, 2003) hasta 1fg (Gallego *et al.*, 2006) de material genético.

Estudios realizados a nivel mundial que apuntan a la identificación de tipos de toxoplasma mediante análisis multilocus (Dubey *et al.*, 2007; Gallego *et al.*, 2006; Howe *et al.*, 1997; Velmurugan *et al.*, 2008), han determinado tres grandes clasificaciones para los tipos clonales del parásito, denominados tipo I, II y III, donde por múltiples bioensayos en animales experimentales como ratones, han establecido que el linaje tipo I es la más virulenta (Ajioka *et al.*, 2001; Howe *et al.*, 1997; Sibley, Boothroyd, 1992); un estudio adelantado por Gallego en el 2004 (Gallego *et al.*, 2004), cita que la virulencia del tipo clonal I es tal, que la dosis letal 100 en ratones, requiere de un solo taquizoito viable, mientras que para los tipos II y III la dosis letal 50 requerida es mayor o igual a 1000 (Kim, Weiss, 2004). La clasificación de estos tipos de toxoplasma he han correlacionado clínicamente con diferentes manifestaciones de la toxoplasmosis humana. El tipo clonal I y los clones atípicos están habitualmente coligados a graves casos de toxoplasmosis congénita, mientras que el linaje II se ha localizado en 65% de las cepas aisladas de casos de reactivación en inmunodeprimidos con VIH y el prototipo III se ha evidenciado comúnmente de animales y, ocasionalmente, en casos humanos (Howe, Sibley, 1995).

7.2 Características socio-demográficas de la población

Los niveles socioeconómicos de las personas de este estudio son prácticamente bajos, pues la mayoría de gestantes pertenecen a un régimen subsidiado, razón por la cual en algunos casos es dificultoso el acceso

oportuno a los servicios de salud, sea para charlas de prevención y en caso de infección, una oportuna atención. Esto es congruente con la literatura, pues personas de bajos recursos económicos, tienden a presentar más este tipo de infecciones como la toxoplasmosis, tal como lo demuestra un estudio de seroprevalencia de *T. gondii* en mujeres embarazadas en el municipio de Valledupar (Cesar) en el 2007 (Torres, 2007).

Aunque la mayoría de las mujeres dijeron ser amas de casa un pequeño porcentaje tenía labores agrícolas, suelen ser un factor que favorece la infección pues este tipo de oficios que incluye el contacto directo con el campo donde la mayoría de gatos en estado silvestre y domésticos hacen sus deposiciones al aire libre, contaminando así estas áreas incluido el agua, vegetales y frutas (Montoya, Liesenfeld, 2004). En este aspecto la infección del individuo por la ingestión de agua contaminada es un factor de riesgo importante para la transmisión del protozoo (Castro *et al.*, 2008).

Los bajos niveles de educación presentados en esta investigación, que en algunos casos hasta esta fecha son nulos (analfabetismo) y donde el mayor número de gestantes no han terminado sus estudios básicos, no permiten concientizar a ciertos grupos poblacionales de los posibles riesgos y consecuencias que trae la adquisición de estas infecciones. Esta afirmación se sustenta con estudios hechos a nivel nacional, donde tienen en cuenta los niveles educativos dentro del análisis sociodemográfico, un ejemplo claro es el estudio realizado en el 2008 en Villavicencio (Meta)(Castro *et al.*, 2008), donde se estudiaron 300 mujeres embarazadas de 5242 que asistían a control prenatal y demostró que el 27,7% tenía una secundaria completa y que el 48,9% había terminado el bachillerato, mientras que la población con primaria completa y primaria incompleta ocupaban el segundo lugar con 13,8% y 8,5%, respectivamente.

Según la edad gestacional de la madre además de darle un valor agregado a las características de sociodemografía de la población objeto de estudio, es también catalogado como un factor de riesgo importante para la transmisión del

parásito al feto por vía placentaria, pues se sabe que la toxoplasmosis congénita está fuertemente relacionada con el periodo de gestación de la madre y dependiendo del tiempo en que la gestante es infectada, puede tener repercusiones graves en el bebe. Para este estudio se presento que 17 (10,6%) mujeres se encontraban en el primer trimestre del embarazo, 39 (24,4%) en el segundo y 104 (65%) en el tercero, siendo este ultimo el mayor numero de gestantes. Según la revisión de Ramos en el 2009 (Ramos, 2009), las consecuencias de la infección fetal por *T. gondii* dependen del momento gestacional en que el parásito atraviese la placenta por lo tanto, las primoinfecciones juegan un papel severo en las patologías que se puedan presentar en el feto; Ramos afirma que en el primer trimestre de estación se ha reportado un 14% de fetos infectados, en el segundo un 29% y un 59% en el tercer trimestre de la concepción.

La infección de la madre de forma temprana, es decir, en la primera mitad en el embarazo, representa un bajo riesgo para el feto, debido a que la placenta es más competente para contener al parásito, pero si se produce el paso del agente infeccioso entre los tejidos fetales, los daños producidos son más graves como infecciones congénitas severas y en algunas ocasiones mortales como muerte fetal *in utero* y hasta aborto espontáneo. A medida que la madre avanza en el embarazo, la senescencia placentaria provoca una permeabilidad de la membrana que posibilita en mayor proporción el paso del parásito, por lo tanto la infección fetal es mayor; sin embargo sus efectos son menos graves. Una vez el protozoo franquea los limites placentarios, se desarrolla una septicemia fetal diseminando así el parásito en diferentes tejidos y órganos fetales, teniendo más tropismo por células cerebrales, retinianas y tejido muscular pero en algunos casos se dirigen a órganos como el corazón, hígado, bazo, entre otros (Ramos, 2009; Rosso *et al.*, 2007). En la mayoría de los partos, específicamente el 75% de los neonatos no presentan sintomatología, sin embargo con el paso de los años este mismo porcentaje, el 75% desarrolla patologías oculares como coriorrenitis y el 50% desarrolla patologías en el sistema nervioso central (Gómez *et al.*, 1995).

Esto lleva a que los diagnósticos de infecciones en el embrión no se realizan a tiempo para prevenir patologías severas en el bebé, pues los programas de seguimiento prenatal no tienen un seguimiento continuo durante el periodo gestacional, adicional a esto, las metodologías empleadas para la identificación del parásito, tanto en la madre como en el hijo puede ser inespecífica y confusa en algunos casos, pues las pruebas serológicas presentan algunas limitaciones, por ejemplo en caso de seroconversiones o en la insuficiencia de títulos reactivos para diagnosticar la infección, además presentan controversia en la interpretación de resultados positivos, pues mucho de los presuntos títulos observados del feto, pueden ser confundidos con los de la madre, incluso hasta varios meses después del nacimiento.

7.3 Frecuencia de los factores de riesgo.

Los reportes mundiales, proponen el consumo del agua como uno de los principales factores de riesgo para adquirir la toxoplasmosis, en este estudio soporta que tipo del agua, en especial el consumo de agua sin tratar o hervir es un factor que favorece el contagio (tabla 10) y mas se denota en la población con recursos económicos desfavorables, y esto debido que al tomar agua de cualquier lugar (pozo, lago, rio) puede estar contaminada por oocitos de heces felinas, además de esto, un estudio adelantado en el Departamento del Cauca demuestra que hasta el agua de los acueductos de los municipios del departamento tiene poco tratamiento para el consumo, de ahí que se le atribuye enfermedades diarreicas agudas (EDA) e infecciones con bacterias patógenas y parásitos como el *T. gondii* al consumo de agua sin hervir (Arcos, Garcia, 2009). Además esto coincide con estudios realizados en Colombia, como el realizado en el departamento del Quindío en el 2007, donde se identifican 3 factores de riesgo directos con la infección, entre ellos el consumo de bebidas con agua sin hervir (OR: 4,5, IC95 % 1,1-17 p=0,01), mientras que tomar agua en botella o tratada fue un factor protector (OR: 0,24, IC95 % 0,06-0,95, p=0,02)(Marín, 2007).

De igual forma, el estudio realizado por Pino y colaboradores (Pino *et al.*, 2009), identificó que un escuadrón de 20 hombres las fuerzas armadas colombianas que adelantaban operaciones en zonas selváticas en el municipio de La Macarena en el Departamento del Meta, llegaron al hospital militar Nueva Granada en Villavicencio con sospecha de toxoplasmosis, diagnóstico que se confirmó con pruebas serológicas y descartó en dos de ellos la presencia del parásito. Los 18 restantes fueron positivos para los anticuerpos específicos anti-Toxoplasma, y se identificó que la fuente de infección de los militares, fue la ingestión de oocitos por medio de agua sin tratar, debido a la escasez de agua potable en la zona.

Otro factor importante es la convivencia de las pacientes con gatos, pues se presento un 73,1% de pacientes que tiene como mascota a gatos, un porcentaje alto que representa un factor de riesgo fuerte para el contacto con el agente infeccioso, pues al ser el felino el único huésped definitivo hasta ahora descrito, el estudio de Morales y colaboradores (primer fase de este estudio), demuestra que el convivir con gatos aumenta el riesgo de adquirir toxoplasmosis 1,32 veces que las que no conviven con ellos (OR 1,32, IC 95%, $p=0,014$) (Morales *et al.*, 2009). Otras investigaciones en el territorio nacional coinciden en que la tenencia de gatos aumentan la probabilidad de contagiarse con el parásito, como el trabajo desarrollado por López y colaboradores, demuestra que el contacto con estos animales incrementa significativamente el riesgo de infección con el parásito en mujeres embarazadas (OR 9,00 IC 95% y $p=0,03$) (López Castillo *et al.*, 2005).

Los hábitos de higiene son importantes pues previene en gran parte la infección con el protozoo, enfatizando en el lavado de manos, pues el estudio de Morales *et al.*, demuestra que el lavarse las manos en ocasiones o nunca hacerlo, incrementaba el riesgo de contagio 2 veces que las que si lo hacían siempre, lo que atribuye una diferencia significativa ($p=0,041$) entre los grupos con diferentes hábitos de higiene (Morales *et al.*, 2009).

Las costumbres de lavarse las manos antes de preparar los alimentos en la mayoría de la población es pobre pues 110 gestantes a veces se lava las manos para preparar los alimentos; la relación de este factor con el nivel educativo tal como lo muestra la tabla 11 muestra una relación significativamente estadística ($p=0,004$), y la mayor concentración de esta costumbre la presenta las gestantes con niveles de educación básico, en complemento se le atribuye al contagio también el que nunca lavan las frutas y los vegetales antes de consumirlos. Las investigaciones adelantadas en el tema de la toxoplasmosis indican que el consumo de alimentos contaminados y los malos hábitos de higiene, es un foco de trasmisión del parásito; para este caso en particular la no constancia en el lavado de las manos y el no lavar los alimentos para prepararlos son factores importantes en la infección (Lora *et al.*, 2007), al igual que el consumo de carne infectada con quistes tisulares como lo afirman varios estudios (Dubey *et al.*, 2005; López Castillo *et al.*, 2005; Lora *et al.*, 2007), donde el consumo de carne, y más precisamente la carne cerdo, es uno de los blancos de infección, y esto se corrobora con el estudio adelantado por Vásquez y colaboradores (Vásquez. LR *et al.*, 2003), donde observan una seroprevalencia de toxoplasmosis porcina de 60 (19,7%) en 305 cerdos de 10 mataderos de diferentes municipios del Departamento del Cauca. Estos hallazgos nos orientan que los cerdos, especialmente los criados en campo son un vector importante de transmisión parasitaria, pues este tipo de omnívoro se alimenta de prácticamente de cualquier residuo alimenticio, frutas, hiervas, vegetales y en algunas ocasiones de excremento que puede estar contaminado con oocitos de *T. gondii*. Esto hace que los porcinos no criados adecuadamente sea uno de los vectores de contaminación más importantes para la trasmisión del protozoo.

Los resultados en este estudio muestran que la mayoría de mujeres positivas para toxoplasmosis consumen carne y de cerdo, aunque en otros estudios demuestran que el consumo de carne en especial la de cerdo es importante en la trasmisión, en contraste, para este caso no se asoció como factor de riesgo importante para la trasmisión del parásito esto lo reporta la investigación de factores de riesgo realizado en el Cauca en relación con la toxoplasmosis

(Morales *et al.*, 2009), mostró que el consumo de carne no tenía una diferencia significativa estadísticamente ($p=0,4$) con la presencia del parásito en las gestantes, pues hubo una mayor frecuencia de mujeres que consumía la carne bien preparada (546) que las que la consumían mal preparadas (49), por lo tanto su OR, no fue definido, al no encontrar asociación. Isaza en su revisión sobre toxoplasmosis como zoonosis parasitaria, sustenta que la ingestión de carne mal preparada es un factor predominante en la infección, puesto que la ingestión de quistes tisulares es común y esta es una forma de contacto con el parásito sin tener acercamiento con el felino y áreas que este frecuenta (Isaza, 2007).

8. CONCLUSIONES.

- Las condiciones óptimas para la PCR anidada, para la ciudad de Popayán en el Departamento del Cauca, son: Utilizar un volumen de 3,0 uL de MgCl₂ y con un tiempo de alineamiento de 50 seg a 53°C, en la primera reacción.
- Este estudio concluye que la PCR anidada, es una prueba que permite una identificación del parásito en el paciente (mujer gestante), pero que no permite una identificación exacta del momento de la infección, por lo que una PCR negativa no excluye un infección reciente.
- Se deja un primer aporte para el Departamento del Cauca, que es la estandarización de una técnica de biología molecular de detección directa de ADN del *T. gondii* por PCR en muestras de sangre periférica.
- El perfil socio-demográfico de las mujeres embarazadas participantes en el estudio mostró que existe un grado medio educativo al presentar la mayor proporción de mujeres que tenían estudios de básica primaria y secundaria, lo cual constituye un problema de concientización en la población, al no tener las bases suficientes que aclaren los riesgos que conllevan los pocos cuidados prenatales.
- Las prevalencia en los factores de riesgos en la población, como el consumo de agua no potable, carne mal cocida y el contacto con felinos (gatos domésticos coinciden con otros estudios nacionales.

9. RECOMENDACIONES.

- ❖ Se recomienda implementar las investigaciones en biología molecular, para identificar los diferentes tipos clonales y su asociación clínica con la población caucana.
- ❖ Además de buscar estrategias con metodologías investigativas que permitan complementar los programas de control prenatal, implementando pruebas de laboratorio como las moleculares que permitan llegar a un diagnóstico preciso y rápido de la infección para los diferentes tipos de pacientes que se presentan a las entidades de salud.
- ❖ Ampliar los horizontes de investigación en el Departamento del Cauca, que permitan abarcar la mayoría de los municipios, o por lo menos se tenga en cuenta población de cada uno de las zonas caucanas, elevando así la reproducibilidad y validez de las investigaciones al incrementar los tamaños de muestra.
- ❖ Por último, es pertinente recomendar crear campañas sociales y charlas comunitarias que concienticen de los constantes peligros de infección a los que se exponen las diferentes comunidades.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Ajioka J, Fitzpatrick J, Reitter C (2001) *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med* 20, 1-19.
- Ajzenberg D, Banuls A, Su C, *et al.* (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 34, 1185-1196.
- Álvarez J, Serrano M, Parrado L, Ortuño S, Sánchez M (2008) Prevalence and incidence in Albacete, Spain, of *Toxoplasma gondii* Infection in Women of Childbearing Age. Differences between Immigrant and non-Immigrant (2001-2007). *Revista española de salud pública* 82, 333-342.
- Ambrois T, Pelloux H (1998) Toxopiasmosis congénita, avances en el diagnóstico serológico y molecular, 19-23.
- Antinori A, Ammassari A, De Luca A, *et al.* (1997) Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: a decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology* 48, 687-694.
- Appenzeller T (1990) La secuencia de la DNA. *Science* 2, 247.
- Arcos LT, Garcia JA (2009) *Estudios sobre la morbilidad y mortalidad de las enfermedades de origen hídrico en los municipios del Departamento del Cauca* Trabajo de grado, Universidad del Cauca.
- Arnheim N, Erlich H (1992) Estrategia De la Reacción en Cadena De la Polimerasa. *Revisión Anual de la Bioquímica* 61, 131 - 156.

- Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PFG (2002) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction—food for thought? *International Journal for Parasitology* 32, 1193-1199.
- Bahia-Oliveira L, Jones J, Azevedo-Silva J, *et al.* (2003) Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North. *Emerging Infectious Diseases* 9, 55.
- Bessières M, Berrebi A, Cassaing S, *et al.* (2009) Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 389-392.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC (1989) Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 1787-1792.
- Castaño-Osorio J, Vallejo G, Franco-Andrew D, de Schoeder M, Giraldo-García A (2007) Determinación de las características clínico-epidemiológicas de la neuroinfección en pacientes con diagnóstico de VIH/sida en el departamento del Quindío. *Infectio* 11, 173-182.
- Castro A, Góngora A, González M (2008) Seroprevalencia de anticuerpos a *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas de Villavicencio, Colombia. *Orinoquia* 12, 91 - 100.
- Contreras M, Schenone H, Salinas P, *et al.* (1996) Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 38, 431-435.

- Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, *et al.* (2000) Risk Factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: European multicentre case control study. *Br Med J* 321, 142-147.
- Cortázar T, Hernández J, Echeverry M, Camacho M (2006) Papel de la vacuola parasitófora de macrófagos de ratón infectados por *Leishmania amazonensis* en la adquisición de moléculas. *Biomédica* 26, 26-37.
- Cousillas AL, Valiente A, Ezpeleta I, García-Bragado F (1999) Valor de la reacción en cadena de la polimerasa en el estudio de los síndromes linfoproliferativos. 22.
- Chacín-Bonilla L, Sánchez Y, Estévez J, Larreal Y, Molero E (2003) Prevalence of human toxoplasmosis in San Carlos island, Venezuela. *Interciencia* 28, 457-462.
- Charleston WAG (1994) *Toxoplasma* and other protozoan infections of economic importance in New Zealand. *New Zealand journal of zoology* 21, 67-81.
- Chesterton J, Perkins E (1967) Ocular toxoplasmosis among Negro immigrants in London, pp. 617-621.
- Dabanch P J (2003) Zoonoses. *Revista chilena de infectología* 20, 47-51.
- Daguer H, Vicente RT, Costa T, *et al.* (2004) Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. *Ciência Rural* 34, 1133-1137.
- De la Torre A, López CA, Gómez JE (2005) Vitreítis sin retinocoroiditis en toxoplasmosis ocular. *Asociación Colombiana de Infectología* 9, 244 - 248.

- Decoster A (1992) Serodiagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis: contribution of an UP30, marker of an evolutionary infection. *Sanofi diagnosis Pasteur* 27.
- Dobrowolski J, Sibley L (1996) Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84, 933-940.
- Dubey J, Graham D, Blackston C, et al. (2002) Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *International Journal for Parasitology* 32, 99-105.
- Dubey J, Lindsay D, Speer C (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews* 11, 267-299.
- Dubey J, Sundar N, Hill D, et al. (2007) High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*.
- Dubey JP, Gomez-Marin JE, Bedoya A, et al. (2005) Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Veterinary Parasitology* 134, 67-72.
- Dupouy-Camet J, De Souza SL, Maslo C, et al. (1993) Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 1866-1869.
- Duque C, Uribe F, Latorre Sierra G, et al. (2001) Análisis de asociación de polimorfismos en DNA mitocondrial y diabetes Mellitus tipo 2. *pruebas iatreia* 14.

- Eggers C, Groß U, Klinker H, *et al.* (1995) Limited value of cerebrospinal fluid for direct detection of *Toxoplasma gondii* in toxoplasmic encephalitis associated with AIDS. *Journal of neurology* 242, 644-649.
- Fialho CG, de Araujo FAP (2003) Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. *Ciência Rural* 33.
- Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen SW (1993) Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2327-2331.
- Foudrinier F, Aubert D, Puygauthier-Toubas D, *et al.* (1996) Detection of *Toxoplasma gondii* in immunodeficient subjects by gene amplification: influence of therapeutics. *Scandinavian journal of infectious diseases* 28, 383.
- Frenkel J (1973) Toxoplasmosis: Parasite Life Cycle, Pathology, and Immunology. *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma, and Related Genera*, 343.
- Frenkel J, Lazo R, Lazo J (1984) Encuesta sobre infección toxoplásmica en un grupo de alumnos del tercer año de medicina y en un número igual de gatos, de la ciudad de Guayaquil. *Rev. Med. trop. Parasit* 1, 17-22.
- Frenkel J, Ruiz A (1980) Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 29, 1167.
- Gallego C, Castaño J, Giraldo A, *et al.* (2004) Caracterización biológica y molecular del aislamiento CIBMUQ/HDC, una cepa colombiana de referencia para *Toxoplasma gondii*. *Biomédica* 24.

- Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín JE (2006) Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica* 97, 161-167.
- Gilbert R (2000) Epidemiology of infection in pregnant women. *Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Paris: Springer-Verlag*, 237-249.
- Gómez JE (2005) Evaluación del tratamiento de la toxoplasmosis gestacional en una cohorte colombiana. *Infectio* 9.
- Gómez JE, Castaño JC, Montoya MT (1997) A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío (Colombia) and application of mathematical models to estimate incidence using age-stratified data. *Am J Trop Med Hyg* 57, 180-186.
- Gómez JE, Castaño JC, Montoya MT (1995) Toxoplasmosis congénita en Colombia: Un problema subestimado de salud pública. *Colombia Médica* 26, 66-70.
- Grether P, Zavaleta M (1991) Diagnóstico prenatal en 350 amniocentesis; Prenatal diagnosis in 350 amniocentesis. *Ginecol. obstet. Méx* 59, 317.
- Grover C, Thulliez P, Remington J, Boothroyd J (1990) Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 2297.
- Hedman K, Lappalainen M, Seppäiä I, Mäkelä O (1989) Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *The Journal of infectious diseases* 159, 736-740.
- Hernández M, Izquierdo S (2003) Prevalencia de anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii* en donantes de sangre cubanos. *Rev Biomed* 14.

- Hill D, Dubey J (2002) *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology & Infection* 8, 634-640.
- Hohifeld P (1994) Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331, 695 - 699.
- Howe D, Honore S, Derouin F, Sibley L (1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1411.
- Howe D, Sibley L (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease *J Infect Dis* 172, 1561 - 1566.
- Hu K (2008) Organizational Changes of the Daughter Basal Complex during the Parasite Replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 4, e10.
- Isaza MR (2007) Toxoplasmosis: zoonosis parasitaria. *Revista CES MEDICINA Volumen* 21.
- Jenum P, Stray-Pedersen B (1998) Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2907.
- Jones C, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S (2000) Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Investigative ophthalmology & visual science* 41, 634-644.
- Jones J, Kruszon-Moran D, Wilson M, et al. (2001) *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *American journal of epidemiology* 154, 357.

- Juliao O, Corredor A, Moreno GS Estudio Nacional de Salud: Toxoplasmosis en Colombia, Ministerio de Salud. Bogotá: Imprenta Instituto Nacional de Salud; 1988. *Links*.
- Kim K, Weiss L (2004) Toxoplasma: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 34, 423 - 432.
- Lehmann T, Marcet P, Graham D, Dahl E, Dubey J (2006) Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 11423.
- López Castillo C, Díaz Ramírez J, Gómez Marín J (2005) Factores de riesgo en mujeres embarazadas, infectadas por *Toxoplasma gondii* en Armenia-Colombia. *Rev. salud pública* 7.
- Lora F, Aricapa H, Pérez J, et al. (2007) Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. *Infection* 11, 117-123.
- Marín JEG (2007) Guía de práctica clínica para toxoplasmosis durante el embarazo y toxoplasmosis congénita en Colombia. *Infectio* 11, 129-141.
- Martín-Hernández I, García-Izquierdo S (2003) Toxoplasmosis: infección oportunista en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Rev Biomed* 14, 101-111.
- Méndeza D, Lealb E, Perdigón L, Yamartec P (2009) Artículo original Seroprevalencia de la toxoplasmosis en mujeres que asistieron al Hospital "Dr. Rafael Gallardo". Coro, estado Falcón. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29, 49-51.

- Montenegro M, Y, Ramírez Castro J, Isaza J L, Bedoya B G, Muñetón Peña C (2006) Microsatellite instability among patients with colorectal cancer. *Revista médica de Chile* 134, 1221-1229.
- Montoya J, Liesenfeld O (2004) Toxoplasmosis. *The Lancet* 363, 1965-1976.
- Montoya MT (2002) Programa de Diagnóstico de Toxoplasmosis Materna en Armenia. *Rev. Salud Pública* 4, Sup 2-23-28.
- Montoya MT, Gómez JE, Castaño JC, *et al.* (1996) Avances diagnósticos en toxoplasmosis. PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas. *Acta méd. colomb* 21, 127.
- Morales DA, Chaguendo JE, M P, *et al.* (2009) Prevalencia de *Toxoplasma gondii* y sus factores de riesgo en 14 municipios del Departamento del Cauca (Colombia).
- Mullis K, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155, 335.
- Okay T, Yamamoto L, Oliveira L, *et al.* (2009) Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics* 64, 171-176.
- Pino L, Salinas J, López M (2009) Description of an epidemic outbreak of acute toxoplasmosis in immunocompetent patients from Colombian Armed Forces during jungle operations. *Infectio* 13, 83-91.
- Ponce NC, Gómez JE (2003) 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* 7, 8-14.

- Ramos JA (2009) Toxoplasmosis: Una vision durante el embarazo. El portal de la Salud.
- Rieger T, da Costa Campos S, dos Santos J (2006) A biologia molecular como ferramenta no estudo da biodiversidade.
- Rosso F, Agudelo A, Isaza Á, Montoya J (2007) Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colombia Médica* 38, 316-337.
- Rosso F, Les J, Agudelo A, *et al.* (2008) Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 504.
- Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K (1994) Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2813-2819.
- Sánchez D, Ramírez L (2006) Plataformas de Proteómica.
- Schenone H, Contreras M, Salinas P, *et al.* (1986) Epidemiology of toxoplasmosis in Chile. I. Prevalence of the human infection, studied by means of an indirect hemagglutination test, In the first three regions. 1982-1985. *Boletín Chileno de Parasitología* 41, 36-39.
- Serrano N, Humana M, Cárdenas M, Serrano N (1999) Estado Actual del Diagnóstico de la Toxoplasmosis en la Mujer Embarazada y su Feto. *MedUNAB* 2.
- Sibley D, Boothroyd J (1992) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 5, 359 - 382.

- Sousa O, Saenz R, Frenkel J (1988) Toxoplasmosis in Panama: a 10-year study. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 38, 315.
- Suárez O, Parra A, Fernández M (2009) Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en una Comunidad Marginal del Municipio Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. *Investigación Clínica* 42.
- Thulliez P (1998) Memorias Segundo Congreso Internacional de Toxoplasmosis. *Santafé de Bogotá*, 33-36.
- Torres JJ (2007) *Prevalencia de infección por Toxoplasma gondii en mujeres embarazadas, en Valledupar, Cesar año 2007* Trabajo de Grado, Universidad del Magdalena en convenio con La Universidad Nacional de Colombia.
- Varela I, Loyola C, Borges A, Clara P (2009) Comportamiento de la infección toxoplásmica. *Toxoplasmosis infection. Medisur* 7.
- Vásquez. LR, Velasco O, Parra J, *et al.* (2003) Prevalencia de toxoplasmosis porcina en diez mataderos municipales del departamento del Cauca. *Biomédica* 23 (suplemento 1), 106.
- Vaz A, Guerra E, Ferratto L, Toledo L, Azevedo Neto R (1990) Positive sorology of syphilis, toxoplasmosis and Chagas' disease in pregnant women on their first visit to State Health Centes in a metropolitan area, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 24, 373-379.
- Velasco O, Salvatierra B, Valdespino J, *et al.* (1992) Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. *Salud Pública* 34, 222-229.
- Velmurugan GV, Dubey JP, Su C (2008) Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Veterinary Parasitology* 155, 314-318.

Vidigal P, Santos D, Castro F, *et al.* (2002) Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35, 1-6.

Zambrano Y, Chiarello A, Soca A, *et al.* (2006) Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de infecciones del Sistema Nervioso Central. *Invest. clín* 47, 337-347.

Zuluaga C, Sierra M, Asprilla E (2005) Causas de ceguera infantil en Cali, Colombia. *Colombia Médica* 36.

ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN a partir de sangre total mediante el método de Fenol Cloroformo.

En frascos ámbar estériles se prepara.

Lisis Rojos

Cloroformo Isoamílico: 24 partes Cloroformos 1 Parte de Alcohol Isoamílico

40 mL Tris HCL → 1M → pH 8.0	2mL NaCl → 5M
5mL MgCl ₂ → 1M	Ajustar a 500mL

FENOL → Líquido + Buffer de 10,5 → pH (7,2 a 7,8)
Buffer comercial de 10,5

Lisis Blancos

10mL Tris HCL → 1M → pH 8.0	2mL NaCl → 5M
20mL EDTA → 0,5 M → pH 8.0	Ajustar a 500mL

Si se parte de 1mL de Sangre

1. En un tubo falcon de 15 mL agregar 1mL de sangre y 2mL de **solución de lisis rojos**, mezclando cuidadosamente.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 5
3. minutos.
4. Centrifugar a 3500 rpm durante 7 minutos.
5. Descartar el sobrenadante cuidando el pellet.
6. Adicionar **3 mL de solución de lisis rojos**.
7. Centrifugar a 3500 rpm durante 7 minutos. Descartar sobrenadante.
8. Repetir los pasos 5, 6 y 7 (**MÁXIMO 3 LAVADOS**).
9. Adicionar al pellet **1mL de solución de lisis Blancos** y 6 µl de proteinasa K.
10. Dar vortex suavemente.
11. Adicionar **100 µl de SDS al 10%**.

12. Incubar toda la noche a 56°C, teniendo en cuidado cada 3 o 4 horas de deshacer el pellet (mínimo 6 horas).
13. Adicionar **Fenol frío a 4°C y pH de 7,2 hasta 2 mL y ajustar a pH de 7,8 con HCL** (si es necesario) y mezclar cuidadosamente durante 5 minutos para precipitar proteínas.
14. Centrifugar a 3500 rpm durante 7 minutos.
15. Trasvasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
16. Adicionar al sobrenadante **500µL de fenol cloroformo y 500µL de cloroformo isoamílico frío a -20°C**. Mezclar cuidadosamente durante 5 minutos para precipitar proteínas.
17. Centrifugar a 3500 rpm durante 7 minutos.
18. Pasar sobrenadante a tubo nuevo.
19. Adicionar 3 volúmenes de cloroformo isoamílico, mezclar cuidadosamente durante 5 minutos para precipitar proteínas → **se debe observar una solución lechosa**.
20. Centrifugar a 3500 rpm durante 7 minutos. Conservar el sobrenadante.
21. Adicionar 3 volúmenes de Etanol frío al 100%.
22. Centrifugar a 3500 rpm durante 7 minutos, descartar el sobrenadante.
23. Adicionar 3 volúmenes de etanol al 70% y Centrifugar a 3500 rpm durante 7 minutos.
24. Dejar evaporar el etanol a 37°C.
25. Adicionar de 300µl de TE y almacenar el ADN a 4°C.

Anexo 2. Formato de estandarización de PCR para la primera reacción de amplificación del gen B1 específico de *T. gondii*.

FECHA: ___/___/20__	NOMBRE: Manuel Benachi	Protocolo: <u>Toxo B1</u>
---------------------	------------------------	---------------------------

PCR

ESTANDARIZACIÓN DE PCR

Numero de Muestras: <u>1</u>	MasterMix: <u>1</u>
------------------------------	---------------------

Toxoplasmosis

	Condiciones Normal		Condición 1		Condición 2		Condición 3		Condición 4	
	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total
H ₂ O	8		8		8					
dNTPs 2nM mix	2,5		2,5		2,5					
Primer	2,5		2,5		2,5					
Primer	2,5		2,5		2,5					
Buffer	2,5		2,5		2,5					
MgCl ₂	3,0		3,5		2,5					
Taq 1u/ul	0,3		0,3		0,3					
DNA	2		2		2					
Volumen Total	23,3		23,3		23,3					

Condiciones del PCR
Condiciones de PCR

Cambio de

Temp	Tiempo	Ciclos
94°C	5'	1
94°C	1'	40
53°C	50''	
72°C	1'	
72°C	10'	1
4°C	α	---

ENTRÓ
SALIÓ

1. Condiciones normales de amplificación
2. Se agrega 0,5µL de MgCl₂ _____
3. Se disminuye 0,5µL de MgCl₂ _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____

	DNA	Loadin g Dye
MW	3	3
Muestra	5	3

ELECTROFORESIS PCR:

Gel: ___% Agarosa: _____ TBE: _____ X Voltaje: _____
Tiempo: _____

RESULTADOS

MW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Anexo 3. Formato de estandarización de PCR anidada para el gen B1 específico de *T. gondii*

FECHA: __/__/20__	NOMBRE: Manuel Benachi.	Protocolo: <u>Toxo B1 anidada</u>
-------------------	-------------------------	-----------------------------------

PCR

**ESTANDARIZACIÓN DE PCR
Toxoplasmosis**

Numero de Muestras: <u>1</u>	MasterMix: <u>1</u>
------------------------------	---------------------

	Condiciones Normal		Condición 1		Condición 2		Condición 3		Condición 4	
	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total	Volumen por tubo	Volumen total
H ₂ O	8									
dNTPs 2nM mix	2,5									
Primer	2,5									
Primer	2,5									
Buffer	2,5									
MgCl ₂	3,0									
Taq 1u/ul	0,3									
Producto Amplificado	2									
Volumen Total	23,3									

**Condiciones del PCR
Condiciones de PCR**

Temp	Tiempo	Ciclos
94°C	5'	1
94°C	1'	14
53°C	30''	
72°C	30''	1
72°C	10'	
4°C	α	---

ENTRÓ
SALIÓ

	DNA	Loading Dye
MW	3	3
Muestra	5	3

Cambio de

1.	_____
2.	_____
3.	_____
4.	_____
5.	_____
6.	_____
7.	_____
8.	_____
9.	_____
10.	_____

ELECTROFORESIS PCR:

Gel: 2 % Agarosa: SeaKem TBE: 0,5 X Voltaje: 130
Tiempo: 25'

RESULTADOS

MW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Anexo 4. Instrumento de colección de datos

PROCEDENCIA DE LA PACIENTE: _____

CC O TI O RC _____

FECHA DE ENTREVISTA _____
DIA MES AÑO

NOMBRE DEL HOSPITAL _____

MUNICIPIO _____

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

EDAD _____ en años

ESTADO CIVIL: SOLTERA _____ UNION LIBRE _____
CASADA _____ DIV. _____

OCUPACIÓN: _____

NUMERO DE HISTORIA CLINICA (si no tiene documento) _____

ENTIDAD DE AFILIACION/EPS/ARS _____

NOMBRE DEL ACUDIENTE RESPONSABLE _____

DIRECCION DE LA RESIDENCIA: _____

TELEFONO: _____

NUMERO DE HABITANTES DEL HOGAR: _____

NUMERO DE HABITACIONES DEL HOGAR: _____

ESCOLARIDAD:

NINGUNA _____

PRIMARIA INCOMPLETA _____

PRIMARIA COMPLETA _____

SECUNDARIA INCOMPLETA _____

SECUNDARIA COMPLETA _____

UNIVERSITARIA _____

13. No. DE EMBARAZOS CON EL PRESENTE ____ ABORTOS____
OBITOS____
14. HIJOS PREMATUROS (<37 SEM) SI____ NO____ CUANTOS____
15. HIJOS CON HIDROCEFALIA SI____ NO____ CUANTOS____
16. HIJOS CON CEGUERA (CORIORETINITIS) SI____NO____CUANTOS____
17. CONTROLES PRENATALES: SI____ NO____ CUANTOS____
18. EDAD GESTACIONAL____
19. EL AGUA QUE UTILIZA EN SU CASA PARA BEBER PROVIENE DE :
- ACUEDUCTO____ QUEBRADA____ ALJIBE____
20. EL AGUA QUE UTILIZA PARA BEBER ES:
- HERVIDA____ SIN HERVIR____
21. SE LAVA LAS MANOS ANTES DE CADA COMIDA:
- SI____ NO____
22. SE LAVA LAS MANOS ANTES DE PREPARAR ALIMENTOS
- SI____ NO____
23. CONSUME CARNE EN EL MES

SI _____ NO _____

24. CONSUME CARNE DE CERDO EN EL MES

SI _____ NO _____

25. HA TENIDO O TIENE GATOS EN SU CASA

SI _____ NO _____

26. HA REALIZADO O REALIZA LABORES DE AGRICULTURA O SIEMBRA EN SU CASA

SI _____ NO _____

27. QUE ANIMALES CONVIVEN EN SU CASA: _____

28. RESULTADO DE LA SERO TIPIFICACION

IgM POSITIVA _____ IgG POSITIVA _____

IgM NEGATIVA _____ IgG NEGATIVA _____

Tipo de Toxoplasma _____

29. TEST DE AVIDEZ

AVIDEZ LEVE _____ AVIDEZ MODERADA _____ AVIDEZ FUERTE _____