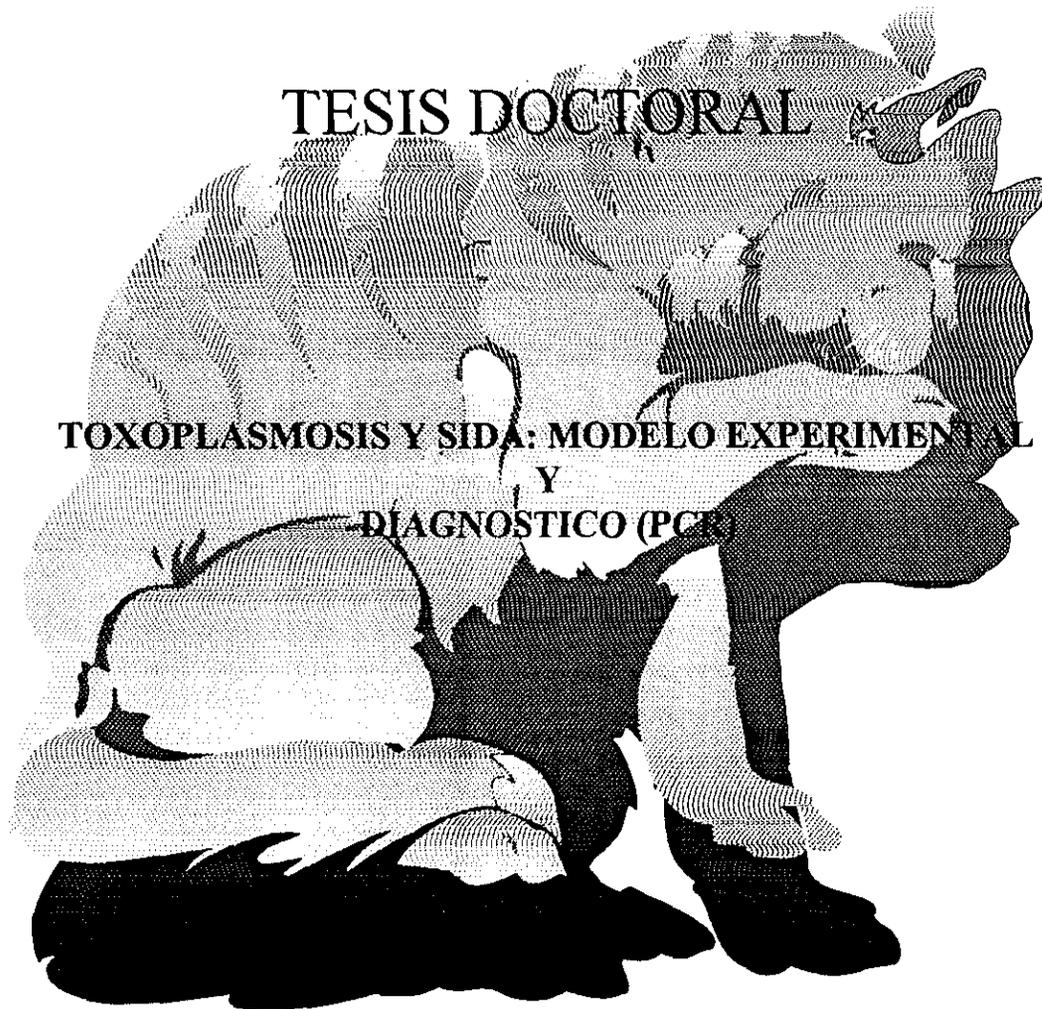


Universidad Complutense

Facultad de Farmacia



Memoria que para optar a la colación
del grado de doctor, presenta el
Licenciado en Farmacia
Don Juan Carlos Rodriguez Diaz

Antonio R. Martínez Fernández, Catedrático, Director del Departamento de Parasitología de la Universidad Complutense,

CERTIFICA

Que la memoria de tesis doctoral titulada "*Toxoplasmosis y SIDA: Modelo experimental y diagnóstico (PCR)*" que presenta el Licenciado en Farmacia **Juan Carlos Rodríguez Díaz**, ha sido realizada en el Departamento de Parasitología, bajo la codirección mía y de la Dra. María Mercedes Martínez Grueiro.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid



FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE PARASITOLOGIA

A mi familia y a mis amigos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mostrar mi más profundo agradecimiento al D. Antonio y a Mercedes por el apoyo, la comprensión y la ayuda que he recibido de ambos durante todo el tiempo que ha durado este trabajo.

También quiero agradecer el apoyo recibido por mis jefes del Servicio de Microbiología de la Clínica Puerta de Hierro, Diego Dámaso, Rosa Daza, Paqui Portero y especialmente Pilar Mendaza que además de enseñarme la mayoría de las cosas que sé, me enseñaron una forma de trabajar. Quiero recordar a mis compañeros residentes, especialmente a Rocío Martínez, que ha sido mi residente mayor y me ha enseñado muchas cosas. También recuerdo en este momento al resto de los que trabajábamos en el laboratorio, que no nombro para no olvidarme de nadie, que hicieron que en mi primer trabajo me sintiera como en casa.

También quiero agradecer el apoyo recibido por todos los profesores del Departamento de Parasitología de la Facultad por lo mucho que me han ayudado, José Luis Guillén y Carmen Cuéllar con la serología, José Antonio y Alicia con la extracciones de sangre y Zapatero con mis problemas parasitológicos. También agradezco los buenos ratos pasados con mis compañeros de fatigas, Rafa, Paco, Mar, Begoña y Ester.

También quiero mostrar mi agradecimiento a mis compañeros del Hospital General Universitario de Elche, Matilde Elfa por su compañerismo y Gloria Royo por el apoyo incondicional que me ha prestado y por su afán investigador, que han hecho que mi estancia en Elche sea muy positiva. También quiero recordar a las residentes, especialmente a Encarna, con la que tanto he discutido de biología molecular (y de otras cosas).

Quiero agradecer el apoyo y la comprensión de todos los demás compañeros que trabajamos en el laboratorio del Hospital General Universitario de Elche, pero muy especialmente a dos personas sin las que no podría haber realizado este trabajo, Rosa Ferrer y Fini García, que me han ayudado en todo momento en la obtención, archivo y ordenamiento de los sueros y líquidos cefalorraquídeos y que han puesto grandes dosis de orden para combatir el "pequeño desorden de la ventana".

También agradezco a Miguel Pérez del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Elche su colaboración, no solo científica sino también en hacerme la vida en Elche más agradable.

Por último, aunque probablemente sea lo más importante, quiero acordarme de mis amigos y de mi familia, que han estado conmigo en los momentos buenos y malos y han hecho que sea como soy.

INDICE

1.-INTRODUCCION.....	1
2.- OBJETIVOS.....	11
3.- REVISION BIBLIOGRAFICA.....	15
3.1.-Generalidades.....	16
3.2.- Características clínicas de la toxoplasmosis.....	21
3.3.- Modelos experimentales en toxoplasmosis.....	28
3.4.- Métodos diagnósticos basados en la detección de antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	31
3.5.- Métodos diagnósticos basados en el estudio de anticuerpos frente a <i>Toxoplasma gondii</i>	37
3.6.- Métodos diagnósticos basados en la detección de ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
3.7.- Quimioterapia.....	47
4.- MATERIAL Y METODOS.....	59
4.1.- Aislamiento y mantenimiento de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	60
4.1.1.- Aislamiento y mantenimiento de cepas cistógenas.....	60
4.1.1.1.- Aislamiento de cepas cistógenas de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de cerebro de gato.....	60
4.1.1.2.- Mantenimiento de cepas cistógenas..	61
4.1.2.- Mantenimiento de la cepa RH.....	61
4.1.2.1.- Proceso de descongelación.....	61
4.1.2.2.- Mantenimiento de la cepa.....	61
4.1.2.3.- Congelación de la cepa.....	62
4.2.- Establecimiento de modelos de toxoplasmosis experimental.....	62
4.2.1.- Patrón de referencia	62
4.2.1.1.- Primoinfección por <i>Toxoplasma gondii</i>	62
4.2.1.2.- Infección crónica.....	62

4.2.1.3.- Infección crónica reactivada.....	63
4.2.2.- Modelo de primoinfección por <i>Toxoplasma gondii</i> con síntomas clínicos en sujeto inmunocompetente.....	63
4.2.3.- Modelo de infección crónica asintomática por <i>Toxoplasma gondii</i> en sujeto inmunocompetente.....	63
4.2.4.- Modelo de toxoplasmosis crónica reactivada en sujeto inmunodeprimido.....	64
4.3.- Grupos de pacientes humanos estudiados.....	64
4.3.1.- Patrón de referencia	64
4.3.2.- Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos Ig G pero sin Ig M frente a <i>Toxoplasma gondii</i>	65
4.3.3.- Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a <i>Toxoplasma gondii</i>	65
4.3.4.- Pacientes inmunodeprimidos con afectación del sistema nervioso central por causas distintas a encefalitis toxoplásmica.....	65
4.3.5.- Pacientes inmunodeprimidos con lesiones cerebrales producidas por encefalitis toxoplásmica.....	66
4.3.5.1.- Con tratamiento específico previo..	66
4.3.5.2.- Sin tratamiento específico previo..	66
4.4.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de antígenos circulantes.....	66
4.4.1.- Estandarización de las técnicas.....	66
4.4.1.1.- Purificación de los antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	66
4.4.1.2.- Inoculación de los animales de experimentación y obtención de los sueros hiperinmunes.....	67
4.4.1.3.- Purificación de los anticuerpos hiperinmunes.....	67
4.4.1.4.- Optimización de los métodos de ELISA.....	68
4.4.2.- Diseño del método de ELISA para la detección de antígenos circulantes.....	69
4.4.2.1.- Detección de antígenos circulantes	

en suero de ratón.....	69
4.4.2.2.- Detección de antígenos circulantes en suero humano.....	69
4.4.2.3.- Detección de antígenos circulantes en líquido cefalorraquídeo humano.....	70
4.5.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de anticuerpos.....	71
4.5.1.- Detección de anticuerpos tipo Ig G.....	71
4.5.1.1.- En ratones.....	71
4.5.1.2.- En humanos.....	71
4.5.1.2.1.- Método de ELISA.....	71
4.5.1.2.2.- Microaglutinación.....	72
4.5.2.- Detección de anticuerpos tipo Ig M.....	72
4.5.2.1.- En ratones.....	72
4.5.2.2.- En humanos.....	73
4.5.3.- Detección de anticuerpos tipo Ig A.....	73
4.5.3.1.- En ratones.....	73
4.5.3.2.- En humanos.....	74
4.6.- Estudio de la avidéz de la Ig G.....	75
4.6.1.- Estudio de la avidéz de Ig G en ratones...	75
4.6.2.- Estudio de la avidéz de Ig G en humanos...	76
4.6.3.- Interpretación de resultados.....	76
4.7.- Detección del ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	78
4.7.1.- Optimización de los procedimientos de extracción del ADN.....	78
4.7.1.1.- En muestras de sangre periférica Alternativas probadas.....	78
4.7.1.1.1.- Proteinasa K, lisis alcalina y extracción fenol/cloroformo.....	78
4.7.1.1.2.- Proteínasa K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean.....	78
4.7.1.1.3.- Proteinasa K y lisis alcalina.....	79
4.7.1.1.4.- EDTA y hervir.....	79
4.7.1.1.5.- PBS y hervir.....	80
4.7.1.1.6.- Separación de leucocitos	

con ISOLYMPH, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/ cloroformo.....	80
4.7.1.1.7.- Separación de leucocitos con ISOLYMPH,proteinasas K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean....	81
4.7.1.1.8.- Separación de leucocitos con Histopaque, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.....	82
4.7.1.1.9.- Separación de leucocitos con Histopaque, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean.....	83
4.7.-1.1.10.- Wizard Genomic DNA PurificationKit.....	84
4.7.1.2.- En muestras de líquido cefalorraquídeo. Alternativas probadas.....	85
4.7.1.2.1.- Hervir.....	85
4.7.1.2.2.- Proteinasas K y hervir.....	85
4.7.1.2.3.- Proteinasas K, hervir y extracción con fenol/cloroformo.....	85
4.7.2.- Optimización de la reacción de amplificación.....	86
4.7.2.1.- Concentraciones de los distintos componentes la reacción de PCR.....	86
4.7.2.2.- Número y tiempo de los ciclos.....	86
4.7.3.- Optimización del sistema de revelado con sonda no isotópica.....	86
4.7.4.- Medidas para prevenir la contaminación de la técnica.....	88
4.8.- Quimioterapia.....	88
4.8.1.- Antibióticos empleados.....	88
4.8.2.- Establecimiento del modelo experimental...	89
4.8.3.- Desarrollo de las pruebas.....	89
5.- RESULTADOS	90
5.1.- Aislamiento y mantenimiento de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	91
5.2.- Establecimiento de modelos de toxoplasmosis	

experimental.....	91
5.2.1.- Modelo de primoinfección por <i>Toxoplasma gondii</i>	91
5.2.2.- Modelo de infección crónica por <i>Toxoplasma gondii</i> en sujeto inmunocompetente (ratón).....	91
5.2.3.- Modelo de infección crónica reactivada en sujeto inmunodeprimido (ratón).....	92
5.3.- Grupo de pacientes humanos estudiados.....	92
5.3.1.- Pacientes inmunocompetentes.....	92
5.3.2.- Pacientes inmunodeprimidos.....	92
5.4.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de antígenos circulantes.....	93
5.4.1.- Estandarización de las técnicas.....	93
5.4.1.1.- Determinación de la cantidad óptima de anticuerpos hiperinmunes.....	93
5.4.1.2.- Dilución óptima de los anticuerpos conjugados con peroxidasa.....	94
5.4.1.3.- Cálculo del límite de detección de la técnica.....	95
5.4.1.4.- Valor umbral y reproductibilidad... ..	95
5.4.2.- Detección de antígenos circulantes en suero de ratón.....	95
5.4.2.1.- Ratones inoculados con la cepa RH..	96
5.4.2.2.- Ratones inoculados con la cepa 868.	96
5.4.2.3.- Ratones con infección crónica reactivada.....	96
5.4.2.4.- Ratones sanos.....	97
5.4.3.- Detección de antígenos circulantes en sueros de pacientes humanos.....	97
5.4.4.- Detección de antígenos circulantes en líquidos cefalorraquídeos de pacientes humanos.....	98
5.5.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de anticuerpos.....	99
5.5.1.- Estandarización de las técnicas.....	99
5.5.1.1.- Determinación de la cantidad de taquizoitos necesaria para tapizar la placa..	99

5.5.1.2.- Valor umbral de los métodos de ELISA para la detección de anticuerpos en ratones..	99
5.5.1.3.- Valor umbral de los métodos de ELISA para la detección de anticuerpos en pacientes humanos.....	99
5.5.2.- Estudio de la Ig G.....	100
5.5.2.1.- En ratones.....	100
5.5.2.1.1.- Ratones inoculados con la cepa RH.....	100
5.5.2.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868.....	100
5.5.2.1.3.- Ratones con infección crónica reactivada.....	101
5.5.2.1.4.- Ratones sanos.....	101
5.5.2.2.- En pacientes humanos.....	101
5.5.3.- Estudio de Ig M.....	102
5.5.3.1.- En ratones.....	102
5.5.3.1.1.- Ratones inoculados con la cepa RH.....	102
5.5.3.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868.....	103
5.5.3.1.3.- Ratones con infección crónica reactivada.....	103
5.5.3.1.4.- Ratones sanos.....	103
5.5.3.2.- En pacientes humanos.....	103
5.5.4.- Detección de Ig A.....	104
5.5.4.1.- En ratones.....	104
5.5.4.1.1.- Ratones inoculados con la cepa RH.....	104
5.5.4.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868.....	105
5.5.4.1.3.- Ratones con infección crónica reactivada.....	105
5.5.4.1.4.- Ratones sanos.....	105
5.5.4.2.- En pacientes humanos.....	106
5.6.- Estudio de la avidéz de Ig G.....	106
5.6.1.- En ratones.....	106

5.6.1.1.- Ratones inoculados con la cepa RH.	106
5.6.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868.....	107
5.6.1.3.- Ratones con infección crónica reactivada.....	107
5.6.2.- En pacientes humanos.....	107
5.7.- Detección del ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	108
5.7.1.- Optimización de los procesos de extracción.....	108
5.7.1.1.- En muestras de sangre periférica..	108
5.7.1.2.- En muestras de líquido cefalorraquídeos.....	110
5.7.1.3.- Determinación del límite de detección.....	111
5.7.2.- Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en sangre periférica obtenida de modelos animales.....	111
5.7.2.1.- Ratones inoculados con la cepa RH.	112
5.7.2.2.- Ratones inoculados con la cepa 868.....	112
5.7.2.3.- Ratones con infección crónica reactivada.....	113
5.7.3.- Aplicación de la PCR a muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes seleccionados.....	113
5.8.- Quimioterapia.....	115
5.8.1.- Macrólidos.....	115
5.8.2.- Clindamicina.....	116
5.8.3.- Minociclina.....	117
5.8.4.- Quinolonas.....	118
6.- DISCUSION	120
6.1.- General.....	121
6.2.- Sobre el modelo experimental.....	122
6.3.- Sobre la detección de antígenos circulantes y en el líquido cefalorraquídeo.....	125
6.4.- Sobre el uso en el diagnóstico de la determinación de la clase de inmunoglobulina (Ig G,	

Ig M, Ig A).....	131
6.5.- Sobre la utilidad en el diagnóstico de la avidez de la Ig G.....	134
6.6.- Sobre el diagnóstico mediante PCR.....	146
6.7.- Sobre la quimioterapia.....	141
7.- RESUMEN	145
8.- CONCLUSIONES	150
9.- BIBLIOGRAFIA	153
10.- FOTOGRAFIAS	177

1.- INTRODUCCION

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria que afecta a muchos millones de personas en el mundo, aunque en la mayoría de los casos de forma asintomática; es producida por un protozoo, llamado *Toxoplasma gondii* que utiliza como hospedador definitivo el gato, donde se multiplica sexualmente en el epitelio de su intestino y como hospedadores intermediarios muchos mamíferos, gato y hombre incluidos y aves.

El gato y otros félidos son los hospedadores definitivos, en su intestino -enterocitos- , se produce la multiplicación asexual múltiple por gemación -esquizogonias- , formándose al final macrogametocitos y microgametocitos que darán macrogametos y microgametos. la fecundación de los primeros por los segundos produce los ooquistes que salen al exterior. El proceso es rápido cuando la infección del gato se produce por quistes con bradizoitos o por agrupamientos con taquizoitos (3-6 días). Es lento cuando la infección del gato se produce por ooquistes esporulados, con esporozoitos infectantes (más de 20 días posinfección). El gato es asimismo hospedador intermediario del parásito, con formación de agrupamientos con taquizoitos prácticamente en cualquier célula, y quistes con bradizoitos en células nerviosas, musculares, etc.

Los ooquistes esporulados son infectantes para los hospedadores intermediarios. Los esporozoitos infectantes, pasan desde el intestino a las células viscerales (macrófagos, células endoteliales, etc) comenzando multiplicaciones asexuales rápidas por endodiogenia -gemación simple interna-, dando lugar a agrupamientos de taquizoitos (A/T). Se rompen las células albergantes y los taquizoitos invaden nuevas células. Este proceso coincide con la fase aguda de la infección. El programa genético de la variedad de *Toxoplasma gondii*, y la defensa inmunitaria del hospedador producen el

cambio de los últimos taquizoitos que, penetrando en áreas y células inmunológicamente más tranquilas, se transforman en quistes tisulares, dividiéndose lentamente por endopoligenia, produciendo bradizoitos infectantes para otro hospedador intermediario que los ingiera y para el hospedador definitivo. Los bradizoitos ingeridos se comportan como los esporozoitos. De aquí la eficacia del ciclo mantenido por carnivorismo. En ausencia de una respuesta TH1 eficaz, los bradizoitos de una infección crónica, liberados por la muerte de la célula albergante, se transforman en taquizoitos que reanudan la fase inicial del ciclo. Los taquizoitos por vía parenteral - infecciones accidentales y transplacentarias (infección congénita) - reproducen el mismo tipo de ciclo.

El hombre es uno de los hospedadores intermediarios. La fuente principal de la infección humana es la ingestión de carne parasitada (quistes con bradizoitos) procedente de animales de abasto, insuficientemente tratada por el calor. Además de con ooquistes, ocurren otras modalidades de infección: la congénita, la ocasionada por trasplantes infectados y las recrudescencias de infecciones crónicas por inmunosupresión farmacológica o infecciosa.

FIGURA 1

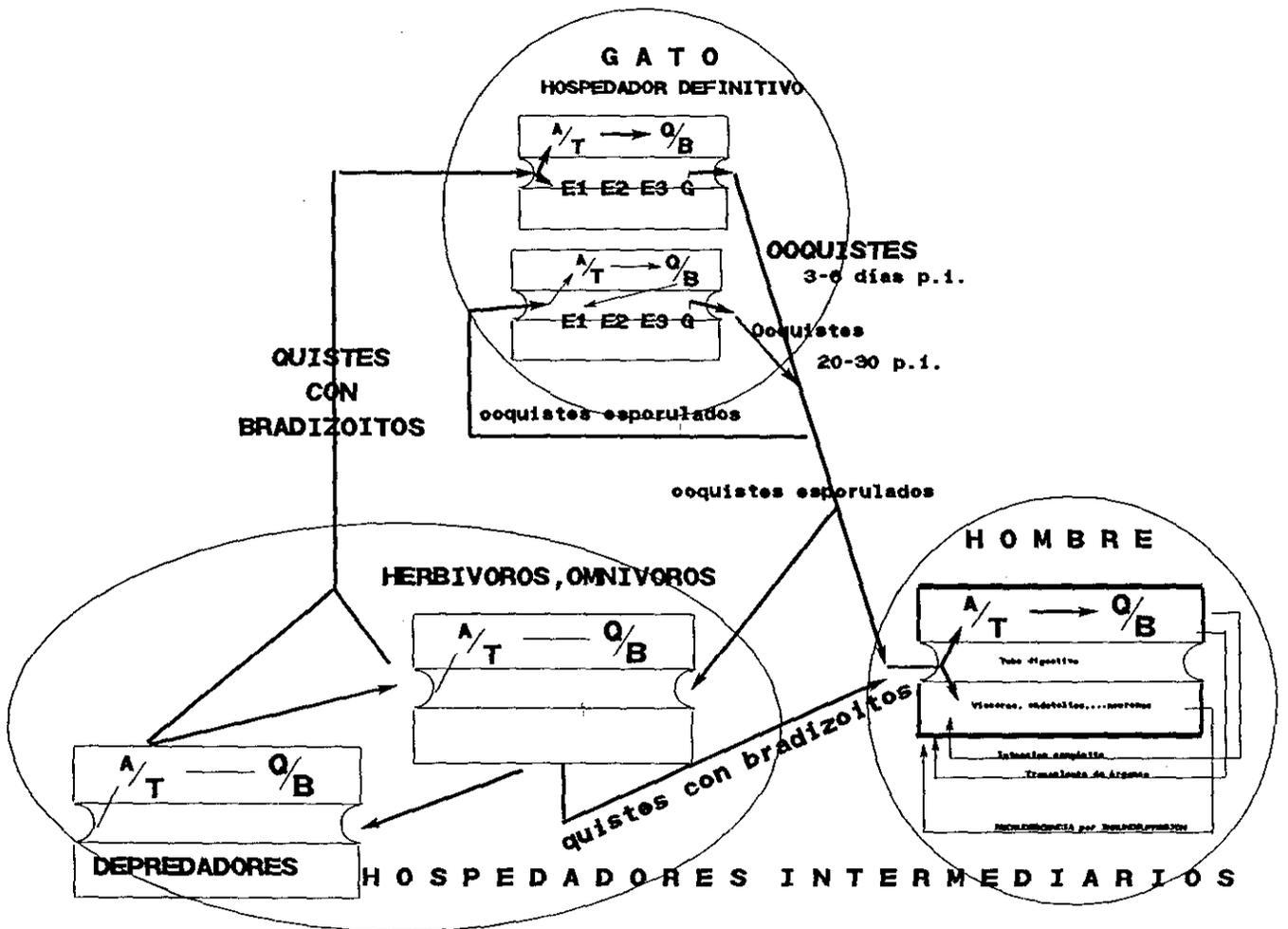


Figura 1. Ciclo epidemiológico y biológico general. A/T agrupamientos con taquizoitos, Q/B quistes con bradizoitos. Los dos círculos y la elipse encierran simbólicamente los tres ámbitos del ciclo, desarrollados en las figuras 2, 3 y 4. Las flechas en las líneas señalan la dirección del ciclo y de la infección.

¹ Martínez-Fernández, A.R. (1995). Comunicación escrita.

FIGURA 2

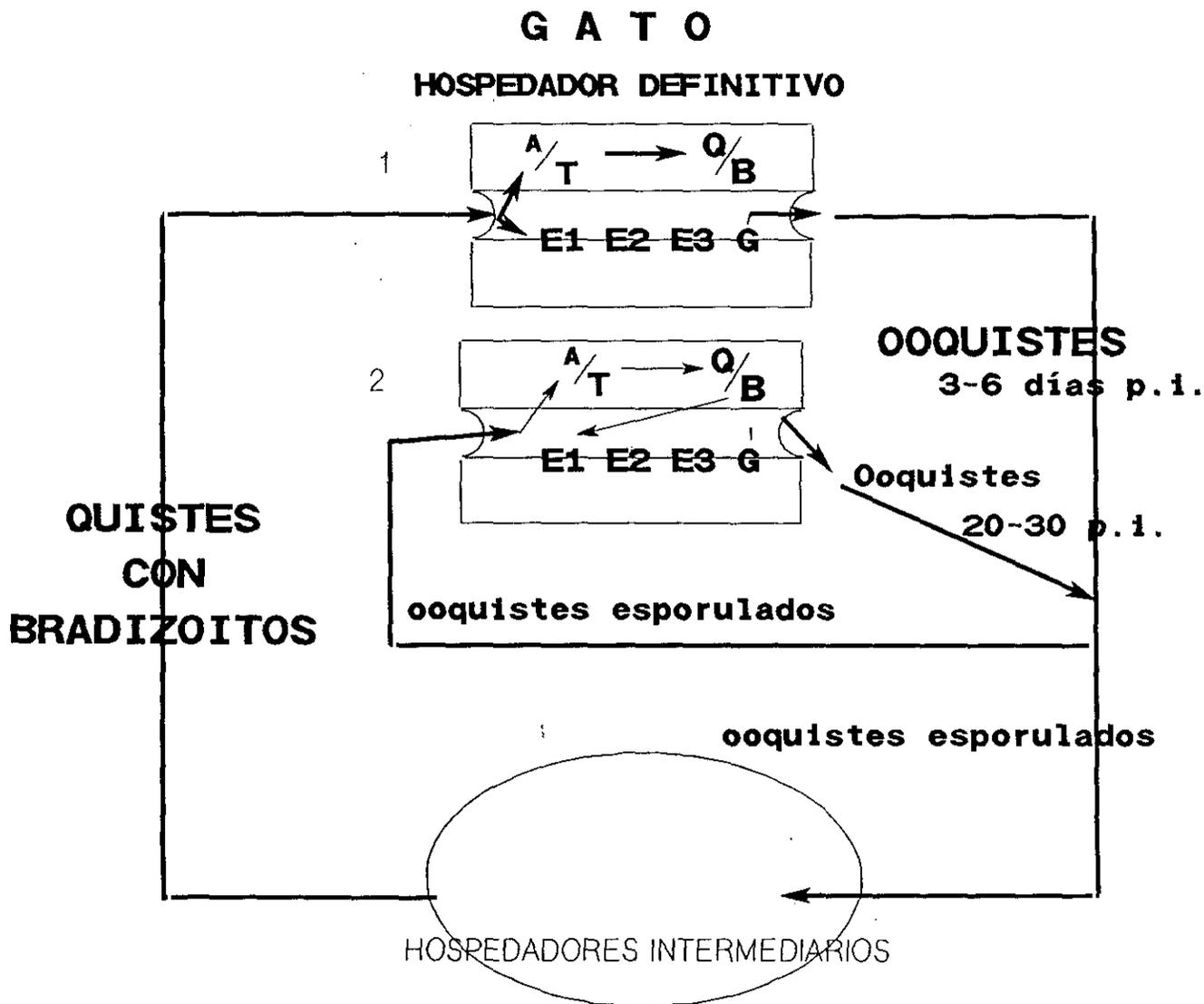


Figura 2. Ciclo biológico en el gato y otros félidos hospedadores definitivos. A/T agrupamientos con taquizoitos, Q/B quistes con bradizoitos. E1 E2 E3 G, esquizogonias intestinales, gamogonia y formación de ooquistes.

1. Representa el ciclo rápido del gato, iniciado por la ingestión de quistes con bradizoitos viables. En el gato así infectado se produce simultáneamente el ciclo visceral (A/T--Q/B) y el entérico sexuado (E1 E2 E3 G). Los ooquistes empiezan a eliminarse muy pronto, 3°-6° día posinfección.

2. Representa el ciclo lento. Se inicia por la infección por ooquistes esporulados. Los esporozoitos inician primero el ciclo visceral. Los bradizoitos vuelven al intestino e inician en los enterocitos de la mucosa el ciclo sexuado. Los ooquistes empiezan a eliminarse 20 a 30 días después de la infección.¹

¹ Martínez-Fernández, A.R. (1995). Comunicación escrita.

FIGURA 3

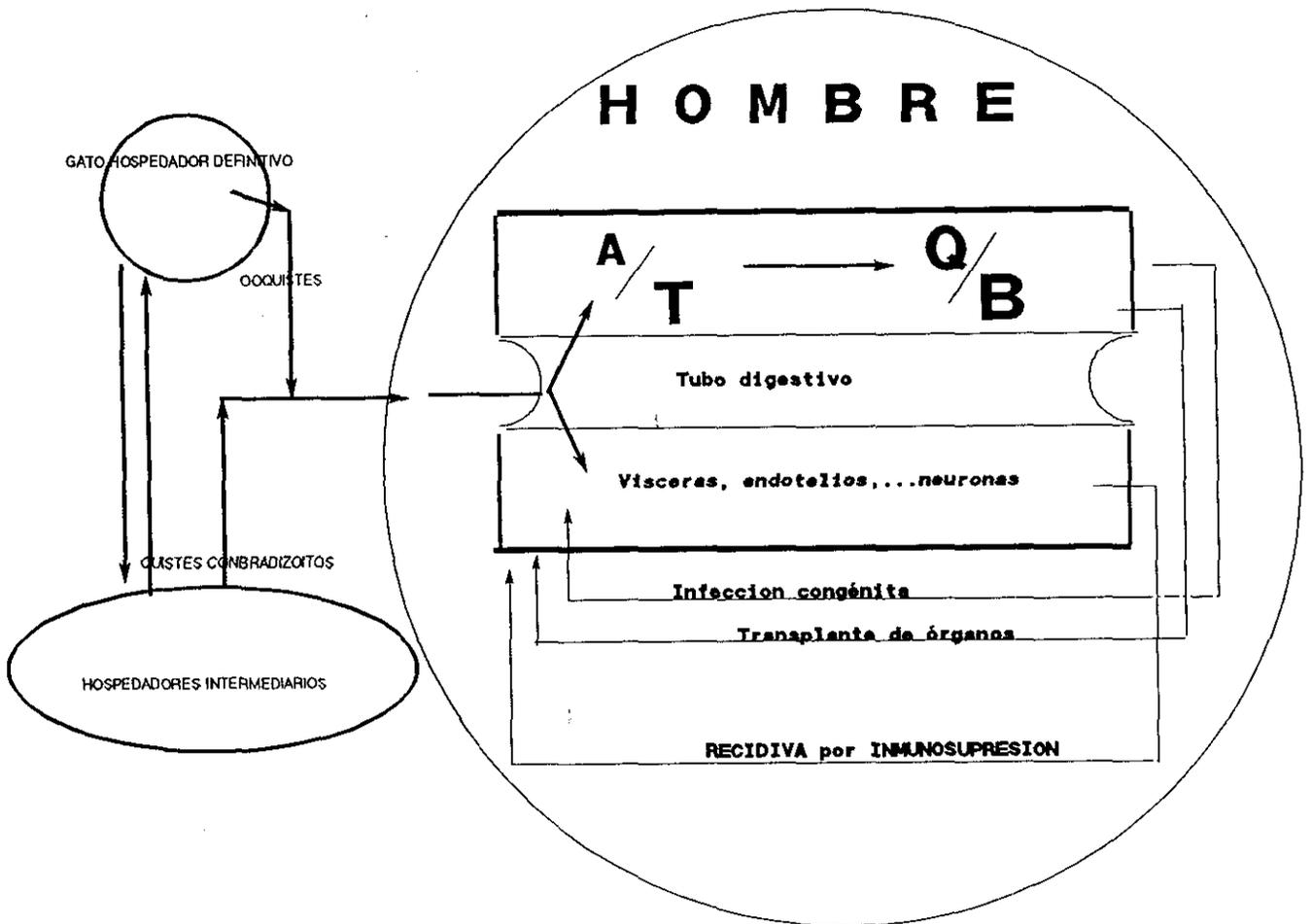


Figura 3. Ciclo biológico en el hombre. A/T agrupamientos con taquizoitos, durante la fase aguda de la enfermedad, Q/B quistes con bradizoitos, fase crónica. El proceso adquirido se inicia tras la ingestión de ooquistes esporulados procedentes de gatos o quistes tisulares con bradizoitos viables, en la carne de animales de abasto. La infección intraespecífica se produce además por otras vías: la transplacentaria en la infección congénita, o mediante trasplantes de órganos o tejidos infectados. También ocurre la infección accidental, entre personal de laboratorio, por inoculación de taquizoitos. La inmunosupresión farmacológica posterior a un trasplante u otros procesos, así como la inmunosupresión infecciosa, transforma una infección crónica, en aguda.¹

¹ Martínez-Fernández A.R. (1995). Comunicación escrita.

FIGURA 4

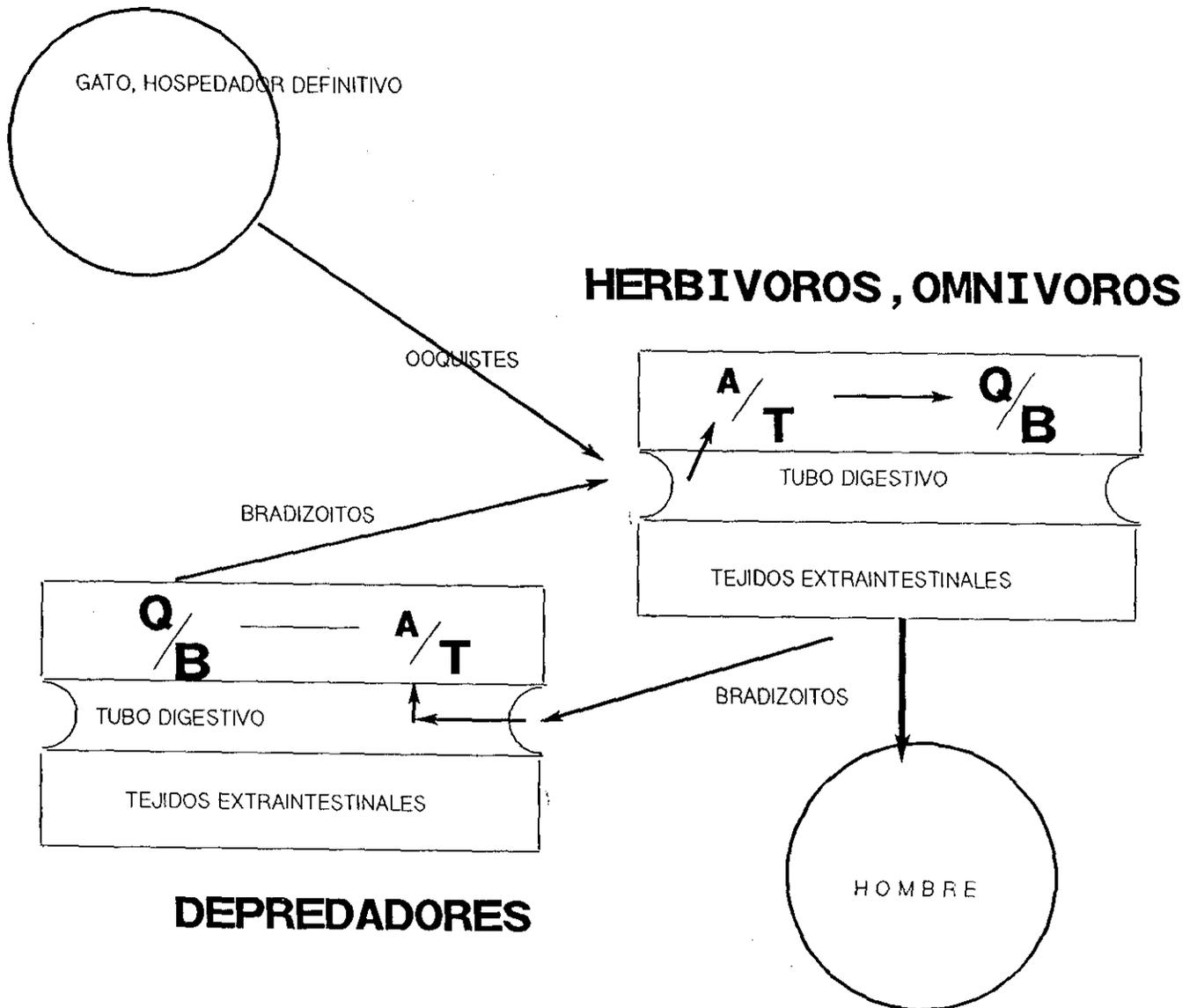


Figura 4. Ciclo biológico en los hospedadores intermediarios. La fuente principal de la infección humana son los herbívoros, ovinos y caprinos principalmente, se infectan por la ingestión de ooquistes. Los omnívoros, el cerdo principalmente, se infecta tanto por ooquistes como por sus tendencias carroñeras. Hospedadores intermediarios muy eficaces para el ciclo a través del gato, como ratones y gorriones, son también ingeridos por los cerdos. Los depredadores, el propio gato incluido, mantienen el ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* por carnivorismo (depredación, canibalismo, carroñerismo). El ciclo entre depredadores puede mantenerse en el tiempo en ausencia de gatos.¹

¹ Martínez-Fernández, A.R. (1995). Comunicación escrita.

Aunque la mayoría de las infecciones que se producen en el hombre son asintomáticas o con escasos síntomas clínicos, hay algunas situaciones en que esto no es así, y la toxoplasmosis aparece como una grave enfermedad que puede afectar a la vida del paciente o puede producir graves secuelas. Estas situaciones son dos, cuando la infección se produce durante el período de gestación de la mujer, ya que se pueden producir muerte o malformaciones fetales y cuando se produce primoinfección o reactivación de una toxoplasmosis antigua en un sujeto inmunodeprimido.

En un sujeto inmunocompetente, trascurrida la fase aguda de la enfermedad, se adquiere un equilibrio entre el parásito y el sistema inmune del hospedador, quedando *Toxoplasma gondii* en forma de quistes tisulares, sobre todo en el músculo esquelético, corazón y sistema nervioso central. Si se producen alteraciones del sistema inmune del hospedador, este equilibrio puede romperse y producirse una reactivación de la toxoplasmosis, estos casos que afectan principalmente a sujetos fuertemente inmunodeprimidos, como los pacientes HIV, producen cuadros clínicos de mucha gravedad, fundamentalmente cuadros de encefalitis. Aunque raramente también pueden producir cuadros de miocarditis, neumonitis, infección diseminada, etc.

El método de diagnóstico más empleado tradicionalmente es la serología, ya que el cultivo del parásito de muestras clínicas es largo y complicado. En sujetos inmunocompetentes, la infección aguda se demuestra por seroconversión en el título de anticuerpos totales frente al parásito y la presencia de Ig M específica. En cambio, debido a la deficiencia del estado inmunológico que presentan los pacientes inmunodeprimidos que sufren reactivación de la toxoplasmosis, estos métodos carecen de valor en este tipo de pacientes, por lo que se está intentando desarrollar métodos

alternativos.

Debido a la dificultad práctica de estudiar en pacientes humanos las distintas formas en que puede aparecer la enfermedad (primoinfección en sujeto inmunocompetente, infección crónica en sujeto inmunocompetente y reactivación de la toxoplasmosis en sujeto inmunodeprimido), se ha recurrido a modelos animales que consigan recrear estas situaciones clínicas. Así se puede establecer una primoinfección aguda sintomática mediante la inoculación por vía peritoneal de taquizoitos en ratones inmunocompetentes; una infección crónica mediante la inoculación de quistes tisulares por vía oral de una cepa cistógena de *Toxoplasma gondii* a ratones inmunocompetentes y una reactivación de la toxoplasmosis mediante un tratamiento inmunosupresor a unos ratones con toxoplasmosis crónica.

La toxoplasmosis ha adquirido una mayor importancia en los últimos años debido al gran incremento de sujetos inmunodeprimidos, por el incremento de los trasplantes de órganos, los tratamientos inmunodepresores y la aparición de la pandemia por el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (HIV); en estos pacientes inmunodeprimidos es donde el cuadro clínico de la toxoplasmosis adquiere mayor gravedad y además es en donde los métodos diagnósticos tradicionales obtienen peores resultados, por lo que el diagnóstico de la toxoplasmosis en pacientes inmunodeprimidos es una de los retos diagnósticos más importantes que tiene planteada la parasitología actual.

El tratamiento clásico de las infecciones humanas por *Toxoplasma gondii* es la combinación de pirimetamina y sulfadiacina y en caso de embarazo se emplea espiramicina, pero estos tratamientos plantean problemas; en pacientes con HIV y encefalitis toxoplásmica se han descrito muchos efectos secundarios adversos producidos por la pirimetamina y la sulfadiacina que en muchos casos

obliga a la interrupción del tratamiento y la espiramicina no se ha mostrado muy efectiva en el tratamiento de infecciones congénitas. Debido a estos problemas se hace necesaria la búsqueda de nuevos fármacos útiles para el tratamiento de esta parasitosis.

El Instituto de Salud de Estados Unidos (INH) ha señalado al estudio del *Toxoplasma gondii* y la toxoplasmosis como una de las líneas mundiales de investigación prioritarias.

2.- OBJETIVOS

- 1° Desarrollo de modelos animales que reproduzcan las distintas situaciones clínicas que podemos encontrar en la toxoplasmosis humana.
- 2° Elección de grupos de pacientes que representen las distintas situaciones clínicas a estudiar:
- 3° Optimizar la detección de Ig G.
- 4° Optimizar la detección de Ig M.
- 5° Optimizar la detección de Ig A.
- 6° Optimizar el estudio de la avidéz de la Ig G.
- 7° Optimizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
 - 7.1. Optimizar los métodos de extracción de ADN.
 - 7.2. Optimizar los métodos de amplificación.
 - 7.3. Optimizar los métodos de detección del amplificado con sonda.
- 8.- Evaluar la utilidad diagnóstica de la Ig G en:
 - 8.1. Modelo animal de primoinfección.
 - 8.2. Modelo animal de infección crónica.
 - 8.3. Modelo animal de infección crónica reactivada.
 - 8.4. Pacientes inmunocompetentes.
 - 8.5. Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.
 - 8.6. Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.
- 9.- Evaluar la utilidad diagnóstica de la Ig M en:
 - 9.1. Modelo animal de primoinfección.
 - 9.2. Modelo animal de infección crónica.
 - 9.3. Modelo animal de infección crónica reactivada.
 - 9.4. Pacientes inmunocompetentes.
 - 9.5. Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.
 - 9.6. Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.

10. Evaluar la utilidad diagnóstica de la Ig A en:
 - 10.1. Modelo animal de primoinfección.
 - 10.2. Modelo animal de infección crónica.
 - 10.3. Modelo animal de infección crónica reactivada.
 - 10.4. Pacientes inmunocompetentes.
 - 10.5. Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.
 - 10.6. Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.
- 11.- Evaluar la utilidad diagnóstica del estudio de la avidéz de los anticuerpos Ig G en:
 - 11.1. Modelo animal de primoinfección.
 - 11.2. Modelo animal de infección crónica.
 - 11.3. Modelo animal de infección crónica reactivada.
 - 11.4. Pacientes inmunocompetentes.
 - 11.5. Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.
 - 11.6. Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.
- 12.- Evaluar la utilidad diagnóstica de la detección de antígenos circulantes en:
 - 12.1. Modelo animal de primoinfección.
 - 12.2. Modelo animal de infección crónica.
 - 12.3. Modelo animal de infección crónica reactivada.
 - 12.4. Pacientes inmunocompetentes.
 - 12.5. Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.
 - 12.6. Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.
- 13.- Evaluar la utilidad diagnóstica de la detección de ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa en:
 - 13.1. Modelo animal de primoinfección.

- 13.2. Modelo animal de infección crónica.
 - 13.3. Modelo animal de infección crónica reactivada.
 - 13.4. Pacientes inmunocompetentes.
 - 13.5. Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.
 - 13.6. Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.
- 14.- Evaluar la eficacia antitoxoplásmica de nuevos fármacos.
- 14.1. Macrólidos.
 - 14.2. Clindamicina.
 - 14.3. Minociclina.
 - 14.4. Quinolonas.

3.- REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1.- Generalidades.

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular ubicuo del subphylum Apicomplexa, clase Sporozoa y orden Eucoccidia, suborden Kimerina que afecta a muchos animales y al hombre, permaneciendo después de la infección aguda en el hospedador en forma de quistes tisulares con bradizoitos infectantes.

Tiene distribución universal, siendo sus reservorios los gatos, los pájaros y los mamíferos. El gato actúa como hospedador definitivo ya que la reproducción sexual se desarrolla en el epitelio de su intestino y como hospedador intermediario, mientras que todos los demás animales infectados actúan como hospedadores intermediarios ya que en ellos tienen lugar solo ciclos asexuales de reproducción.

La infección por *Toxoplasma gondii* puede ser aguda o crónica, sintomática o asintomática. La infección aguda recientemente adquirida casi siempre es asintomática en los niños mayores y los adultos; todos los síntomas y signos (toxoplasmosis aguda) son habitualmente de corta duración y autolimitados. En la mayoría de los casos, persiste la forma quística del microorganismo, pero la persona no tiene manifestaciones clínicas (infección crónica o latente por *Toxoplasma gondii*). Sin embargo, en algunos casos, el *Toxoplasma gondii* es la causa comprobada de manifestaciones clínicas persistentes o recurrentes (toxoplasmosis crónica); la coriorretinitis es un ejemplo de la forma crónica de la enfermedad. La infección aguda plantea el mayor peligro para el paciente inmunodeficiente y para el embrión y feto durante la gestación.

En los pacientes inmunodeficientes, como aquellos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (HIV), receptores de trasplantes y inmunodeprimidos, la infección aguda puede ser debida a una primoinfección por el parásito, pero lo más frecuente es que sea debida a

una reactivación. En estos pacientes se produce una infección aguda, grave, que pone en peligro la vida del enfermo con cuadros de encefalitis, miocarditis y/o neumonitis. El lactante infectado in útero (con signos de infección al nacimiento o sin ellos), puede desarrollar secuelas graves tales como compromiso visual, trastornos neurológicos e hipoacusia neurosensorial.

Toxoplasma gondii puede aparecer en tres formas: el ooquiste que es el resultado de la reproducción sexual que se produce en el intestino del gato que contiene dos esporas con cuatro esporozoitos, el taquizoito que es la forma asexual que produce el inicio del ciclo tisular por endodiogenia y el quiste tisular, que contiene bradizoitos y que es capaz de persistir en el tejido durante la fase crónica de la infección. Aunque solo hay una especie de *Toxoplasma* existen entre las cepas diferencias en la virulencia, debido a polimorfismos en el ADN (1).

El ooquiste es ovoide y mide 10 por 12 μm . La maduración del ooquiste (esporulación) necesaria para ser infectivo, ocurre después de la excrección al medio ambiente. La esporulación es más rápida a altas temperaturas (ocurre a los 2-3 días a 24 °C y a los 14-21 días a 11°C , pero no ocurre por debajo de 4°C o por encima de 37°C)) (2). El ooquiste puede permanecer viable hasta 18 meses en suelo húmedo, por lo que el medio ambiente constituye un reservorio eficaz en la transmisión del parásito. Los ooquistes se excretan durante 1-3 semanas a los 20-24 días de haber tenido lugar la infección del gato y se excretan hasta 10 millones por día (3).

El taquizoito es la forma invasiva que aparece durante la fase aguda de la infección, mide 3 por 7 μm y es intracelular obligado. La desecación, el congelamiento/descongelamiento y la exposición a los jugos digestivos ácidos destruye a los taquizoitos.

Pueden infectar casi todas las células de mamíferos y multiplicarse en el citoplasma dentro de una vacuola parasitófora cada 4 ó 6 horas. Rompe la célula hospedadora e invade células contiguas. La respuesta humoral hace que los taquizoitos extracelulares sean lisados mediante la acción conjunta de anticuerpos y complemento (4).

El quiste tisular tiene un diámetro entre 10 y 200 μm y contiene varios miles de bradizoitos y pueden persistir en el tejido toda la vida del huésped. Los quistes se encuentran en cualquier órgano, pero fundamentalmente en miocardio, músculo esquelético y cerebro (5). Son relativamente resistentes a los jugos digestivos, de ahí la posibilidad de transmisión del parásito en carne poco hecha. Son destruidos por irradiación con rayos gamma (más de 25 rad), temperaturas mayores de 61°C durante 4 minutos congelación a -20°C durante 34 horas seguido de descongelación (5,6,7,8).

La toxoplasmosis es una zoonosis extendida por todo el mundo, infectando a animales carnívoros, herbívoros y omnívoros de todos los ordenes de mamíferos. La prevalencia de quistes tisulares en la carne empleada para el consumo humano es alta. El 1% de los gatos del mundo excretan ooquistes. Invertebrados que coman heces pueden servir de diseminadores de ooquistes, aunque la presencia de gatos es de principal importancia en el mantenimiento de la infección (9), existen lugares con alta prevalencia sostenida por carnivorismo de este parásito en ausencia de gatos y áreas con baja prevalencia de toxoplasmosis en presencia de gatos (10).

En humanos, la prevalencia de seropositividad de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* se incrementa con la edad, y no hay diferencia entre los sexos. En Países como El Salvador, Tahití o Francia la prevalencia llega al 90% en la cuarta década de la vida, en EEUU la prevalencia oscila entre el 3 y el 70% en adultos y en España la prevalencia ronda el 50% en adultos. La

prevalencia tiende a ser menor en regiones frías, en regiones áridas y secas y en zonas de gran altitud debido a la dificultades que presentan estas zonas para la supervivencia del ooquiste.

Las dos rutas principales de transmisión del *Toxoplasma gondii* son la oral y la congénita. El 25% de los corderos y el 25% de los cerdos presentan quistes tisulares en su carne, mientras que raramente se aísla de carne de vaca (11). Se ha demostrado la transmisión a través de leche no pasteurizada (12) y se ha aislado el parásito en huevos (13). Por tanto la ingestión de carne con quistes tisulares, o de verduras con ooquistes son las dos formas más frecuentes de infección en humanos. Aunque se han aislados taquizoitos en las secreciones de las personas con infección aguda, no se ha demostrado que se produzcan infecciones entre las personas por esta vía.

La transmisión de la madre al feto, ocurre básicamente en mujeres que han adquirido la infección durante el embarazo. Raramente se han observado casos de infección fetal cuando la madre inmunocompetente había adquirido la infección 6-8 semanas antes de la concepción, de hecho, aunque hay algunas comunicaciones al respecto, solamente se ha podido comprobar un caso (14).

Los trabajadores del laboratorio pueden adquirir la infección por inoculación accidental (15), ya que el *Toxoplasma gondii* puede sobrevivir en sangre citratada durante 50 días a 4°C y la transmisión puede producirse por la inoculación de sangre entera o glóbulos blancos. La transmisión de la infección a través del trasplante de órganos se ha documentado en casos de trasplante de corazón de un sujeto seropositivo a otro seronegativo (16,17).

Toxoplasma gondii invade todos los tipos celulares, salvo los eritrocitos al contrario que otros patógenos

intracelulares, y la invasión celular ocurre mediante un proceso activo (18). Los taquizoitos son destruidos por los intermediarios reactivos del oxígeno, por acidificación, por fluctuaciones osmóticas, por intermediarios reactivos del nitrógeno, por la deplección del triptófano intracelular y por anticuerpos específicos combinados con el complemento (18,19,20,21,22,23,24) sin embargo se produce la supervivencia de los taquizoitos por la formación de la vacuola parasitofora que los protege de la ingestión. No ocurre la fusión con el lisosoma y la acidificación (20,25).

Ante la infección por *Toxoplasma gondii* se producen anticuerpos tipo Ig G, Ig M, Ig A e Ig E y los taquizoitos extracelulares son lisados en presencia de complemento (23,24). Las citoquinas juegan un papel crítico en la defensa del hospedador contra la infección, siendo el interferón gamma el que juega el papel principal. Los linfocitos obtenidos de pacientes con HIV, no son capaces de producir gamma interferon ni interleucina 2 en respuesta a la estimulación con antígenos de *Toxoplasma gondii* (26,27). Los niveles séricos de interferon gamma son más bajos en pacientes con encefalitis toxoplásmica que en sujetos inmunocompetentes con linfadenopatías por *Toxoplasma gondii* (28). El tratamiento de los monocitos y macrófagos de pacientes con HIV con gamma interferon mejora su actividad contra *Toxoplasma gondii* (29,30).

En cuanto al ADN del parásito, el esporozoito contiene aproximadamente 0,1 pg de ADN (100 fg); este es el contenido de ADN de todas las fases del parásito excepto en el cigoto, que es diploide. El genoma del *Toxoplasma gondii* contiene aproximadamente $8 \cdot 10^7$ pares de bases, con un 50% del cociente guanina/citosina (31,32,33). Mediante el empleo de electroforesis en campo pulsado para construir el cariotipo, se ha demostrado que *Toxoplasma gondii* presenta 10 fragmentos compatibles con

cromosomas, con un tamaño de 2 a 6 Mb (34). Se ha secuenciado algunos genes que se reflejan en la Tabla 1:

Genes secuenciados	Tamaño mRNA	Localización
p22	1,6	Membrana
p30	1,5	Membrana
p23	1,4	Gránulos vacuolares
p28	1,1	Gránulos vacuolares
ROP1	2,1	Roptria
p54	1,6	Membrana
alfa-tubulina	1,4	Microtúbulos subpeliculares
beta-tubulina	1,4	Igual
B1	1,6	Desconocido
p63, NTPasa	2,8	Mitocondria

3.2.- Características clínicas de la toxoplasmosis.

Aunque la mayoría de infecciones por *Toxoplasma gondii* son asintomáticas, en determinadas situaciones puede producir enfermedad clínica, así puede afectar al sujeto inmunocompetente de forma leve o producir cuadros más graves de toxoplasmosis ocular y de infecciones congénitas.

Solamente el 10-20% de las infecciones en adulto no inmunodeprimido son sintomáticas (35). Generalmente, la toxoplasmosis se presenta como una linfadenopatía cervical asintomática, pero puede hallarse comprometido cualquier grupo ganglionar o todos. Los ganglios habitualmente son de tamaño discreto y no sensibles al tacto, rara vez tienen más de 3 cm de diámetro, pueden variar en firmeza y no supuran (36). En otros casos, los ganglios pueden ser sensibles a la palpación o hallarse

adheridos. Es posible la presencia de fiebre, malestar general, diarrea nocturna, mialgias, odinofagia, erupción maculopapulosa, hepatoesplenomegalia, y en el cuadro hemático un pequeño número de linfocitos atípicos (<10%) (37). El cuadro clínico puede ser semejante al de la mononucleosis infecciosa o infección por citomegalovirus, pero la toxoplasmosis no produce más del 1% de los síndromes mononucleósidos. La linfadenopatía retroperitoneal, o mesentérica, puede producir dolor abdominal (38). Algunas veces sobreviene coriorretinitis en los casos de toxoplasmosis adquirida aguda. Aunque la coriorretinitis habitualmente es unilateral en ellos, casi siempre es bilateral en los casos de toxoplasmosis congénita diagnosticada en el nacimiento (39). En el individuo inmunocompetente, la evolución es benigna y autolimitada. Los síntomas, si se presentan, habitualmente se resuelven en algunos meses y rara vez persisten más de 12 meses.

La infección por *Toxoplasma gondii* es una causa importante de coriorretinitis en los países occidentales, la mayoría de los casos son debidos a infección congénita (40). Los pacientes se hallan a menudo asintomáticos hasta más tarde, apareciendo la incidencia pico de la enfermedad sintomática en la segunda y tercera década de la vida. Es raro que ocurra reactivación clínicamente aparente después de los 40 años. La lesión característica es una retinitis necrotizante focal que aparece inicialmente en el fondo del ojo como una mancha algodonosa sobreelevada, blanco amarillenta con márgenes poco claros, habitualmente sobre el polo posterior (41). Las lesiones muchas veces se hallan en grupos pequeños y las lesiones individuales en el grupo pueden ser de edades variadas. Con la cicatrización, las lesiones se vuelven pálidas, se atrofian y desarrollan pigmentación negra. La panuveítis puede acompañar a la coriorretinitis, pero nunca se ha probado que ocurran uveítis anterior

aislada. La coriorretinitis aguda puede producir síntomas como visión borrosa, escotomas, dolor, fotofobia y epífora. Ocurre afectación o pérdida de la visión central cuando está involucrada la mácula. A medida que la inflamación se resuelve, la visión mejora, con frecuencia sin recuperación completa de la agudeza visual. Las características que sugieren toxoplasmosis en el examen oftalmológico incluyen afectación bilateral de la mácula, degeneración coriorretiniana con una retina de aspecto normal que rodea a lesiones típicas en sacabocados, desarrollo rápido de atrofia del nervio óptico y claridad del humor vítreo y acuoso.

La toxoplasmosis congénita es el resultado de una infección aguda, habitualmente asintomática, que adquiere la madre durante la gestación. El riesgo para la infección del feto no se correlaciona con el hecho de que la infección en la madre sea asintomática o no durante la gestación. Para evaluar el riesgo de transmisión del microorganismo al feto, es necesario determinar cuando la mujer embarazada adquirió la infección con respecto a la fecha de concepción. La infección adquirida en el primer trimestre por mujeres que fueron tratadas con terapia antitoxoplásmica produjo infección congénita en el 25% de los casos; el pronóstico de estos embarazos puede ser el aborto espontáneo, el nacimiento de un mortinato o la enfermedad severa en el recién nacido. Las incidencias de infección fetal fueron de 54 y 65% para las infecciones del segundo y del tercer trimestre, respectivamente; alrededor del 72 y del 89% de los lactantes infectados no presentaron signos de infección.

La encefalitis toxoplásmica en pacientes HIV casi invariablemente resulta de la reactivación de infecciones latentes (42); la ruptura intermitente de los quistes en el cerebro junto a la respuesta inmune no adecuada origina la reactivación local. También puede producirse la reactivación fuera del SNC, ya que en el 14-38% de los

casos además de lesiones en el SNC se observan parasitemias (43,44,45).

La incidencia de encefalitis toxoplásmica se correlaciona directamente con la prevalencia de anticuerpos anti-toxoplasma en la población y el estado de la infección por HIV de los individuos de la población. La prevalencia entre los pacientes HIV en EEUU oscila entre el 15 y el 40% (46) y llega al 96% en ciertas áreas de Africa y de Europa (47). Aproximadamente, el 45% de los enfermos HIV con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* desarrollan encefalitis toxoplásmica (48) por lo que en áreas de alta prevalencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* pueden desarrollar encefalitis toxoplásmica entre el 25 y el 50% de los pacientes HIV (46).

La mayor incidencia de encefalitis toxoplásmica se produce en pacientes con menos de 100 linfocitos T CD4/mm³ (43,49), también puede adquirirse la infección por *Toxoplasma gondii* después de estar infectado por HIV (primoinfección por *Toxoplasma gondii*), en este caso, la seroconversión ocurre entre el 2 y el 5,5% de los casos (50,51); estos sujetos están expuestos a sufrir encefalitis toxoplásmica, por lo que es necesario educar a los pacientes seronegativos para que prevengan esta infección.

La encefalitis toxoplásmica en pacientes con HIV típicamente produce abscesos cerebrales con tres zonas características: una zona central avascular, alrededor aparece una zona con un infiltrado inflamatorio con linfocitos, células plasmáticas y macrófagos; aparecen muchos taquizoitos en los márgenes de las áreas necróticas; una zona externa contiene quistes de *Toxoplasma gondii*: Se puede observar edema, vasculitis, hemorragia e infarto cerebral(45, 52,53). Comúnmente se observa astrocitosis. La encefalitis toxoplásmica difusa se caracteriza por nódulos de microglía sin abscesos en

la sustancia gris del cerebro y del cerebelo, (54,55) y la progresión de esta forma es rápidamente fatal. En autopsias se observa lesiones necróticas en la médula ósea en el 6% de los pacientes (54). Para el diagnóstico de infección aguda por *Toxoplasma gondii*, se necesita la demostración de taquizoitos. La encefalitis toxoplásmica tiene predilección por los ganglios basales (56).

La encefalitis por *Toxoplasma gondii* es la primera causa de afectación del SNC en pacientes con HIV (42) apareciendo una gran variedad de hallazgos clínicos como alteración del estado mental, mareos, alteración de los nervios craneales, anormalidades sensoriales, signos cerebelosos, meningismo, desórdenes en el movimiento y manifestaciones neuropsiquiátricas. Característicamente aparece como un proceso subagudo con signos neurológicos focales, aunque en un 15-25 de los casos aparecen abruptamente con hemorragia cerebral (57,58,59).

Lo más común es la aparición de hemiparesia o anormalidades en el habla, menos frecuentemente aparece desorientación, alteración del estado mental, letargo y coma. Menos comúnmente puede aparecer Parkinson, distonía focal, panhipopituitarismo, diabetes insípida y síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (60,61,62,63,64,65,66,67). La encefalitis toxoplásmica difusa se caracteriza por disfunción cerebral generalizada sin síntomas focales y las imágenes de TAC muestran atrofia cerebral (68).

Las imágenes de TAC de lesiones típicas de encefalitis toxoplásmica se caracterizan por ser lesiones bilaterales múltiples en un 70-80% de los casos, aunque puede aparecer una lesión sola. Las lesiones tienden a ocurrir en la unión corticomedular, frecuentemente involucrando a los ganglios basales. Son hipodensas y tienen un anillo alrededor que capta el contraste. Sin embargo, estas lesiones no son patognomónicas, ya que se no establece diagnóstico diferencial con el linfoma del

SNC, que puede presentar lesiones múltiples en un 40% de los casos. La probabilidad de linfoma aumenta y la de encefalitis toxoplásmica disminuye cuando aparece una lesión única (69,70).

En el 90% de los pacientes con HIV y encefalitis toxoplásmica aparece mejora en las imágenes de TAC después de 2-3 semanas de tratamiento, mientras que la resolución completa del cuadro tarda entre 6 semanas y 6 meses. Las lesiones periféricas se resuelven mejor que las que están situadas profundamente. (71,72). Las lesiones pequeñas suelen resolverse completamente en 3-5 semanas, mientras que las lesiones grandes tardan más en resolverse y dejan una pequeña lesión residual. Las anomalías en el LCR de pacientes con encefalitis toxoplásmica no son características, aparece una moderada pleocitosis mononuclear, una moderada elevación de las proteínas en el LCR y raramente se observa hipoglucorraquia (57,73).

Los métodos de diagnóstico de la infección por *Toxoplasma gondii* se basan en los casos de pacientes inmunocompetentes en estudios serológicos de detección de anticuerpos, sin embargo en pacientes inmunodeprimidos estos métodos de diagnóstico tienen muchos problemas, ya que la incapacidad de producción de anticuerpos específicos frente a *Toxoplasma gondii* hace que en muchas ocasiones, no aparezca respuesta de anticuerpos ante reactivaciones o primoinfecciones en este tipo de pacientes.

La mayoría de los casos de encefalitis toxoplásmica sucede por reactivación de infecciones latentes, solamente el 1-3% de los casos de pacientes con HIV y encefalitis toxoplásmica no presentan en su suero anticuerpos tipo Ig G frente a *Toxoplasma gondii*, pero la presencia de anticuerpos tipo Ig G en el suero no nos permite detectar la presencia de reactivación, ya que la actividad toxoplásmica no se correlaciona con la cantidad

de anticuerpos Ig G presentes en el suero. Un incremento de anticuerpos Ig G en el suero en casos de reactivación ocurre pocas veces. La presencia de Ig G frente a *Toxoplasma gondii* en el suero de un paciente con HIV aumenta el riesgo que a lo largo de su enfermedad padezca un cuadro de encefalitis toxoplásmica, mientras que si no presentan anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*, este riesgo disminuye mucho (74). La presencia e Ig M como respuesta a la reactivación es rara en este tipo de pacientes.

En un estudio clínico doble ciego al azar apareció encefalitis toxoplásmica en 75 de 499 pacientes, surgiendo en un 25% de los pacientes con menos de 100 CD4 y con serología positiva a *Toxoplasma*. El empleo de profilaxis disminuyó el riesgo de encefalitis toxoplásmica de modo significativo ($p < 0,001$) (75).

Se han realizados muchos estudios clínicos que pretenden fijar las características clínicas más comunes a los cuadros de encefalitis toxoplásmica con el objeto de establecer signos o síntomas patognomónicos de este cuadro, que ayuden a su diagnóstico, al no existir un método diagnóstico aceptable por métodos de laboratorio tradicionales, así:

Zangerle y cols. estudian la encefalitis toxoplásmica y encuentra que el único marcador serológico predictivo es la presencia de Ig G antitoxoplasma, que aumenta el riesgo de padecer encefalitis toxoplásmica (76).

Nogues y cols. tras estudiar la encefalitis toxoplásmica concluyen que los métodos serológicos tradicionales no tienen ninguna utilidad en el diagnóstico de esta patología (77).

Porter y cols. al estudiar 115 pacientes que presentan una media de CD4 de 50/mm³ señalan que la toxoplasmosis es la primera causa infecciosa de afectación del SNC en pacientes con HIV (78).

Taraeluki y cols. señalan a la encefalitis toxoplásmica como la afectación del SNC más frecuente, que produce lesiones focales. Se observa en pacientes con infección crónica por el parásito, por tanto la presencia de anticuerpos es un factor de riesgo en el padecimiento de la enfermedad, aunque no se puede diferenciar mediante pruebas serológicas normales entre toxoplasmosis aguda y crónica en este tipo de pacientes (79).

3.3.- Modelos experimentales en toxoplasmosis.

Debido a la importancia del problema diagnóstico de la encefalitis toxoplásmica y a que las técnicas de diagnóstico tradicionales carecen de valor para el diagnóstico de esta patología, muchos investigadores han pretendido resolver el problema. El primer objetivo es el establecimiento de modelos animales que puedan recrear las distintas situaciones clínicas en que puede aparecer la toxoplasmosis en los seres humanos (primoinfección, toxoplasmosis crónica asintomática y reactivación de una toxoplasmosis crónica), siendo el modelo de toxoplasmosis crónica reactivada el que se corresponde con la encefalitis toxoplásmica que padecen los pacientes inmunocomprometidos y sobre todo los pacientes con HIV, así:

Gazzinelli y cols. producen una reactivación de la toxoplasmosis en ratones crónicamente infectados mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti CD4, anti CD8, anti interferon gamma, demostrando que se produce reactivación mediante el empleo de anticuerpos anti interferon gamma o empleando anti-CD4 en combinación con anti-CD8 (80).

Suzuki y cols. establecen un modelo de encefalitis toxoplásmica mediante el empleo de anticuerpos

monoclonales contra interferon-gamma endógeno en ratones crónicamente infectados con *Toxoplasma gondii*. Administra a estos ratones anticuerpos monoclonales contra esta citoquina produciendo en los ratones infectados una encefalitis grave. Aparecen áreas de inflamación focal aguda con un infiltrado de células inflamatorias en las meninges y en el parénquima cerebral, demostrándose por la tinción de inmunoperoxidasa la presencia de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*. Alrededor de los quistes se detecta inflamación aguda, con presencia de taquizoitos del parásito que aparecen al romperse el quiste (81).

Pomeroy y cols. estudian la reactivación de la toxoplasmosis crónica que se produce por una infección concomitante por citomegalovirus. A ratones previamente inoculados con una cepa no virulenta de *Toxoplasma gondii* y que tenían establecida una toxoplasmosis crónica se les inoculó una cepa de citomegalovirus murino y se produjo una reactivación de la toxoplasmosis, manifestándose como una neumonía, y aunque se produjo la activación de los macrófagos pulmonares, no se pudo controlar el cuadro (82).

Hoffin y cols. establecen un modelo de encefalitis toxoplásmica mediante la inoculación intracerebral de taquizoitos de la cepa C56 del parásito. Los ratones inmunocompetentes sobrevivieron pero los inmunodeprimidos murieron. En los ratones inmunocompetentes se produjo necrosis en el sitio de inoculación, con áreas alrededor de intensa inflamación, con células mononucleares y formación de quistes, no se detectó la presencia de taquizoitos pasadas las dos semanas. En los ratones inmunodeprimidos aparecen extensas áreas de destrucción tisular y los taquizoitos se detectan siempre. Los ratones tratados con cortisona muestran muchos taquizoitos y escasa inflamación, los ratones tratados con ciclofosfamida muestran en sus cerebros quistes y un

grado variable de inflamación; los tratados con ciclosporina muestran menos inflamación y menos taquizoitos y menor destrucción tisular que los tratados con cortisona (83).

Vollmer y cols. también establecen un modelo de encefalitis toxoplásmica en ratones inoculados experimentalmente con la cepa C56 de *Toxoplasma gondii*, por deplección selectiva de los linfocitos T-4 (células con CD4) que ocasiona una reactivación de la enfermedad. Si se realiza la deplección de estos leucocitos en ratones con infección aguda por el parásito, aparece una grave infección sistémica, pero la afectación cerebral es escasa; si los ratones están crónicamente infectados, la muerte de los ratones aparece por una afectación grave del sistema nervioso central, mientras que la afectación sistémica es leve (84).

Hulinska y cols. establecen un modelos de encefalitis toxoplásmica mediante la administración de cortisona. Aparece ruptura de los quistes tisulares con aparición de parasitemia producida por taquizoitos, desarrollándose una encefalitis toxoplásmica fatal en todos los ratones (85).

McCabe y cols estudian la actividad antitoxoplásmica de la ciclosporina frente a *Toxoplasma gondii* "in vivo" e "in vitro". En los estudios realizados in vitro se observa que cuando se añade ciclosporina a un cultivo celular de macrófagos, se inhibe la replicación de *Toxoplasma gondii*, pero cuando se administra en un modelo de toxoplasmosis murina no se demuestra que presente efectos importantes frente a *Toxoplasma gondii* (86).

Araujo estudia la actividad de los anticuerpos monoclonales contra los linfocitos L3T4⁺ (CD4⁺) en un modelo murino con infección por *Toxoplasma gondii*. Si la administración de los anticuerpos se realiza antes de producirse la infección, al inocular quistes de una cepa poco virulenta de *Toxoplasma gondii* por vía oral,

disminuye la respuesta humoral y celular ante la infección, apareciendo en el cerebro de los ratones un número significativamente mayor de quistes que en los controles. Cuando se administra los anticuerpos monoclonales en ratones crónicamente infectados, se produce la muerte de los ratones, a diferencia de los ratones empleados como control (87).

Carrof y cols. estudian la evolución natural de la infección por *Toxoplasma gondii* en sujetos inmunocompetentes mediante técnicas de cultivo celular, tras la inoculación de una cepa no virulenta de *Toxoplasma gondii* por vía oral, detectaron la presencia del parásito en leucocitos de sangre periférica los días 14 y 21 de seguimiento (88).

Derouin y cols. estudian la cinética en el ratón de las infecciones agudas y crónicas. La infección aguda se establece por inoculación intraperitoneal de taquizoítos de las cepas virulentas Rh y C56, la infección crónica por inoculación oral de la cepa avirulenta C. En los casos de infección aguda, primero se detectan los parásitos en el pulmón al 2º día postinoculación, mientras que en cerebro y en sangre aparecen entre los días 4 a 6 postinoculación. Los taquizoítos permanecen en el pulmón y en el cerebro hasta la muerte de los ratones. En cuanto a los ratones infectados con cepa avirulenta, se detecta la presencia de taquizoítos el día 7 y se mantienen a niveles altos hasta el día 10, en que empiezan a desaparecer. En el día 50 ya no aparecen, detectándose solamente la presencia de bradizoítos (89).

3.4.- Métodos diagnósticos basados en la detección de antígenos de *Toxoplasma gondii*.

Los nuevos métodos diagnósticos a desarrollar para resolver este problema tienen dos grandes ejes, el primero se basa en el desarrollo de nuevas pruebas serológicas más resolutivas y el segundo es la detección

del parámetro por la reacción en cadena de la polimerasa. Las nuevas técnicas serológicas a desarrollar se basan en los sistemas de diagnóstico serológicos existentes en la actualidad, así el enzimoimmunoensayo es la técnica serológica que debido a su versatilidad para la detección de antígenos y anticuerpos, su sensibilidad, su reproductibilidad, su facilidad técnica y su posibilidad de automatización aparece como la herramienta más útil en la resolución de este problema.

Los métodos de enzimoimmunoensayo se basan en la detección de productos coloreados generados por la actuación de enzimas. Las primeras descripciones de la técnica aparecen en los primeros 70. (90,91) Los enzimas más utilizados en el sistema son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante ya que pueden utilizar muchos sustratos líquidos.

Las placas utilizadas para la realización del método son normalmente de poliestireno, donde se fija el antígeno o el anticuerpo según el tipo de ELISA que se realice; la fijación depende de muchos factores, el primero es la concentración proteica de la solución donde se encuentra el producto a fijar, debido a la baja capacidad fijadora de las placas, una solución con una concentración proteica de 10 ug/ml es suficiente para que se produzca la fijación, aunque ya con 4 ug/ml se produce la saturación de la placa (92).

Para evitar la producción de resultados inespecíficos, son necesarios procedimientos de bloqueo y de lavado con detergentes. Cuando la concentración de proteínas no satura todos los sitios de unión de la microplaca, debe utilizarse unas moléculas proteicas inmunológicamente irrelevantes para la saturación de los sitios de unión vacíos, para esto se emplean tampones con albúmina sérica bovina o gelatina. Para prevenir interacciones no inmunológicas todos los reactivos se añaden en tampones que contienen detergentes, normalmente

0,1% de Tween 20, al igual que todos los pasos de lavado.

Debido a que los pacientes que padecen encefalitis toxoplásmica son sujetos inmunodeprimidos, la detección de microorganismo directamente (detección de antígenos) aparece como una alternativa útil, así se han estudiado el valor diagnóstico de la detección de antígenos circulantes de *Toxoplasma gondii* en muchos modelos experimentales de toxoplasmosis y mediante el empleo de técnicas distintas, así:

Acebes y cols. estudian la detección de antígenos circulantes en ratón en tres modelos de toxoplasmosis, el primero tras inoculación de la cepa RH (toxoplasmosis aguda) en el que detecta la presencia de antígenos mediante un ELISA a partir del segundo día postinoculación, el segundo modelo es por inoculación de la cepa T626 que produce una toxoplasmosis crónica, en este caso detecta la presencia de antígenos a los 13 días después de la inoculación, el tercer modelo es por inoculación de la cepa Beverley (toxoplasmosis subaguda), y en estos detecta la presencia de antígenos circulantes desde el segundo día (93).

Guo y cols. estudian la producción de antígenos circulantes en conejos, detectando su presencia en el 64,7% de los conejos al primer día postinoculación con taquizoitos, se detecta también en el día 13 postinoculación, pero ya no se detecta en los días 60 y 90 postinoculación (94).

Muller y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes en ratones y conejos tras inoculación de la cepa RH y la cepa HanR de *Toxoplasma gondii* mediante un método de ELISA que emplea anticuerpos monoclonales, solamente detecta la presencia de éstos en los animales inoculados con la cepa cistógena (95). Hassl y cols. estudian la detección de antígenos circulantes mediante ELISA en cuatro modelos de toxoplasmosis experimental murina, producidos por inoculación intraperitoneal de

taquizoitos de 4 cepas distintas de *Toxoplasma gondii*; se detectó la presencia de antígenos circulantes a niveles de ng/ml en los cuatro modelos desde el primer día postinoculación. El tiempo de aparición y la estructura es similar en los cuatro modelos ensayados (96).

Asai y cols. detectan mediante la utilización de un anticuerpos monoclonal en un sistema de ELISA un enzima que se encuentra en el taquizoito de *Toxoplasma gondii* llamado nucleotido fosfato hidrolasa en suero de ratones infectados con la cepa RH y la cepa Beberley del parásito. El límite de sensibilidad de la técnica es de 0,3 ng/ml. Los ratones inoculados con la cepa RH presentan el enzima en el suero el día 1 postinoculación, alcanzando concentraciones de 30 ng/ml al día 5 postinfectación. En ratones inoculados intraperitonealmente con quistes de la cepa Beberley, se detecta la presencia del enzima en el día 3 y el pico se observa en el día 10 con 89 ng/ml.

Hassl y cols. estudian la aparición de antígenos circulantes en conejos tras inoculación de quistes de *Toxoplasma gondii* por vía oral, aparecen antígenos a las 5 y a las 8 semanas postinoculación (96).

Suzuki y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes de *Toxoplasma gondii* en ratones atímicos inoculados con una cepa no virulenta del parásito, utilizan un sistema de aglutinación con látex y detectan la presencia en las semanas 1 y 3 postinoculación, no detectando la presencia de anticuerpos en suero (97).

Ise y cols. detectan la presencia de antígenos circulantes mediante un sistema de ELISA que utiliza la interacción entre biotina y avidina en un modelo experimental de toxoplasmosis en conejos producida por inoculación subcutánea de taquizoitos de la cepa RH. El límite de detección del sistema es de 250 ng/ml. Se detecta la presencia de antígenos el día 3

postinoculación, antes de la aparición de anticuerpos en suero y de la parasitemia. El análisis de los antígenos por cromatografía de líquidos de alta resolución, muestra 4 tipos distintos de antígenos de entre 400.000 y 45.000 D (98).

Nakao y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes en ratones y ratas inoculados con la cepa RH mediante la técnica de la contrainmunolectroforesis. En los ratones inoculados intraperitonealmente, los antígenos circulantes aparecen en el segundo día postinoculación y se mantienen hasta la muerte de los ratones y no se detecta la presencia de anticuerpos en estos ratones. En otro grupo de ratones que además fueron sometidos a tratamiento inmunosupresor también se detecta la presencia de antígenos circulantes. En los ratones inoculados por vía subcutánea, la presencia de antígenos circulantes se detecta a los 5 días postinoculación hasta su muerte; los anticuerpos se elevan al mismo tiempo. Las ratas, que resisten la inoculación intraperitoneal de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, no muestran uniformemente la presencia en suero de antígenos circulantes, pero si aparece la presencia de anticuerpos (99).

Turunen y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes mediante un sistema de ELISA en casos de toxoplasmosis experimental murina. El límite de detección de la técnica es de 10 ng/ml. Detecta la presencia de antígenos al primer día postinoculación en tejido y aparecen en suero y en orina al segundo día postinoculación (100).

Debido a los buenos resultados que se obtienen con las técnicas de detección de antígenos circulantes para el diagnóstico de la toxoplasmosis experimental murina, algunos autores aplican estas técnicas a muestras clínicas de pacientes infección por *Toxoplasma gondii*.

Dannemann y cols. realizan un estudio prospectivo

en el que estudian la presencia de antigenemia en 11 sueros de pacientes con HIV, no encuentra presencia de antígenos en ninguno de ellos, incluso aunque dos presentaban encefalitis toxoplásmica (101).

Hassl y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes en 232 sueros y 40 muestras de LCR correspondientes a 125 pacientes con infección HIV en los estados III y IV. Se detectó la presencia de antígenos circulantes mediante un método de ELISA en 32 sueros de 20 pacientes (16% de las personas investigadas), las antigenemias se correlacionaban con los resultados serológicos y los síntomas clínicos (102).

Candolfi y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes en casos de reactivaciones de toxoplasmosis crónicas, estudian 115 sueros de 19 pacientes con inmunosupresión por ser receptores de trasplantes y que clínica y serológicamente sufrían una reactivación de la toxoplasmosis, utilizan un método de ELISA con anticuerpos Ig G marcados con fosfatasa alcalina. En 8 pacientes se detectó la presencia de antígenos antes del incremento de los niveles de Ig G o a la vez y en un paciente se detectó hasta su muerte. En los demás casos, la presencia de antígenos desapareció cuando aparecieron niveles elevados de Ig G por la formación de inmunocomplejos, por lo que observó que la cinética de los antígenos es muy corta (103).

Brooks y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes de *Toxoplasma gondii* mediante un sistema de dot blot. El límite de detección se situó en 10-40 pg de antígeno si los antígenos circulantes estaban diluidos en tampón fosfato y de 40-130 pg si estaban diluidos en suero de ratón, humano o líquido cefalorraquídeo. Se detecta la presencia de antígenos en la toxoplasmosis experimental murina al segundo día postinoculación, y se detectó la presencia de antígenos en cuatro de seis LCR de neonatos con toxoplasmosis congénita y en 2 de los

seis sueros de estos mismos sujetos (104).

3.5.- Métodos diagnósticos basados en el estudio de los anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*.

Además del estudio de los antígenos circulantes, muchos investigadores han estudiado la verdadera utilidad de las distintas clases de anticuerpos que pueden aparecer en una infección por *Toxoplasma gondii*. A pesar que la detección de Ig G e Ig M son las herramientas clásicas utilizadas en el diagnóstico serológico, deben ser interpretados los resultados en función del tipo de pacientes que padecen la toxoplasmosis, ya que los resultados del estudio de anticuerpos están muy influidos por el grado de inmunosupresión del paciente.

Incluso en sujetos inmunocompetentes, la interpretación de la detección de Ig M es discutida, ya que esta inmunoglobulina se caracteriza porque aparece en niveles detectables en suero durante largos períodos de tiempo en el suero del sujeto, incluso meses o años después de padecer la infección aguda (105,106,107,108,109), por lo que para la demostración de primoinfección no es una buena herramienta diagnóstica.

La interpretación de la respuesta de anticuerpos ha sido estudiada por muchos autores:

Jaqueti Aroca y cols. comunican esta persistencia de Ig M en pacientes inmunocompetentes una vez finalizada la fase aguda de la infección por *Toxoplasma gondii* (110).

Aunque se ha descrito que los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida no producen Ig M ante la infección por *Toxoplasma gondii*, esto tiene sus excepciones y así Holliman y cols. informan de la detección de Ig M en un paciente con encefalitis toxoplásmica (111).

Derouin y cols. estudian las respuesta de anticuerpos en pacientes HIV, en el grupo de 62 pacientes con toxoplasmosis activa confirmada por biopsia o respuesta al tratamiento, encuentran anticuerpos Ig G en 61 pacientes, encontrando la presencia de Ig M solamente en tres pacientes. Se observó la presencia de incremento en los niveles de Ig G en el 30% de los pacientes en los que se pudo realizar un seguimiento serológico (112).

Holliman y cols. realizan un estudio serológico entre los pacientes HIV de Gran Bretaña, llegando a la conclusión de que el 27% de ellos, al tener anticuerpos antitoxoplasma tenían peligro de desarrollar una reactivación y que se producía primoinfección en un 0,5-1% de los pacientes (113).

Grant y cols. estudian la correlación entre la presencia de anticuerpos antitoxoplasma y el desarrollo de reactivaciones, encuentran anticuerpos en el 32% de los sujetos, apareciendo encefalitis toxoplásmica en el 26% de ellos en menos de dos años de evolución del HIV (114).

Turunen y cols. estudian la producción de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* en sujetos inmunocompetentes mediante un sistema de ELISA, 27 de 103 donantes de sangre presentan anticuerpos tipo Ig G y uno de ellos presenta además anticuerpos tipo Ig M y 9 de ellos presentan Ig A. En casos de toxoplasmosis aguda en sujetos inmunocompetentes se observa en la fase de infección aguda una elevación de los niveles de Ig G que declinan paulatinamente hasta que se estabilizan a los 2 años. Los anticuerpos Ig M aparecen al principio de la infección y aunque en algunos casos desaparecen a los 1-2 meses en la mayoría de los casos se detecta su presencia al cabo de 6 meses. La Ig A aparece también pero a niveles menores que la Ig M (115).

Zufferey y cols. estudian 47 pacientes HIV con reactivación toxoplásmica y observan un incremento de los

niveles de Ig G en el 30% de los casos, detectan la presencia de Ig M en el 6% de los pacientes y la Ig A en el 18% de los pacientes (116).

También se han realizado estudios en animales para poder conocer la producción de anticuerpos en modelos de toxoplasmosis experimental que reflejen las distintas situaciones clínicas y de los que podamos conocer perfectamente el momento de su evolución. Acebes y cols. estudian la presencia de Ig G e Ig M en un modelo de toxoplasmosis crónica y detecta la presencia de Ig G en la toxoplasmosis crónica a bajas concentraciones y la presencia de Ig M de forma variable (117).

Grant y cols. estudian la presencia de Ig M e Ig A en dos modelos de toxoplasmosis, en ratones y en ratas (la resistencia natural que presenta la rata a la infección por *Toxoplasma gondii* es comparable a la que presenta el ser humano adulto), encuentra que la Ig M y la Ig A aparecen al tiempo, alcanzando la Ig A un máximo en suero a los 40 días (118).

En vista de los problema diagnósticos que se plantean con la sola interpretación de los resultados serológicos de la Ig G e Ig M, se han buscado otros marcadores distintos que puedan clarificar ciertas situaciones, así la IgA se ha estudiado en los últimos años para evaluar su verdadero significado diagnóstico:

Jaqueti y cols. estudian la presencia de Ig A en suero en pacientes humanos inmunocompetentes y observan que permanece detectable después de finalizar la fase aguda de la enfermedad, por lo que no se correlaciona con infección aguda por *Toxoplasma gondii* (119).

Francis y cols. estudian la presencia de Ig A y observan que se mantiene en suero durante 6-7 meses y varía en cuanto a grado y duración en cada paciente, siendo todos los pacientes inmunocompetentes (120).

Patel y cols. estudian la detección de Ig A en pacientes HIV para establecer su utilidad diagnóstica de

infección aguda en este tipo de pacientes y concluyen que tiene un valor limitado (121).

Pinon y cols. estudian la presencia de Ig A en 800 muestras (suero, sangre del cordón u líquido cefalorraquídeo) correspondientes a sujetos con toxoplasmosis adquirida y congénita. Estas muestras corresponden a 300 pacientes con toxoplasmosis adquirida y a 28 niños con toxoplasmosis congénita. La Ig A muestra una cinética similar a la Ig M, incluso se puede detectar su presencia en el período neonatal en suero y en líquido cefalorraquídeo (122).

McLeod y cols. estudian la presencia de Ig A en las secreciones intestinales de ratones infectados por vía oral con bradizoitos de la cepa Me49 de *Toxoplasma gondii* mediante un sistema de inmunofluorescencia y un ELISA detectándose su presencia en este caso y no cuando se inoculaba a los ratones la toxina del cólera (123).

Pinon y cols. estudian el valor pronóstico y diagnóstico de los distintos marcadores serológicos en la toxoplasmosis en pacientes inmunodeprimidos. Estudian 1238 muestras (suero, líquido cefalorraquídeo y humor acuoso) de 318 pacientes. En sujetos inmunodeprimidos pero no HIV con toxoplasmosis activa se detectó la presencia de Ig A en todos los casos mientras que en pacientes con HIV y toxoplasmosis aguda detectan la presencia de Ig A en el 38%, la Ig M ayudó al diagnóstico en 1 de 71 pacientes que sufrían toxoplasmosis aguda y HIV. En sujetos con HIV y sin toxoplasmosis activa se detectó la presencia de Ig A en el 12% de los casos (124).

El estudio de avidéz de Ig G ha surgido como otra herramienta a evaluar; esta técnica se basa en que los anticuerpos creados al principio de la infección presentan menos avidéz por el antígeno, y por tanto es más fácil romper la unión antígeno-anticuerpo que los anticuerpos que existen en las infecciones antiguas, en

las que el sistema inmune produce anticuerpos con mucha avidez por el antígeno y que por tanto son más difíciles de separar cuando se encuentran unidos.

Francis y cols. ensayan el sistema de detección de la avidez de los anticuerpos tipo Ig G en pacientes con linfadenopatías por *Toxoplasma gondii*, en los que si el cuadro tenía menos de 3 meses de evolución , se detecta anticuerpos de baja avidez, mientras que en sujetos con HIV no encuentra diferencias entre pacientes con y sin encefalitis toxoplásmica (125).

Lappalainen y cols. estudian sueros de mujeres embarazadas inmunocompetentes con primoinfección por *Toxoplasma gondii* y concluyen que el estudio de la avidez de los anticuerpos Ig G es el mejor procedimiento de detectar primoinfecciones, presentando mejores resultados para el diagnóstico de este cuadro en sujetos inmunocompetentes que la detección de Ig M y de Ig A (126).

Hedman y cols. estudian la avidez de anticuerpos tipo Ig G en cinco pacientes con toxoplasmosis aguda y en 21 pacientes con toxoplasmosis antigua, todos los pacientes son inmunocompetentes, en los 5 con infección aguda encuentran anticuerpos de baja avidez, mientras que en el resto de los casos los anticuerpos Ig G presentan alta avidez (127).

3.6.- Métodos diagnósticos basados en la detección del ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Además del estudio de los distintos marcadores serológicos (antígenos y anticuerpos), se puede llegar al diagnóstico de determinadas situaciones clínicas de la toxoplasmosis mediante la demostración de la presencia del parásito, de ahí que con la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa se haya abierto una nueva posibilidad de diagnóstico de esta enfermedad.

La reacción en cadena de la polimerasa surgido en los últimos años como una herramienta muy útil para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas en las que el aislamiento del patógeno es difícil. Kary Mullis diseñó en 1983 un procedimiento para la amplificación in vitro de ácidos nucleicos llamado la reacción en cadena de la polimerasa (128), este procedimiento se fue desarrollando hasta que Saiki, en 1985 realizó la primera aplicación práctica.

El método se basa en la realización una serie de ciclos en cada uno de los cuales se produce la síntesis de ADN mediante la acción de un enzima llamado Taq polimerasa. Los oligonucleotidos, que son necesarios para iniciar la síntesis de ADN deben ser complementarios a sus sitios de unión al ADN que se quiere copiar y el fragmento a copiar es variable, pero para fines diagnósticos se amplifican entre 50 y 1500 bases.

Cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa contiene tres pasos, un paso de desnaturalización, en la que el ADN diana se incuba a altas temperaturas (94°C) para que se separen las dos cadenas y se permita la unión de los oligonucleotidos; el segundo paso consiste en la unión del ADN diana y los oligonucleotidos sintetizados y el tercer paso es una reacción de extensión, donde actúa el enzima Taq polimerasa y se produce la formación de la copia de ADN. Una reacción típica de PCR tiene entre 30 y 50 ciclos y en cada ciclo el número de copias de ADN aumenta en progresión geométrica.

El desarrollo de esta nueva técnica hace que hayan aparecido muchos trabajos en los que se evalúan distintas formas de extracción del ADN, distintas regiones del genoma del parásito a amplificar, distintas formas de detección del fragmento del ADN amplificado, etc. Así:

Ambroise-Thomas y cols. diseñan sondas para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras clínicas. Diseñan cebadores de 22-25 nucleótidos, obteniendo una

sensibilidad de la técnica de 2 fentogramos, obteniendo además especificidad adecuada (129).

Weiss y cols. evalúan la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en un modelo de toxoplasmosis murina aguda, detectan la presencia de taquizoitos en los tejidos a los dos días después de la inoculación y en sangre a los cinco días postinoculación. Su técnica tiene un límite de sensibilidad de 10 taquizoitos (1 taquizoito tiene 100 fg).

Savva y cols. desarrollan la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa mediante la detección de un fragmento del gen que codifica la proteína P30 del parásito, para la detección del amplificado utilizan sondas isotópicas y no isotópicas; detectan la presencia de ADN del parásito de varias cepas distintas mezclados con ADN de ratón y humano, obteniendo buenos resultados en sensibilidad y especificidad (130).

Burg y cols. utilizan la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar un fragmento del gen B1 de *Toxoplasma gondii* que se repite 35 veces en el ADN del parásito, detectan la presencia de un solo microorganismo cuando trabajan con un lisado de parásitos, mientras que detectan la presencia de 10 taquizoitos cuando trabajan con una mezcla de parásitos y leucocitos a razón de 1 parásito por cada 10^5 leucocitos. Esto representa la máxima infiltración celular (10^5 /ml) en 1 ml de líquido cefalorraquídeo obtenido de pacientes con encefalitis toxoplásmica. El gen B1 se detecta en las seis cepas estudiadas, dos de ellas aisladas de pacientes HIV. No observan reacción cruzada con otros microorganismos, entre los que se encuentran aquellos que comúnmente se hallan en el sistema nervioso central de estos pacientes (131).

Hitt y cols. comparan la utilidad diagnóstica de la detección de *Toxoplasma gondii*, en un modelo de toxoplasmosis experimental en conejos, de la reacción en

cadena de la polimerasa, el cultivo celular y la inoculación a ratón. Procesan los leucocitos de sangre periférica extraídos de los conejos inoculados, detectando la presencia del parásito en el 62% de las muestras por inoculación a ratón, en el 37% de las muestras por PCR y en el 25% por cultivo celular (132).

Guay y cols. amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa una secuencia situada en el ADN ribosómico que está repetida 110 veces. Como control de la reacción amplifican una secuencia del ADN ribosómico que es universal y se conserva en todas las células eucariotas. Consiguen detectar por esta técnica la presencia de unos pocos parásitos entre un gran número de células del hospedador (133).

Wastling y cols. comparan la inoculación en ratón con la reacción en cadena de la polimerasa, mediante esta técnica amplifican dos secuencias distintas correspondientes a los genes que codifican la proteína P30 del taquizoito y el gen B1. La amplificación del gen B1 es más sensible que la amplificación del gen que codifica la proteína P30 y sus resultados se correlacionan con la inoculación a ratón. El modelo experimental de toxoplasmosis se diseña mediante la inoculación de la cepa S48 de *Toxoplasma gondii* en ovejas (134).

Debido al gran auge que ha tenido en los últimos años esta técnica y a los buenos resultados que parece que presenta en los modelos animales ensayados, se ha evaluado la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en muestras obtenidas en pacientes humanos con encefalitis toxoplásmica:

Novati y cols. estudian mediante la reacción en cadena de la polimerasa 19 muestras de líquido cefalorraquídeo correspondientes a 19 pacientes con encefalitis toxoplásmica confirmada mediante biopsia cerebral y 16 líquidos cefalorraquídeos de 16 pacientes

con encefalitis toxoplásmica confirmada por respuesta al tratamiento y imágenes sugerentes en el TAC, utilizando la técnica de la nester PCR del gen B1. Estos autores obtienen resultados positivos en 8/19 (42,1%) y 10/16 (62,5%) respectivamente; entre los que habían recibido terapia antitoxoplásmica durante más de una semana, la sensibilidad bajó al 29% (135).

Cristina y cols. estudian la presencia de *Toxoplasma gondii* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en muestras de líquido cefalorraquídeos y encuentran resultados positivos en 8 de 11 pacientes (136).

Ostergaard y cols. estudian la presencia de *Toxoplasma gondii* en 5 líquidos cefalorraquídeos de pacientes con encefalitis toxoplásmica y obtienen resultados positivos en todos ellos, pero de los 33 muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes sin encefalitis toxoplásmica, obtienen un resultado falso positivo (137).

Schoondermark-van-de-Ven y cols. estudian la presencia de *Toxoplasma gondii* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa amplificando una secuencia del gen B1 de *Toxoplasma gondii*. Ensayó la técnica en 20 líquidos cefalorraquídeos de pacientes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* y encefalitis toxoplásmica demostrada, en nueve LCR de pacientes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* pero sin encefalitis toxoplásmica y en 4 LCR de pacientes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*. Detecta la presencia del ADN del parásito en 13 de los 20 pacientes con encefalitis toxoplásmica y no detecta la presencia en ninguno de los pacientes sin encefalitis (138). Brezin y cols. estudian la presencia de ADN del parásito en tejidos parafinados correspondientes a dos casos de toxoplasmosis ocular, en los dos casos se puede detectar la presencia de ADN. El límite de detección de la técnica se sitúa en 10 taquizoitos (139).

Grob y cols. estudian la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en muestras biológicas y clínicas, amplifican un fragmento de 634 bp del gen B1 de *Toxoplasma gondii* y detectan la presencia de 10 parásitos en 100 ul de muestra con gran cantidad de otras células. Recomiendan el empleo de proteinasa K en la extracción del ADN y encuentran resultados positivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa en 10 de 52 muestras clínicas de pacientes con toxoplasmosis activa (140).

Van de Ven y cols. comparan la reacción en cadena de la polimerasa frente a la microscopía, el cultivo celular y la inoculación a ratón. Estudian la presencia de *Toxoplasma gondii* en tejidos obtenidos postmortem de pacientes receptores de trasplante de médula ósea y toxoplasmosis cerebral y en niños infectados congénitamente. Detecta la presencia de *Toxoplasma gondii* en líquido cefalorraquídeo, biopsias cerebrales, corazón y músculo esquelético. Los resultados muestran que la reacción en cadena de la polimerasa detecta la presencia de ADN del parásito en todas las muestras positivas por inoculación a ratón excepto en una. La microscopía y el cultivo celular presentan una menor sensibilidad (141).

Lebech y cols. estudian la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en el líquido cefalorraquídeo de dos pacientes con encefalitis toxoplásmica demostrada por métodos habituales y en 11 pacientes sin encefalitis toxoplásmica. Realizan una doble amplificación y encuentran resultados positivos en los dos pacientes con encefalitis toxoplásmica comprobada, mientras que no detecta la presencia del ADN del parásito en los otros pacientes (142).

Johnson y cols. comparan la detección del ADN de *Toxoplasma gondii* mediante la reacción en cadena de la polimerasa con el cultivo celular y la inoculación a ratón. Realizan la comparación en muestras de tejido

provenientes de mujeres embarazadas, fetos, neonatos, pacientes con HIV y trasplantados con encefalitis toxoplásmica. Amplifican una secuencia del gen que codifica la proteína P30 del taquizoito. Encuentra más sensible la reacción en cadena de la polimerasa, pero señala en su trabajo que ha sufrido casos de contaminación por el ADN amplificado (143).

3.7.- Quimioterapia.

En cuanto a los estudios de quimioterapia realizados sobre *Toxoplasma gondii*, parten del tratamiento clásico. El régimen terapéutico clásico es la combinación de pirimetamina y sulfadiazina (o trisulfapirimidinas - sulfamerazina, sulfametazina), que son activos contra taquizoitos y son sinérgicos entre sí, sin embargo la forma quística es resistente a estos agentes.

La pirimetamina es liposoluble, se absorbe fácilmente del tracto gastrointestinal y tiene una vida media de 4-5 días, se alcanzan concentraciones en el LCR del 10-25% de la concentración plasmática. El régimen de ataque para los adultos es de 200 mg/día divididos en dos dosis durante 1 día, para los sujetos inmunocompetentes la pirimetamina se utiliza durante 2-4 semanas a dosis de 25-50 mg/día, para sujetos inmunodeprimidos se debe administrar durante 4-6 semanas, en sujetos con HIV se utiliza a mayores dosis (75-100 mg/día). Es un antagonista del ácido fólico, y el efecto colateral más común es la supresión relacionada con la dosis de la médula osea, este riesgo disminuye con la administración de ácido folínico. También se produce malestar gastrointestinal, cefaleas y un sabor desagradable en la boca.

La sulfadiazina se administra conjuntamente con la pirimetamina; la dosis de ataque es de 75 mg/kg hasta 4 g. después se administran 100 mg/kg/día hasta 8 mg/día divididos en dos dosis. El paciente debe tener un buen

volumen urinario para prevenir la cristaluria y la oliguria, a esto también contribuye la alcalinización de la orina con bicarbonato sódico. La dosis de mantenimiento para los pacientes con HIV es 500 mg por vía oral cada 6 horas.

La espiramicina es menos tóxica que la asociación pirimetamina/sulfadiazina y se utiliza en el tratamiento de las mujeres embarazadas, se administra por vía oral a dosis de 3 g/día divididos en 2 a 4 dosis.

En los últimos años se han realizado muchos trabajos in vitro y en modelos animales para establecer la eficacia antitoxoplásmica de nuevos compuestos, entre los grupos que se han evaluado está el de los inhibidores de la dihidrofolato reductasa, al que pertenece al pirimetamina, así:

Nguyen y cols. evalúan la utilidad de la asociación entre trimetoprim y sulfametoxazol en un modelo de toxoplasmosis murina con una cepa poco virulenta de *Toxoplasma gondii* y lo comparan con los fármacos utilizados clásicamente, en este modelo obtienen que tanto el cotrimoxazol como la asociación entre pirimetamina y sulfadiazina son más efectivos que la espiramicina. Ninguno de estos fármacos tiene actividad frente a la forma quística (144).

Nguyen y cols. evalúan la actividad del cotrimoxazol y la espiramicina en ratones gestantes infectadas con *Toxoplasma gondii* demostrando estadísticamente un mayor efecto del cotrimoxazol (145).

Harper y cols. evalúan la utilidad de 5 regímenes terapéuticos en monos inoculados oralmente con *Toxoplasma gondii*, todos los controles no tratados murieron, los 3 monos tratados con sulfametoxazol sobrevivieron, los cinco tratados con espiramicina murieron, los 4 tratados con la combinación de clindamicina y sulfadiazina sobrevivieron, al igual que los 5 tratados con pirimetamina y sulfadiazina y los 4 tratados con

cotrimoxazol, en los tratados con la asociación entre clindamicina y sulfadiazina aparecieron efectos adversos que produjeron la muerte de 3 monos (146).

Kovacs y cols. estudian la actividad antitoxoplásmica de otro inhibidor de la síntesis del ácido fólico, el trimetrexato, encuentran que inhibe la dihidrofolato reductasa de *Toxoplasma gondii* más intensamente que la pirimetamina y el trimetoprim, esto lo demuestran en modelos "in vitro" y en modelos de toxoplasmosis experimental en ratón (147).

Allegra y cols. también demuestran buena actividad antitoxoplásmica del trimetrexato, siendo entre 600 y 750 veces más efectivo que la pirimetamina, esto se demostró en estudios "in vivo" e "in vitro" (148).

Kovacs y cols. estudian la actividad antitoxoplásmica en un modelo "in vitro" de otro fármaco antifolato, el piritrexim, apareciendo entre 40 y 1000 veces más potente que el trimetoprim y la pirimetamina (149).

Derouin y cols estudian in vitro la actividad de tres sulfonamidas y cuatro inhibidores de la dihidrofolato reductasa tanto solos como en asociación; la sulfadiazina, sulfametoxazol y sulfisoxazol muestran buena actividad frente al parásito, siendo la dosis letal 50 menor para el sulfametoxazol y mayor para el sulfisoxazol, en cuanto a los antifolatos, la dosis letal 50 fue menor para pirimetamina seguido de trimetrexato, trimetoprim y la más alta fue para piritrexin (150).

Chang y cols evalúan la actividad de epiroprim, un inhibidor de la dihidrofolato reductasa tanto solo como en asociación con dapsona en un modelo murino de toxoplasmosis experimental y en un modelo "in vitro" de cultivo celular de macrófagos, "in vitro" se observa actividad del compuesto y el sinergismo con dapsona, aunque se produce solo tiene efectos parasitostáticos; en el modelo "in vivo", cuando se utilizan solas, la

dapsona y el epiroprim solamente protegen al 10% de los ratones, sin embargo, cuando se administran asociadas se protege al 100% de los ratones (151).

También se ha investigado intensamente en la actividad antitoxoplásmica de los antibióticos macrólidos, así:

Terragna y cols. evalúan la utilidad de la josamicina en un modelo de toxoplasmosis murina experimental tras inoculación de la cepa virulenta RH, esta no es eficaz (152).

Chan y cols. evalúan la actividad de la roxitromicina en un modelo murino del toxoplasmosis tras inoculación de taquizoitos de la cepa RH, si el comienzo de la quimioterapia era 24 horas antes de la inoculación sobreviven el 90% de los ratones, si se produce 2 horas postinoculación sobreviven el 80% de los ratones y si la terapia se inicia 24 horas postinoculación sobreviven el 50% de los ratones, se recuperan parásitos en el 20% de los ratones que sobreviven (153).

Chang y cols. evalúan la roxitromicina en modelos de toxoplasmosis experimental murina, obtienen que protege al 100% de los ratones inoculados intraperitonealmente con taquizoitos de la cepa RH tras la administración de dosis de 540 mg/kg durante 5 días por vía oral, en un modelo de infección intracerebral con la cepa C56 de *Toxoplasma gondii* disminuye el número de quistes presentes en el cerebro de los ratones, su actividad mejora con la administración conjunta de gamma interferon (154).

Luft y cols. evalúan la actividad toxoplásmica de la roxitromicina "in vitro" y en un modelo de toxoplasmosis experimental murina, protege el 80% de los ratones inoculados con la cepa RH tras administración dos horas postinoculación. Se aisló el parásito en el 35% de los ratones que sobrevivieron. En el modelo "in vitro" de cultivo celular de macrófagos peritoneales murinos,

La roxitromicina no mostró actividad (155). Chang y cols evalúan la actividad de la roxitromicina en un modelo de toxoplasmosis experimental murina, sobreviven entre el 50 y el 100% de los ratones en función de la dosis empleada en un tratamiento de 5 días. Se recuperó el parásito en un porcentaje de ratones que sobrevivieron que osciló entre el 25 y el 58% (156).

Hoffin y cols demuestran sinergismo entre la actividad de la roxitromicina y el gamma interferon en un modelo murino de encefalitis toxoplásmica (157).

Chang y cols. estudian la actividad de la espiramicina tanto "in vitro" como "in vivo", en modelo de toxoplasmosis experimental murina, demuestra un cierto efecto inhibitor del parásito, pero no consigue la erradicación del *Toxoplasma gondii* (158).

Chang evalúa la actividad antitoxoplásmica de otro nuevo macrólido, la claritromicina en un modelo de toxoplasmosis experimental murina, sobreviven el 100% de los ratones infectados, pero en el 60% de ellos persiste el parásito (159).

Araujo evalúa otro macrólido, la azitromicina, y demuestra que tras inoculación intraperitoneal de taquizoitos sobreviven el 100% de los ratones mientras que sobreviven el 80% de los inoculados intracerebralmente (160).

Chang y cols. comparan la actividad de cuatro macrólidos, roxitromicina, espiramicina, azitromicina y claritromicina en un modelo de toxoplasmosis in vitro, la dosis inhibitoria 50 es menor para la roxitromicina, seguida de azitromicina, claritromicina y la dosis mayor corresponde a la espiramicina, sin embargo no muestran actividad letal a una concentración de antibiótico cuatro veces superior y solo cuando se alcanza una concentración 8 veces superior, la roxitromicina adquiere una actividad parcial de destrucción de los taquizoitos (161).

Harris y cols. evalúan en un modelo in vitro la actividad de varios fármacos, demuestran que la pirimetamina es sinérgica con la sulfadiazina y que esta asociación tiene la misma actividad que la pirimetamina sola a mayores dosis, la espiramicina solamente es activa a dosis altas, la clindamicina no mostró actividad (162).

Chamberland y cols evalúan en un modelo "in vitro" la actividad de 24 antibióticos macrólidos, espiramicina y tilosina muestran actividad limitada, eritromicina y azitromicina muestran mejor actividad y desmycosina, diritromicina y roxitromicina no muestran actividad por este sistema, en general los macrólidos no producen la muerte del parásito pero afectan a su desarrollo (163).

Huskinson-Mark y cols. evalúan la actividad de varios antibióticos frente a la forma quística de *Toxoplasma gondii*, encuentran mejor actividad en la azitromicina y en la hidroxinaftoquinona 566C80 (atovacuna) (164).

Araujo y cols estudian el sinergismo entre la azitromicina y el gamma interferon en la toxoplasmosis murina, con azitromicina sola se protegen el 10% de los ratones, con gamma interferon solo no se protege a ningún ratón, mientras que con la asociación de ambos se protegen el 40% de los ratones (165).

Araujo y cols evalúan la actividad "in vivo" de azitromicina, roxitromicina y espiramicina, siendo la más activa la azitromicina, la concentración alcanzada en los tejidos es de 50 a 100 veces más alta que en suero (166).

Derouin y cols estudian el sinergismo entre la azitromicina y la pirimetamina o la sulfadiazina en un modelo de toxoplasmosis murina y demuestran la presencia de un potente sinergismo entre la azitromicina y cualquiera de los otros dos fármacos (167).

Araujo y cols demuestran la actividad sinérgica entre la azitromicina y la sulfadiazina en un modelo de

toxoplasmosis experimental murina, dosis ineficaces de ambos fármacos, son activas cuando se administran a la vez (168).

Alder y cols estudia la actividad de la asociación de claritromicina con minociclina o pirimetamina en un modelo de toxoplasmosis experimental murina, cualquiera de las dos asociaciones son tan efectivas como la asociación clásica de pirimetamina y sulfadiazina (169).

Dumas y cols. evalúan la actividad de la administración prolongada de azitromicina en un modelo murino de toxoplasmosis crónica, mediante la inoculación de quistes por vía intraperitoneal de una cepa moderadamente virulenta de *Toxoplasma gondii*, después de 1 mes de administración, todos los ratones sobrevivieron, mientras que en el grupo control murieron 19 de 25. Los ratones tratados con azitromicina mostraron menor inflamación cerebral (170).

Se ha investigado intensamente la actividad de la clindamicina frente a *Toxoplasma gondii*:

Terragna y cols. evalúan la utilidad de la clindamicina en un modelo de toxoplasmosis murina experimental tras inoculación de la cepa virulenta RH, la clindamicina se muestra efectiva en el 80% de los ratones (152).

Mack y cols estudian la eficacia antitoxoplásmica de varios agentes en un modelo de cultivo celular, encuentran que la asociación entre la sulfadiazina y la pirimetamina tiene mejores resultados que la pirimetamina sola y no encuentran ningún efecto cuando evalúan la clindamicina y el metronidazol (171).

Harris y cols. evalúan en un modelo "in vitro" la actividad de varios fármacos, demuestran que la pirimetamina es sinérgica con la sulfadiazina y que esta asociación tiene la misma actividad que la pirimetamina sola a mayores dosis, la espiamicina solamente es activa a dosis altas, la clindamicina y sus análogos el

metotrexato y la difluorometilornitina no mostraron actividad (162).

Piketty y cols. evalúan la actividad antitoxoplasmica de varios fármacos, estudiando la presencia de parásitos en sangre, pulmón y cerebro a distintos tiempos postinoculación, la administración de pirimetamina sola produjo la curación en 7 de 11 ratones pero se detecta la presencia del parásito hasta el día 6 postinoculación, cuando se administra asociada a sulfadiazina, no muere ningún ratón y no se detecta la presencia del parásito desde el día 1, la administración de clindamicina no evitó la muerte de todos los ratones, pero en la sangre de estos no se detectaba la presencia del parásito (172).

Filice y cols. estudian la actividad de la clindamicina en un modelo murino de neumonía producida por reactivación de una infección por *Toxoplasma gondii* en ratón. Si se utiliza como tratamiento profiláctico reduce la mortalidad en un 44%, pero es menos efectiva cuando ya se ha producido la reactivación de la neumonía (173).

Pfefferkorn y cols estudian la actividad de la clindamicina en un modelo in vitro, mostrándose activa a altas dosis (174).

También se ha evaluado la actividad de las tetraciclinas, así:

Chang y cols. evalúan la actividad antitoxoplásmica "in vitro" e "in vivo" de una tetraciclina, la doxiciclina, muestra actividad tanto sola como asociada a pirimetamina (175).

Chang y cols estudia la actividad de otra tetraciclina, la minociclina, en un modelo de toxoplasmosis experimental murina, sobreviven el 100% de los ratones infectados, pero en el 60% de ellos persiste el parásito, mientras que con la pirimetamina no persiste el parásito en ninguno de ellos. En ratones infectados

crónicamente se observa reducción en el número de quistes (176).

Alder y cols estudia la actividad de la asociación de claritromicina con minociclina o pirimetamina en un modelo de toxoplasmosis experimental murina, cualquiera de las dos asociaciones son tan efectivas como la asociación clásica de pirimetamina y sulfadiazina (169).

En los últimos años ha surgido la atovacuona, sobre el que se ha investigado intensamente para descubrir su verdadera utilidad sobre el taquizoitos y sobre la forma quística de *Toxoplasma gondii*, así:

Huskinson-Mark y cols. evalúan la actividad de varios antibióticos frente a la forma quística de *Toxoplasma gondii*, encuentran mejor actividad en la azitromicina y en la hidroxinaphtoquinona 566C80 (atovacuona) (164).

Araujo y cols estudian la actividad antitoxoplásmica de la atovacuona contra formas quísticas y contra taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en modelos "in vivo" e "in vitro", demuestran la disminución en el número de quistes en casos de infección crónica y la supervivencia del 80% de los ratones inoculados con 7 cepas distintas del parásito, 5 de ellas aisladas de pacientes con SIDA (177).

Hudson y cols. estudian la actividad de la atovacuona contra varios parásitos causantes de infecciones oportunistas en el SIDA y frente a *Plasmodium spp.* En la evaluación frente a *Toxoplasma gondii* en ratones obtiene buena actividad. (178)

Araujo y cols. estudian la actividad de la atovacuona frente a la forma quística de *Toxoplasma gondii* en modelos "in vitro" e "in vivo", en los ensayos in vitro se observa la pérdida de viabilidad de los quistes y en los ensayos "in vivo" se observa la reducción en el número de quistes y en la reacción inflamatoria que presentan ya a los 5 días de

tratamiento, pero se observa la máxima eficacia a las 4 semanas de iniciarlo (179).

Gutteridge evalúa la actividad de la atovacuona frente a parásitos oportunistas del SIDA encontrando que es activo frente a *Toxoplasma gondii* (180).

Araujo y cols. estudian el sinergismo entre atovacuona y los tratamientos clásicos de la toxoplasmosis, señalan que la actividad de la atovacuona se incrementa sustancialmente cuando se asocia a pirimetamina o sulfadiazina (181).

También se ha evaluado la utilidad del gamma interferon en el tratamiento de la toxoplasmosis, así:

Hoffin y cols demuestran sinergismo entre la actividad de la roxitromicina y el gamma interferon en un modelo murino de encefalitis toxoplásmica (157).

Suzuki y cols. estudian la utilidad del gamma interferon en el tratamiento de la encefalitis toxoplásmica experimental en ratón, este reduce los focos de células inflamatorias y el número de taquizoitos en el cerebro, la actividad es dosis dependiente (182).

Araujo y cols estudian el sinergismo entre la azitromicina y el gamma interferon en la toxoplasmosis murina, con azitromicina sola se protegen el 10% de los ratones, con gamma interferon solo no se protege a ningún ratón, mientras que con la asociación de ambos se protegen el 40% de los ratones (165).

También se ha evaluado la actividad antitoxoplásmica de otros compuestos, así:

Bakhtari y cols. estudian la actividad de robenidina sobre formas quísticas de *Toxoplasma gondii* en un modelo murino, ya sola o en asociación con pirimetamina o sulfadoxina no demostrando actividad sobre esta forma parasitaria (183).

Ferrante y cols evalúan en un modelo de toxoplasmosis experimental murina la actividad de la sinefungina utilizada anteriormente por sus propiedades

antifúngicas y antivíricas, cuando el tratamiento se inicia dos días antes de la inoculación se prolonga la vida de los ratones, sobre todo cuando se emplean dosis altas del fármaco (184).

Harris y cols. evalúan en un modelo "in vitro" la actividad de varios fármacos, demuestran que la pirimetamina es sinérgica con la sulfadiazina y que esta asociación tiene la misma actividad que la pirimetamina sola a mayores dosis, la espiramicina solamente es activa a dosis altas, el spirogermanium, un compuesto experimentalmente utilizado como neoplásico mostró actividad a concentraciones tóxicas para el sistema y el 5-fluorouracilo se mostró eficaz a dosis bajas demostrándose sinergia con la pirimetamina (162).

Israelsky y cols. estudian la interacción entre la zidovudina y la pirimetamina, encontrando efectos antagónicos, también afecta al sinergismo entre la pirimetamina y la sulfadiazina, tanto en modelos "in vitro" como en ratón (185).

Chang y cols. estudian la actividad antitoxoplásmica de tres nuevos 1,2,4-trioxanos (pentatroxano, tiahexatroxano y hexatroxano), en un modelo in vitro, muestran actividad semejante a la pirimetamina frente a parásitos intracelulares, pero no muestran actividad frente a parásitos extracelulares (186).

Furet y cols estudian la actividad de las quinolonas y señalan su falta de actividad frente a *Toxoplasma gondii*, mientras que se muestran efectivas frente a otros parásitos como *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.* y *Trypanosoma spp.* (187)

Derouin y cols. evalúan la actividad antitoxoplásmica de la dapsona tanto sola como en asociación con pirimetamina, en las pruebas "in vitro" muestra buena actividad, sin embargo en los ensayos "in vivo" los resultados cuando se emplea sola son malos ya que solamente retrasan la muerte de los ratones, mientras

que los resultados son buenos en combinación con pirimetamina (188).

Lindsay y cols. estudian la actividad antitoxoplásmica de la pentamidina y 5 análogos en un método "in vitro" de cultivo celular, se observa una reducción estadísticamente significativa en el número de taquizoitos (189).

Lindsay y cols. estudian la actividad antitoxoplásmica del diclazuril, un bencenoacetnitrilo, en cultivo celular se consigue más de un 99% de reducción de taquizoitos; en los ensayos "in vivo" se obtuvo protección de los ratones (190).

Araujo y cols. estudian la actividad de la rifabutina en un modelo de toxoplasmosis murina, en función de la dosis empleada se consigue la protección de entre el 40 y el 100% de los ratones; si se administra dosis no efectivas de rifabutina con dosis no efectivas de pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina o atovacuona se consigue protección por el efecto sinérgico que se produce (191).

4.- MATERIAL Y METODOS

4.1.- Aislamiento y mantenimiento de cepas de *Toxoplasma gondii*.

4.1.1.- Aislamiento y mantenimiento de cepas cistógenas.

4.1.1.1.- Aislamiento de cepas cistógenas de *Toxoplasma gondii* a partir de cerebro de gato.

- * Extracción del cerebro del gato.
- * Homogeneización del cerebro con una solución de PBS (pH = 7,2). * Se prepara una solución de sílice coloidal (Percoll): Se añade 10 ml de una solución concentrada 10x de medio de cultivo mínimo esencial de Eagle a 90 ml de la solución de Percoll. Se neutraliza el pH con ácido clorhídrico.
- * Se añade: 5 ml de homogeneizado de cerebro, 8 ml de PBS/Tween y 6,5 ml de la solución de Percoll previamente preparada. Al final se obtiene una concentración de 30% de Percoll.
- * Mezclar bien y dejar reposar de 20 a 30 minutos.
- * Se pipetea al fondo del tubo 1,5 ml de la solución de Percoll al 90% para obtener dos fases.
- * Se centrifuga durante 15 minutos a 2700-3000 rpm (3500-4200 g).
- * Los quistes de *Toxoplasma gondii* flotan en la parte superior donde son recogidos y tras visualización al microscopio se inoculan por vía oral con una sonda buco-gástrica a un lote de ratones.
- * Al cabo de 15 días se extrae sangre a los ratones y se realiza una serología frente a *Toxoplasma gondii* mediante microaglutinación (BioMerieux).
- * Si la serología es negativa, se sacrifican los ratones y se realiza un pase ciego de los cerebros a otro lote de ratones, y si tras la segunda inoculación la serología sigue siendo negativa y no se visualizan quistes en los cerebros, se considera que no se han aislado quistes de

Toxoplasma gondii.

* Si la serología frente a *Toxoplasma gondii* aparece positiva, se confirma la presencia de quistes mediante la visualización de los quistes en tejido cerebral de los ratones (192).

* Se han empleado en todas las pruebas ratones de la cepa NMRI.

4.1.1.2.- Mantenimiento de cepas cistógenas

* Extraer varios cerebros de un lote de ratones infectados con *Toxoplasma gondii* con infección confirmada mediante serología.

* Macerar los cerebros en un recipiente estéril con suero fisiológico estéril.

* Inocular el macerado por vía oral, 0,4 ml/ratón a un lote de ratones sanos.

* Al cabo de 15 días confirmar serológicamente la presencia de infección.

* El pase debe realizarse cada 6 meses.

4.1.2.- Mantenimiento de la cepa RH

La cepa RH se mantiene congelada en nitrógeno líquido en una solución de medio mínimo esencial de Eagle, con un 25% de suero fetal bovino y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

4.1.2.1.- Proceso de descongelación:

* Extraer el vial e introducirlo en un baño de agua a 37°C para que la descongelación sea lo más rápida posible.

* Inoculación por vía intraperitoneal de 0,2 ml de la solución congelada a un ratón.

* Observación visual diaria del ratón, en función de la cantidad de toxoplasmas vivos inoculados hasta observar la manifestación clínica de la enfermedad, se producirá en un período comprendido entre 5 y 15 días.

4.1.2.2.- Mantenimiento de la cepa:

* Se inocular 1 ml de PBS estéril al peritoneo del ratón

infectado, que ha sido sacrificado momentos antes, cuando se han observado manifestaciones graves de la enfermedad.

* Se extrae 0,3 ml de líquido peritoneal y se diluye en 10 ml de una solución estéril de PBS a la que se añade una solución de antibiótico que proporciona una solución final de 100 U/ml de penicilina y 100 mcg/ ml de estreptomycin . Se realiza una observación microscópica para descartar la presencia de contaminaciones tanto bacterianas como fúngicas.

* Inoculación por vía intraperitoneal de 0,2 ml de la solución anterior a ratones sanos.

* Al cabo de 3 días el cuadro clínico de la enfermedad hace necesario la realización de un nuevo pase.

* Todas las cepas de ratones utilizadas fueron igualmente sensibles y no hubo tampoco diferencias motivadas por la edad o el sexo de los ratones.

4.1.2.3.- Congelación de la cepa:

* Se extrae líquido peritoneal de ratón con síntomas clínicos de la enfermedad y se mezcla 1:1 con una solución de congelación descrita anteriormente.

* El proceso de congelación obtiene mejores resultados si se realiza con congelación gradual de 1°C/minuto (147), lo que se realiza bien con el sistema de congelación gradual (NICCOOL LM10).

4.2.- Establecimiento de modelos animales de toxoplasmosis experimental

4.2.1.- Patrón de referencia:

4.2.1.1.- Primoinfección por *Toxoplasma gondii*:

Tras la inoculación de taquizoitos de la cepa RH por vía peritoneal se producía la muerte de los ratones y se visualizaban en el líquido peritoneal de los mismos abundantes taquizoitos.

4.2.1.2.- Infección crónica:

Tras la inoculación de quistes de tejido cerebral

de la cepa 868 se producía respuesta serológica en los ratones y en el cerebro se visualizaban quistes tisulares de *Toxoplasma gondii*.

4.2.1.3.- Infección crónica reactivada:

Tras la confirmación de infección crónica por los procedimientos antes descritos, al administrar tratamiento inmunosupresor (véase más adelante) se produce la muerte de los ratones y en el cerebro de los mismos se observan lesiones compatibles con toxoplasmosis aguda.

4.2.2.- Modelo de primoinfección por *Toxoplasma gondii* con síntomas clínicos en sujeto inmunocompetente.

* Inoculación vía intraperitoneal de 200 taquizoitos de la cepa virulenta RH. La muerte de los ratones se produce al cabo de 8 días.

* Según hemos confirmado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General y Universitario de Elche, existe afectación sistémica de muchos órganos con cuadros similares a los casos de toxoplasmosis diseminada en inmunodeprimidos.

* Se realizó extracción de suero, sangre periférica y masa cerebral los días 1, 3, 5 y 7 postinoculación. Estas muestras fueron conservadas a -70°C hasta su procesamiento.

4.2.3.- Modelo de infección crónica asintomática por *Toxoplasma gondii* en sujeto inmunocompetente.

* Inoculación vía oral de 50 quistes de la cepa 868 de *Toxoplasma gondii* (cepa no virulenta para el ratón obtenida de un cerebro de gato) a un grupo de ratones indemnes.

* Extracción periódica de orina, suero y sangre periférica durante dos meses. Al cabo de ese tiempo los ratones no presentaban signos ni síntomas de enfermedad.

* Estudios del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General y Universitario de Elche ha demostrado la presencia de quistes de *Toxoplasma gondii* en tejido cerebral.

4.2.4.- Modelo de toxoplasmosis crónica reactivada en sujeto inmunodeprimido.

* A ratones con infección crónica por la cepa 868 de *Toxoplasma gondii* (no virulenta) se les sometió al siguiente proceso de inmunodepresión:

- Ciclosporina: Administración subcutánea de 150 mg/kg de peso dos veces a la semana.

- Sal sódica del ester fosfórico de la Di-(17 hidroxicorticosterona 21): Administración subcutánea de 2,5 mg/ratón dos veces al día.

- Anticuerpos monoclonales anti linfocito T de ratón (Sigma): Inoculación una vez a la semana de 500 ug/ratón.

- Para prevenir infecciones bacterianas se administró vía oral ciprofloxacina (antibiótico de amplio espectro, que en estudios llevados a cabo por nosotros en quimioterapia de *Toxoplasma gondii* no demuestra actividad frente a dicho parásito). (193)

* Se realizó extracción de suero, sangre periférica y cerebro durante el proceso de inmunodepresión hasta la muerte de los ratones.

* El Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General y Universitario de Elche ha demostrado la presencia de lesiones propias de toxoplasmosis reactivada.

4.3.- Grupos de pacientes estudiados

4.3.1.- Patrón de referencia:

* Como patrón de referencia de encefalitis toxoplásmica se emplea la presencia de imágenes sugerentes en el TAC y la respuesta a los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la encefalitis toxoplásmica.

4.3.2.- Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos Ig G pero sin Ig M frente a *Toxoplasma gondii*.

* Se seleccionaron 70 pacientes inmunocompetentes con anticuerpos Ig G positivos frente a *Toxoplasma gondii* y anticuerpos Ig M negativos. Estos pacientes fueron elegidos consecutivamente entre los pacientes a los que se les realizaba una punción lumbar por cualquier causa y cumplían los siguientes requisitos: inmunocompetentes, adultos, presencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* por el método de microaglutinación (BioMerieux) y ausencia de Ig M específica (ISAGA, BioMerieux)

4.3.3.- Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*.

* 70 pacientes inmunocompetentes con anticuerpos Ig G e IgM negativos frente a *Toxoplasma gondii*. Estos pacientes fueron elegidos consecutivamente entre los pacientes a los que se les realizaba una punción lumbar por cualquier causa y cumplían los siguientes requisitos: inmunocompetentes, adultos, ausencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* por el método de microaglutinación (BioMerieux) y ausencia de Ig M específica (ISAGA, BioMerieux)

4.3.4.- Pacientes inmunodeprimidos con afectación del sistema nervioso central por otras causas distintas a la encefalitis toxoplásmica.

* 63 pacientes inmunodeprimidos con lesiones cerebrales de causa distinta a encefalitis toxoplásmica. Estos pacientes fueron elegidos consecutivamente entre los pacientes a los que se les realizaba una punción lumbar y cumplían los siguientes requisitos: HIV, adultos, presentar afectación del sistema nervioso central por causa distinta a la encefalitis toxoplásmica.

4.3.5.- Pacientes inmunodeprimidos con lesiones cerebrales producidas por encefalitis toxoplásmica.

* 16 pacientes inmunodeprimidos con lesiones cerebrales producidas por encefalitis toxoplásmica. Estos pacientes fueron elegidos consecutivamente entre los pacientes a los que se les realizaba una punción lumbar y cumplían los siguientes requisitos: HIV, adultos, presentar afectación del sistema nervioso central por encefalitis toxoplásmica.

4.3.5.1.- Con tratamiento específico previo.

* 5 de estos pacientes cuando se les realizó la extracción de líquido cefalorraquídeo llevaban instaurada terapia antitoxoplásmica

4.3.5.2.- Sin tratamiento específico previo.

* 11 de estos pacientes no recibían terapia antitoxoplásmica en el momento de extracción del líquido cefalorraquídeo.

4.4.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de antígenos circulantes.

4.4.1.- Estandarización de las técnicas.

4.4.1.1.- Purificación de antígenos de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*:

Separamos los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* mediante la utilización de lectina que aglutina las células presentes en el líquido peritoneal y no aglutina los taquizoitos, que son separados por filtración.

* Extracción de líquido peritoneal de ratones inoculados con taquizoitos de la cepa RH tres días antes, mediante dos lavados con una solución estéril de PBS.

* Centrifugación durante 10 minutos a temperatura ambiente durante 10 minutos.

* Resuspender el sedimento en 15 ml de 0,15M de ClNa.

* Añadir lectina de *Phaseolus vulgaris* (Sigma) a una concentración final de 0,04% peso/volumen.

- * Incubar 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.
- * Centrifugar igual que antes.
- * Resuspender los acúmulos de células en 15 ml de la solución salina anterior.
- * Filtrar a través de un filtro de algodón de nylon (300 mg), donde quedaran retenidos los acúmulos de células mientras que los taquizoitos atraviesan el filtro y son recogidos.
- * Realizar tres lavados con solución salina para eliminar restos de líquido peritoneal.
- * Los taquizoitos purificados se resuspenden en agua bidestilada y se romper mediante sonicación. Tras una centrifugación de 3000 rpm durante 15 minutos para eliminar los restos no sonicados, los antígenos fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta su inoculación a los animales (194).

4.4.1.2.- Inoculación de los animales de experimentación y obtención de los sueros hiperinmunes.

Se realizó la inoculación vía subcutánea en varios sitios del animal de antígenos purificados de *Toxoplasma gondii* en emulsión con adyuvante incompleto de Freund para aumentar la respuesta inmunológica.

Tras inoculación semanal durante 4 semanas, al cabo de 6 semanas se realizó la extracción de sangre mediante punción cardiaca. Los sueros hiperinmunes se mantuvieron congelados a -20°C hasta su utilización.

4.4.1.3.- Purificación de los anticuerpos hiperinmunes:

Se pretende separar las inmunoglobulinas del resto de los componentes del suero.

- * Dilución del suero en proporción 1:3 con tampon acetato 60 mM (pH=4).
- * Ajustar a pH=4,8 y dejar 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.

- * Añadir ácido caprílico (ácido octanoico) en relación 1,1 ml para 100 ml de la dilución anterior.
- * Añadir el caprilato muy lentamente, en agitación vigorosa y dejar 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- * Centrifugar a 4°C, 10000 g durante 30 minutos. Se recupera el sobrenadante filtrándolo por membrana de celulosa de Millipore, manteniendo en hielo durante todo el proceso de filtración. El filtrado debe ser transparente. Si no lo es, centrifugamos 15 minutos más.
- * Neutralizar a pH= 7,2-7,4.
- * Para la precipitación con sulfato amónico, añadimos sulfato amónico saturado gota a gota, en un volumen igual al filtrado.
- * Agitar 20-30 minutos a temperatura ambiente.
- * Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 30 minutos.
- * Eliminar el sobrenadante y el precipitado blanco se diluye con sulfato amónico al 50% hasta el volumen inicial de suero.
- * Los anticuerpos precipitados pueden almacenarse a 4°C hasta su uso.
- * Antes de su uso, se centrifuga a 4°C a 5000 rpm durante 10 minutos.
- * Se elimina el sobrenadante.
- * Se resuspende en igual volumen de PBS y se dializa frente a PBS durante 2 días, realizando dos cambios de PBS.
- * La concentración final de anticuerpos se mide mediante la lectura fotométrica a una absorbancia de 280 nm. Dividiendo por 1,40 se obtiene la concentración en mcg/ml de anticuerpos (195).

4.4.1.4.- Optimización de los métodos de ELISA.

- * Concentraciones óptimas de los distintos componentes de la reacción.
- * Reproducibilidad de la técnica.
- * Límite de sensibilidad

4.4.2.- Diseño de métodos de ELISA para la detección de antígenos circulantes.

4.4.2.1.- Detección de antígenos circulantes en sueros de ratón.

- * Fijación de los anticuerpos hiperinmunes de conejo a la placa de ELISA: Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampón carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.
- * Incubación durante 24 horas a temperatura ambiente de 100 ul de suero sin diluir.
- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.
- * Incubación durante 2 horas a 37°C con anticuerpos hiperinmunes de cobaya .
- * Tres lavados con la solución anterior.
- * Incubación con anticuerpos anticobaya marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.4.2.2.- Detección de antígenos circulantes en sueros humanos.

- * Fijación de los anticuerpos hiperinmunes de conejo a la placa de ELISA: Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampón carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para

eliminar los restos no fijados.

- * Incubación durante 24 horas a temperatura ambiente de 100 ul de suero sin diluir.

- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.

- * Incubación durante 2 horas a 37°C con anticuerpos hiperinmunes de cobaya .

- * Tres lavados con la solución anterior.

- * Incubación con anticuerpos anticobaya marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.

- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.

- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.4.2.3.- Detección de antígenos circulantes en líquido cefalorraquídeo humano.

- * Fijación de los anticuerpos hiperinmunes de conejo a la placa de ELISA: Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampón carbonato (pH=9,6).

- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.

- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)

- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.

- * Incubación durante 24 horas a temperatura ambiente de 100 ul de LCR sin diluir.

- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.

- * Incubación durante 2 horas a 37°C con anticuerpos hiperinmunes de cobaya .

- * Tres lavados con la solución anterior.

- * Incubación con anticuerpos anticobaya marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.

- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.

- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II

(196, 197, 198, 199, 200, 201, 202).

4.5.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de anticuerpos

4.5.1.- Detección de anticuerpos tipo Ig G

4.5.1.1.- En ratones

- * Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.
- * Incubación durante 1 hora a 37°C de 100 ul de suero diluido 1/250.
- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.
- * Incubación con anticuerpos antiIg G de ratón marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.5.1.2.- En humanos

4.5.1.2.1.- Método de ELISA

- * Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para

eliminar los restos no fijados.

* Incubación durante 1 hora a 37°C de 100 ul de suero diluido 1/250.

* Tres lavados con la solución de lavado anterior.

* Incubación con anticuerpos antiIg G humanos marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.

* Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.

* Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.5.1.2.2.- Microaglutinación

* Añadir 25 ul de suero diluido desde 1/8 hasta 1/1250 en microplacas en forma de V

* Añadir 25 ul de antígenos de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux)

* Incubar toda la noche a temperatura ambiente.

* Observar la presencia de aglutinación

4.5.2.- Detección de anticuerpos tipo Ig M

4.5.2.1.- En ratones.

* Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).

* Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.

* Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)

* Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.

* Los sueros se incuban con anti IgG de cabra (Berhing) durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar los falsos positivos producidos por la presencia de factor reumatoide, o los falsos negativos producidos por el exceso de Ig G.

* Incubación durante 1 hora a 37°C de 100 ul de suero diluido 1/100.

- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.
- * Incubación con anticuerpos antiIg M de ratón marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.5.2.2.- En humanos.

- * Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.
- * Los sueros se incuban con anti IgG de cabra (Berhing) durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar los falsos positivos producidos por la presencia de factor reumatoide, o los falsos negativos producidos por el exceso de Ig G.
- * Incubación durante 1 hora a 37°C de 100 ul de suero diluido 1/100.
- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.
- * Incubación con anticuerpos antiIg M humana marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.5.3.- Detección de anticuerpos tipo Ig A

4.5.3.1.- En ratones.

- * Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).

- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.
- * Incubación durante 1 hora a 37°C de 100 ul de suero diluido 1/100.
- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.
- * Incubación con anticuerpos antiIg A de ratón marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.5.3.2.- En humanos

- * Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.
- * Incubación durante 1 hora a 37°C de 100 ul de suero diluido 1/100.
- * Tres lavados con la solución de lavado anterior.
- * Incubación con anticuerpos antiIg A humana marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.6.- Estudio de la avidéz de la Ig G.

4.6.1.- Estudio de la avidéz de la Ig G en ratones

- * Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.
- * Diluir cada suero a ensayar a 1:50, 1:200: 1:800, 1:3200, 1:12800.
- * Los 8 pocillos de cada columna de la placa son utilizados para el mismo suero, ya que hay que poner en los pocillos de la A a la D 100 ul de las diluciones de 1:200 a 1: 12800 y en los pocillos de la E a la H las diluciones de 1:50 a 1: 3200.
- * Incubar 60 minutos a 37°C.
- * Vaciar las placas y añadir a las filas de la A a la D 150 ul de una solución de lavado formada con PBS y 0,05% de Tween 20 y a las filas de la E a la H añadir 150 ul de una solución de lavado igual a la anterior con 4M de urea.
- * Dejar a temperatura ambiente 5 minutos.
- * Repetir el mismo procedimiento de lavado 2 veces más.
- * Incubación con anticuerpos antiIg G de ratón marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.6.2.- Estudio de la avidéz de la Ig G en humanos

- * Fijación de los taquizoitos formolados de *Toxoplasma gondii* (BioMerieux): Mediante la incubación a 4°C durante toda la noche en tampon carbonato (pH=9,6).
- * Lavado con PBS con 0,05% de Tween 20 para eliminar los restos no fijados.
- * Postapizado de las placas para eliminar reacciones inespecíficas: Incubación a 37°C durante una hora de 250 ul de PBS con 0,01% de albúmina sérica bovina (Sigma)
- * Lavado con la solución de lavado anterior para eliminar los restos no fijados.
- * Diluir cada suero a ensayar a 1:50, 1:200: 1:800, 1:3200, 1:12800.
- * Los 8 pocillos de cada columna de la placa son utilizados para el mismo suero, ya que hay que poner en los pocillos de la A a la D 100 ul de las diluciones de 1:200 a 1: 12800 y en los pocillos de la E a la H las diluciones de 1:50 a 1: 3200.
- * Incubar 60 minutos a 37°C.
- * Vaciar las placas y añadir a las filas de la A a la D 150 ul de una solución de lavado formada con PBS y 0,05% de Tween 20 y a las filas de la E a la H añadir 150 ul de una solución de lavado igual a la anterior con 4M de urea.
- * Dejar a temperatura ambiente 5 minutos.
- * Repetir el mismo procedimiento de lavado 2 veces más.
- * Incubación con anticuerpos antiIg G humanos marcados con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C.
- * Revelado del ELISA: Se utiliza TMB y peróxido de hidrógeno, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2M.
- * Lectura a 450 nm en un fotómetro Berhing Processor II.

4.6.3.- Interpretación de resultados

- * Para la interpretación de resultados se realiza una gráfica en papel semilogarítmico. En el eje de abscisas se representan las diluciones del suero, entre cada

dilución de suero debe haber una distancia de 40 mm, en el eje de ordenadas se representa la absorbancia medida por el lector de ELISA.

* Se traza una línea paralela al eje de abscisas que corte al eje de ordenadas a una absorbancia de 200 unidades

* Medir la distancia entre los puntos de ambas curvas que cortan a la recta antes dibujada.

* En función de la distancia que los separan se calcula la avidéz de los anticuerpos, según la tabla adjunta .

Distancia (mm)	Avidéz (%)
1	96,6
10	70,7
20	50,0
30	35,4
40	25,0
50	17,7
60	12,5
70	8,8
80	6,3
90	4,4
100	3,1
110	2,2
120	1,6
130	1,1
140	0,8
150	0,6

4.7.- Detección del ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

4.7.1.- Optimización de los procedimientos de extracción del ADN.

4.7.1.1.- En muestras de sangre periférica.

4.7.1.1.1.- Proteinasa K, lisis alcalina, extracción fenol/cloroformo

- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 300 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K.
- * Incubar 3 horas a 56°C.
- * Añadir 200 ul de solución de lisis (0,1M NaOH, 2M ClNa, 0,5% SDS) e incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Añadir 500 ul de fenol/cloroformo (24:1) y agitar.
- * Centrifugar a 13000 g durante 10 minutos
- * Retirar la parte acuosa (la de arriba) y añadirla en otro volumen igual de fenol/cloroformo
- * Agitar y centrifugar a 13000 g durante 10 minutos.
- * Retirar la parte acuosa (la de arriba).
- * Añadir isopropanol (0,6:1)
- * Dejar a -70°C al menos 1 hora.
- * Centrifugar a 13000g durante 15 minutos
- * Añadir 500 ul de etanol 70 y agitar
- * Centrifugar a 13000g durante 5 minutos
- * Retirar el sobrenadante y volver a añadir etanol 70 sobre el precipitado.
- * Retirar el sobrenadante y dejar a 42°C hasta que se consiga la completa evaporación del etanol.
- * resuspender el precipitado en 100 ul de agua destilada estéril y calentar a 65°C durante una hora hasta conseguir la completa disolución del ADN.
- * Congelar a -20°C para evitar degradación

4.7.1.1.2.- Proteinasa K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean.

- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 300 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K.
- * Incubar 3 horas a 56°C.
- * Añadir 200 ul de solución de lisis (0,1M NaOH, 2M ClNa, 0,5% SDS) e incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Neutralizar con HCl y comprobar que el pH es de 7
- * Añadir 1 ml de NaI
- * Agitar GLASSMILK en un vortex y cuando la resina esté completamente resuspendida, añadir 5 ul.
- * Dejar reposar 15 minutos agitando de vez en cuando.
- * Pasar el contenido al filtro y centrifugar 15 segundos.
- * Añadir al filtro 500 ul de la solución de lavado.
- * Centrifugar 30 segundos y repetir el lavado.
- * Añadir 500 ul al filtro de alcohol 80 y centrifugar 1 minuto.
- * Poner el filtro en un tubo limpio y añadir 50 ul de agua destilada caliente y centrifugar 30 segundos.
- * Volver a repetir el paso en el mismo tubo.
- * En el fondo del tubo está el ADN disuelto en el agua, que congelaremos a -20°C para evitar su alteración.

4.7.1.1.3.- *Proteinasa K, lisis alcalina*

- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 300 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K.
- * Incubar 3 horas a 56°C.
- * Añadir 200 ul de solución de lisis (0,1M NaOH, 2M ClNa, 0,5% SDS) e incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Congelar a -20°C para evitar la alteración del ADN.

4.7.1.1.4.- *EDTA y hervir*

- * A 1,5 ml de sangre añadir 0,375 ml de 0,1M EDTA pH(8), formaldehido 0,5%.
- * Centrifugar a 13000g durante 15 minutos
- * Retirar el sobrenadante.

- * Añadir 1 ml de 1 mM EDTA pH(8)
- * Centrifugar a 13000 g durante 10 minutos
- * Retirar el sobrenadante y añadir 1 ml de agua destilada estéril.
- * Retirar el sobrenadante.
- * Volver a realizar el lavado con agua dos veces más
- * Retirar el último sobrenadante y resuspender el sedimento en 100 ul de agua destilada estéril y calentar 10 minutos a 100°C
- * Guardar el sobrenadante a -20°C para evitar la degradación del ADN

4.7.1.1.5.- *PBS y hervir*

- * Centrifugar a 13000g durante 15 minutos.
- * Retirar el sobrenadante.
- * Añadir 1 ml de PBS estéril
- * Centrifugar 13000g durante 15 minutos
- * Volver a realizar el lavado con PBS dos veces más
- * Retirar el sobrenadante y añadir 100 ul de agua destilada estéril y calentar a 100°C durante 10 minutos.
- * Guardar el sobrenadante a -20°C para evitar la degradación del ADN

4.7.1.1.6.- *Separación de leucocitos con ISOLYMPH, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.*

- * Mezclar la sangre entera con igual cantidad de suero fisiológico.
- * Poner en otro frasco la mitad de volumen de ISOLYMPH y añadir lentamente, dejando resbalar por las paredes la sangre sobre el líquido de extracción.
- * Centrifugar 2000 rpm durante 20 minutos.
- * Retirar la interfase donde aparecen los leucocitos.
- * Añadir 1 ml de PBS estéril
- * Centrifugar a 13000g durante 10 minutos
- * Volver a realizar dos veces más los lavados con PBS.
- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante

- * Añadir 300 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K.
 - * Incubar 3 horas a 56°C.
 - * Añadir 200 ul de solución de lisis (0,1M NaOH, 2M ClNa, 0,5% SDS) e incubar a 100°C durante 10 minutos
 - * Añadir 500 ul de fenol/cloroformo (24:1) y agitar.
 - * Centrifugar a 13000 g durante 10 minutos
 - * Retirar la parte acuosa (la de arriba) y añadirla en otro volumen igual de fenol/cloroformo
 - * Agitar y centrifugar a 13000 g durante 10 minutos.
 - * Retirar la parte acuosa (la de arriba).
 - * Añadir isopropanol (0,6:1)
 - * Dejar a -70°C al menos 1 hora.
 - * Centrifugar a 13000g durante 15 minutos
 - * Añadir 500 ul de etanol 70 y agitar
 - * Centrifugar a 13000g durante 5 minutos
 - * Retirar el sobrenadante y volver a añadir etanol 70 sobre el precipitado.
 - * Retirar el sobrenadante y dejar a 42°C hasta que se consiga la completa evaporación del etanol.
 - * resuspender el precipitado en 100 ul de agua destilada estéril y calentar a 65°C durante una hora hasta conseguir la completa disolución del ADN.
 - * Congelar a -20°C para evitar degradación
- 4.7.1.1.7.- *Separación de leucocitos con ISOLYMPH, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean.*
- * Mezclar la sangre entera con igual cantidad de suero fisiológico.
 - * Poner en otro frasco la mitad de volumen de ISOLYMPH y añadir lentamente, dejando resbalar por las paredes la sangre sobre el líquido de extracción.
 - * Centrifugar 2000 rpm durante 20 minutos.
 - * Retirar la interfase donde aparecen los leucocitos.
 - * Añadir 1 ml de PBS estéril
 - * Centrifugar a 13000g durante 10 minutos

- * Volver a realizar dos veces más los lavados con PBS.
- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 300 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K.
- * Incubar 3 horas a 56°C.
- * Añadir 200 ul de solución de lisis (0,1M NaOH, 2M ClNa, 0,5% SDS) e incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Neutralizar con HCl y comprobar que el pH es de 7
- * Añadir 1 ml de NaI
- * Agitar GLASMILK en un vortex y cuando la resina esté completamente resuspendida, añadir 5 ul.
- * Dejar reposar 15 minutos agitando de vez en cuando.
- * Pasar el contenido al filtro y centrifugar 15 segundos.
- * Añadir al filtro 500 ul de la solución de lavado.
- * Centrifugar 30 segundos y repetir el lavado.
- * Añadir 500 ul al filtro de alcohol 80 y centrifugar 1 minuto.
- * Poner el filtro en un tubo limpio y añadir 50 ul de agua destilada caliente y centrifugar 30 segundos.
- * Volver a repetir el paso en el mismo tubo.
- * En el fondo del tubo está el ADN disuelto en el agua, que congelaremos a -20°C para evitar su alteración.

4.7.1.1.8.- Separación de leucocitos con Histopaque, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.

- * Añadir 5 volúmenes de sangre con 4 volúmenes de Histopaque y centrifugar a 1250g durante 12,5 minutos.
- * Retirar la interfase donde aparecen los leucocitos.
- * Añadir 1 ml de PBS estéril
- * Centrifugar a 13000g durante 10 minutos
- * Volver a realizar dos veces más los lavados con PBS.
- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 300 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K.

- * Incubar 3 horas a 56°C.
- * Añadir 200 ul de solución de lisis (0,1M NaOH, 2M ClNa, 0,5% SDS) e incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Añadir 500 ul de fenol/cloroformo (24:1) y agitar.
- * Centrifugar a 13000 g durante 10 minutos
- * Retirar la parte acuosa (la de arriba) y añadirla en otro volumen igual de fenol/cloroformo
- * Agitar y centrifugar a 13000 g durante 10 minutos.
- * Retirar la parte acuosa (la de arriba).
- * Añadir isopropanol (0,6:1)
- * Dejar a -70°C al menos 1 hora.
- * Centrifugar a 13000g durante 15 minutos
- * Añadir 500 ul de etanol 70 y agitar
- * Centrifugar a 13000g durante 5 minutos
- * Retirar el sobrenadante y volver a añadir etanol 70 sobre el precipitado.
- * Retirar el sobrenadante y dejar a 42°C hasta que se consiga la completa evaporación del etanol.
- * resuspender el precipitado en 100 ul de agua destilada estéril y calentar a 65°C durante una hora hasta conseguir la completa disolución del ADN.
- * Congelar a -20°C para evitar degradación

4.7.1.1.9.- Separación de leucocitos con Histopaque, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean.

- * Añadir 5 volúmenes de sangre con 4 volúmenes de Histopaque y centrifugar a 1250g durante 12,5 minutos.
- * Retirar la interfase donde aparecen los leucocitos.
- * Añadir 1 ml de PBS estéril
- * Centrifugar a 13000g durante 10 minutos
- * Volver a realizar dos veces más los lavados con PBS.
- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 300 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K.
- * Incubar 3 horas a 56°C.

- * Añadir 200 ul de solución de lisis (0,1M NaOH, 2M ClNa, 0,5% SDS) e incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Neutralizar con HCl y comprobar que el pH es de 7
- * Añadir 1 ml de NaI
- * Agitar GLASSMILK en un vortex y cuando la resina esté completamente resuspendida, añadir 5 ul.
- * Dejar reposar 15 minutos agitando de vez en cuando.
- * Pasar el contenido al filtro y centrifugar 15 segundos.
- * Añadir al filtro 500 ul de la solución de lavado.
- * Centrifugar 30 segundos y repetir el lavado.
- * Añadir 500 ul al filtro de alcohol 80 y centrifugar 1 minuto.
- * Poner el filtro en un tubo limpio y añadir 50 ul de agua destilada caliente y centrifugar 30 segundos.
- * Volver a repetir el paso en el mismo tubo.
- * En el fondo del tubo está el ADN disuelto en el agua, que congelaremos a -20°C para evitar su alteración.

4.7.1.1.10. - *Wizard Genomic DNA Purification Kit*

- * Añadir por cada 300 ul de sangre 900 ul de Cell Lysis Solution.
 - * Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
 - * Centrifugar a 13000 rpm durante 20 segundos
 - * Retirar el sobrenadante dejando solamente 20 ul.
 - * Agitar en un vortex 15 segundos.
 - * Añadir 300 ul de Nuclei Lysis Solution y dejar a 37°C durante 1 hora.
 - * Añadir 100 ul de Protein Precipitation Solution y agitar 20 segundos.
 - * Centrifugar a 13000g durante 3 minutos
 - * Transferir el sobrenadante a un tubo con 300 ul de isopropanol y agitar.
 - * Centrifugar 1 minuto a 13000g
 - * Lavar con etanol 70.
 - * Dejar secar 15 minutos
- Resuspender en 100 ul de DNA Hydration Solution y dejar a 65°C durante 1 hora.

4.7.1.2.- En muestras de líquido cefalorraquídeo

4.7.1.2.1.- *Hervir*

- * Calentar a 100°C durante 10 minutos
- * Congelar a -20°C para que no se altere el ADN

4.7.1.2.2.- *Proteinasa K y hervir*

- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 80 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K (diluido en 20 ul de agua destilada estéril).
- * Incubar 3 horas a 56°C.
- * Incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Congelar a -20°C para que no se altere el ADN

4.7.1.2.3.- *Proteinasa k, hervir y extracción fenol/cloroformo.*

- * Centrifugar a 13000 g/15 minutos
- * Eliminar el sobrenadante
- * Añadir 80 ul de tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)) y 800 ug de proteinasa K (diluido en 20 ul de agua destilada estéril).
- * Incubar 3 horas a 56°C.
- * Incubar a 100°C durante 10 minutos
- * Añadir 500 ul de fenol/cloroformo (24:1) y agitar.
- * Centrifugar a 13000 g durante 10 minutos
- * Retirar la parte acuosa (la de arriba) y añadirla en otro volumen igual de fenol/cloroformo
- * Agitar y centrifugar a 13000 g durante 10 minutos.
- * Retirar la parte acuosa (la de arriba).
- * Añadir isopropanol (0,6:1)
- * Dejar a -70°C al menos 1 hora.
- * Centrifugar a 13000g durante 15 minutos
- * Añadir 500 ul de etanol 70 y agitar
- * Centrifugar a 13000g durante 5 minutos
- * Retirar el sobrenadante y volver a añadir etanol 70 sobre el precipitado.
- * Retirar el sobrenadante y dejar a 42°C hasta que se

consiga la completa evaporación del etanol.

* resuspender el precipitado en 100 ul de agua destilada estéril y calentar a 65°C durante una hora hasta conseguir la completa disolución del ADN.

* Congelar a -20°C para evitar degradación (203, 204, 205, 206, 207, 208).

4.7.2.- Optimización de la reacción de amplificación.

4.7.2.1.- Concentraciones de los distintos componentes de la reacción de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con las siguientes concentraciones:

Volumen total : 50 ul

ADN a amplificar (muestra clínica) : 5 ul

Cebadores: Son oligonucleotidos de 21 y 20 pares de bases de una región del gen B1 del *Toxoplasma gondii*. La región amplificada se repite 35 veces dentro del gen. Se utilizar a una concentración 25 nM.

Cebador 1: 5'- GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG

Cebador 2: 5'- TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC

dNTP: 200 nM de cada deoxinucleotido trifostato

Taq polimerasa: 2,5 unidades

Cloruro de Magnesio: 1,5 mM

Tampon: 10 mM Tris pH(8,3), 50mM KCl

4.7.2.2.- Número y tiempo de los ciclos

Los ciclos constan de:

60 segundos a 94°C

90 segundos a 55°C

60 segundos a 72°C

Nº de ciclos : 40

4.7.3.- Optimización del sistema de revelado con sonda no isotópica.

Sonda empleada: 5'- GGC GAC CCA ATC TGC GAA TAC CAC C.

Esta sonda está marcada en posición terminal con digoxigenina.

Concentración de la sonda: 100 ug/ml de sonda

Tiempo de contacto: Toda la noche

Procedimiento: Se utiliza en el revelado de la sonda el kit de revelado quimioluminiscente suministrado por Boehringer Mannheim llamado Luminiscent Detection Kit for Nucleid Acids. Desnaturalizar el ADN a hibridar (que proviene de la reacción de amplificación) durante 10 minutos a 94°C

* Colocar 2 ul en una membrana de nylon

* Fijar el ADN a la membrana mediante exposición a la luz ultravioleta del transiluminador durante 3 minutos por el lado donde está situado el ADN

* Realizar la prehibridación de la membrana: Poner la membrana 1 hora a 40°C con una solución de 5.SCC, 2% solución de bloqueo, 0,1% N-laurilsarcosina 0,02% SDS

* Realización de la hibridación a 40°C durante toda la noche en la misma solución que la prehibridación pero sin solución de bloqueo.

* Realizar un lavado durante 5 minutos a 40°C con 5.SCC, 0,1% SDS

* Realizar un lavado durante 5 minutos a 40°C con 1.SCC, 0,1% SDS

* Secar al aire

* Lavar 5 minutos con solución de lavado: 0,1M ácido maleico, 0,15M ClNa, 0,3% Tween 20. pH 7,5

* Incubar 30 minutos a temperatura ambiente con 0,1M ácido maleico, 0,15M ClNa, 10% solución de bloqueo.

* Añadir los anticuerpos antidigoxigenina a la concentración indicada por el fabricante en la solución anterior.

* Realizar dos lavados de 15 minutos con 0,1M ácido maleico, 0,15M ClNa, 0,3% Tween 20. pH 7,5.

* Realizar el revelado añadiendo Lumigen diluido según instrucciones del fabricante durante 20 minutos.

* Mantener en contacto la membrana de nylon durante toda la noche con una placa de radiografía

- * Revelar la radiografía por métodos habituales.

4.7.4.- Medidas para prevenir la contaminación de la técnica.

- * Utilización de tres espacios físicos separados, uno para la extracción del ADN, otro para la amplificación y un tercero para trabajar con el ADN amplificado.
- * Utilización de puntas de pipeta con filtro y con puntas de desplazamiento positivo.
- * Utilizar guantes
- * No intercambiar pipetas, matraces ni ningún otro material entre las tres secciones de trabajo
- * Utilizar recipientes de plástico no reutilizables.
- * Alicuotar todos los reactivos, de forma que en la mayor parte de las veces no se utilice el mismo reactivo para dos muestras.
- * Descartar todos los residuos a recipientes con lejía para la destrucción de ADN
- * Limpiar la zona de trabajo con lejía antes y después de trabajar.
- * El lugar de extracción del ADN a partir de muestras clínicas es una campana de flujo laminar, que se esteriliza con rayos ultravioleta.
- * En cada tanda de amplificadas se introduce dos controles negativos, uno con agua destilada estéril y otro con todos los reactivos de la reacción excepto el ADN, estos controles se introducen en todos los procesos de extracción de ADN, de amplificación de la reacción y en los procesos de revelado con sonda.

4.8.- Quimioterapia

4.8.1.- Antibióticos empleados

Se han empleado los siguientes antibióticos: pirimetamina, sulfadiazina, espiramicina, minociclina, clindamicina, azitromicina, claritromicina,

roxitromicina, miokamicina, ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, lomefloxacina.

Todos los compuestos fueron administrados suspendidos o disueltos en carboximetilcelulosa sódica al 1% en agua destilada.

4.8.2.- Establecimiento del modelo experimental

Utilizamos la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, que se mantiene en el laboratorio por pases periódicos en ratón (está cepa es extremadamente virulenta y, en ausencia de tratamiento, mortal para los ratones). Todas las experiencias se realizaron con ratones NMRI (hembras de 25-30 g de peso), distribuidos en lotes de 10 animales, que fueron infectados por inoculación intraperitoneal de 200 taquizoitos de la cepa de *Toxoplasma gondii* antes mencionada; para ello, se recogió el exudado peritoneal de varios ratones infectados 3 días antes y se suspendió en PBS estéril, procediéndose al recuento de taquizoitos en una cámara de Neubauer a fin de ajustar el inóculo (10^3 taquizoitos/ml).

4.8.3.- Desarrollo de las pruebas.

Los antibióticos se administraron por vía oral, mediante sonda buco-gástrica, desde el día 0 (a las 2 horas postinfección [p.i.]) hasta el día 9 p.i.. cada 12 ó 24 horas. Diariamente, durante un mes, se controló la mortalidad entre los animales testigo (que recibieron tan sólo carboximetilcelulosa sódica) y tratados. El día 30 p.i., y con objeto de detectar la infección residual que pudiera existir, los ratones que habían sobrevivido fueron sacrificados y de cada cerebro se hizo un macerado, que se homogeneizó y se inoculó por vía intraperitoneal a 2 ratones indemnes. El hecho de que éstos permaneciesen vivos, 30 días después, se interpretó como ausencia de infección residual.

5.- RESULTADOS

5.1.- Aislamiento y mantenimiento de cepas de *Toxoplasma gondii*

* La cepa RH se mantiene indefinidamente mediante pases en líquido peritoneal de ratón cada 3 días.

* Las cepas de *Toxoplasma gondii* productoras de quistes tisulares aisladas de cerebro de gatos, por los procedimientos antes indicados, se mantienen en ratón mediante pases por vía oral de cerebros de ratones inoculados cada 6 meses.

Los estudios serológicos para confirmar la presencia de infección se llevan a cabo en suero de los ratones mediante la técnica de microaglutinación (BioMerieux)

5.2.- Establecimiento de modelos de toxoplasmosis experimental

5.2.1.- Modelo de primoinfección por *Toxoplasma gondii*.

* Tras la inoculación de 200 taquizoitos por vía intraperitoneal, previamente extraídos de un líquido peritoneal de ratón muy parasitado por taquizoitos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, se produce la muerte de los ratones a los 7-9 días. Para confirmar la presencia de la infección, se observa los líquidos peritoneales de los ratones muertos, en los que se ven abundantes leucocitos y taquizoitos de *Toxoplasma gondii*.

5.2.2.- Modelo de infección crónica por *Toxoplasma gondii* en sujeto inmunocompetente (ratón).

* Maceración de cerebros de ratones previamente infectados con 50 quistes de *Toxoplasma gondii* por vía oral

* Extracción de sangre al cabo de 15 días.

* Mediante la técnica de microaglutinación (BioMerieux) se obtienen resultados positivos para la detección de

anticuerpos específicos frente a *Toxoplasma gondii*

5.2.3.- Modelo de infección crónica reactivada en sujeto inmunodeprimido (ratón).

- * Maceración de cerebros de ratones previamente infectados con 50 quistes de *Toxoplasma gondii* por vía oral.
- * Extracción de sangre al cabo de 15 días.
- * Mediante la técnica de microaglutinación (BioMerieux) se obtienen resultados positivos para la detección de anticuerpos específicos frente a *Toxoplasma gondii*
- * Tratamiento inmunosupresor antes mencionado junto con un tratamiento antibiótico de amplio espectro, para evitar infecciones bacterianas, con ciprofloxacina por vía oral.
- * A la muerte de los ratones, los cerebros fueron estudiados por técnicas histológicas mediante las que se confirmaron al presencia de infección aguda por *Toxoplasma gondii*.

5.3.- Grupos de pacientes humanos estudiados

5.3.1.- Pacientes inmunocompetentes.

- * Se guardaron muestras de líquido cefalorraquídeo y suero de pacientes adultos que fueron sometidos a punción lumbar por cualquier causa y que no tenían evidencias clínicas ni serológicas de infección aguda por *Toxoplasma gondii*.
- * Hasta su procesamiento las muestras fueron almacenadas a -70°C.

5.3.2.- Pacientes inmunodeprimidos.

- * Se guardaron muestras de líquido cefalorraquídeo y suero de los pacientes adultos que fueron sometidos a punción lumbar por afectación del sistema nervioso central por causas infecciosas y no infecciosas.

Posteriormente, en vista de los resultados analíticos, microbiológicos, radiológicos, la evolución clínica y la respuesta a los fármacos empleados en su tratamiento se clasificaron en dos grupos, según cumplían el patrón de referencia de encefalitis toxoplásmica o no.

* Los pacientes con ausencia de encefalitis toxoplásmica padecían los siguientes cuadros.

- Tuberculosis meníngea
- No existencia de enfermedad neurológica
- Linfoma del SNC
- Radiculopatía
- Enfermedad desmielinizante
- Encefalopatía por HIV
- Desconocido

5.4.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de antígenos circulantes.

5.4.1.- Estandarización de las técnicas.

5.4.1.1.- Determinación de la cantidad óptima de anticuerpos hiperinmunes.

Se realizaron diluciones seriadas de anticuerpos hiperinmunes y se ensayaron frente a una solución de albúmina sérica bovina en PBS, ante un suero de ratón sin contacto con *Toxoplasma gondii* y un suero de ratón con una infección por la cepa RH de *Toxoplasma gondii* en una fase avanzada de la enfermedad (con presencia de antígenos circulantes). Se calculó los cocientes entre las densidades ópticas obtenidas.

Ag	BSA/S(-)	S(+)/S(-)
30ug	1,20	3,78
15ug	1,35	5,75
7,5ug	1,5	8,31
4ug	1,64	11,2
2ug	1,80	14,72
1ug	1,96	9,5

Ag: Antígenos

BSA/S(-): Cociente entre la absorbancia de la albúmina sérica bovina y el suero negativo.

S(+)/S(-): Cociente entre la absorbancia del suero positivo y el suero negativo.

Por tanto, los pocillos de la placa de ELISA deben ir tapizados con 2 ug/pocillo de anticuerpos hiperinmune de conejo y después de añadir la muestra, debemos añadir 2 ug/ml de anticuerpos hiperinmune de cobaya.

5.4.1.2.- Dilución óptima de los anticuerpos conjugados con peroxidasa.

Realizamos diluciones seriadas del anticuerpo aplicado a un pocillo de BSA/PBS, uno de suero humano y varios de suero humano con adición de diluciones seriadas de antígenos de *Toxoplasma gondii*. Se realizó la incubación durante 24h a temperatura ambiente.

Obtenemos mejor discriminación entre el suero normal y el pocillo en el que hemos añadido la menor cantidad de antígeno de *Toxoplasma gondii* a una dilución de anticuerpos anticobaya marcado con peroxidasa cuando lo empleamos a una dilución 1/20.000

5.4.1.3.- Cálculo del límite de detección de la técnica.

Se realiza con un sonicado de taquizoitos previamente purificados de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

ug tapizado	Sensibilidad
1 ug/pocillo	700ug/ml suero
2 ug/pocillo	300ug/ml suero
4 ug/pocillo	1500 ug/ml suero

Para las condiciones elegidas el límite de detección de la técnica se sitúa en 300 ug/ml de suero

5.4.1.4.- Valor umbral y reproductibilidad.

El valor umbral se estableció en la media de los sueros negativos de control más dos veces la desviación típica, los resultados se expresan como el cociente entre los valores obtenidos en la muestra problema y el valor umbral, por lo que cualquier valor mayor a 1 es considerado positivo.

Para asegurar la reproductibilidad de los resultados tanto dentro de la misma prueba como en pruebas distintas, se realizaron controles de la técnica con sueros con presencia de antígenos conocida y sueros negativos tanto colocándolos en distintas posiciones de la placa de ELISA como realizando las determinaciones dos días consecutivos.

5.4.2.- Detección de antígenos circulantes en suero de ratón.

La sangre extraída de cada lote de animales se mezcló y fue procesada como una muestra

5.4.2.1.- Ratones inoculados por la cepa RH

Día 1 postinfección	1.19 (+)
Día 3 postinfección	1.19 (+)
Día 5 postinfección	2.05 (+)
Día 7 postinfección	2.06 (+)

5.4.2.2.- Ratones inoculados con la cepa 868

Día 1 postinfección	0.81 (-)
Día 3 postinfección	0.79 (-)
Día 15 postinfección	1.32 (+)
Día 21 postinfección	1.11 (+)
Día 30 postinfección	1.15 (+)
Día 45 postinfección	1.05 (+)
Día 60 postinfección	0.83 (-)

5.4.2.3.- Ratones con infección crónica reactivada.

* Inoculados con la cepa 868 de **Toxoplasma gondii** que sufren una reactivación de la toxoplasmosis debido a la inmunodepresión a que son sometidos.

Día 0 postinmunodepresión	0.83 (-)
Día 7 postinmunodepresión	1.19 (+)
Día 14 postinmunodepresión	1.11 (+)
Día 21 postinmunodepresión	1.35 (+)

5.4.2.4.- Ratones sanos

Se procesó 25 muestras diferentes obtenidas de ratones sanos distintos.

Sanos	2/25
-------	------

Por tanto, después del cuadro de toxoplasmosis aguda generada por la inoculación de las cepas de *Toxoplasma gondii* se produce una fase en la que se detecta en suero la presencia de antígenos circulantes. Tras el proceso de inmunosupresión, con la reactivación toxoplásmica que se produce se vuelven a detectar en suero la presencia de antígenos circulantes. Sin embargo, se detectan falsos positivos en suero de ratones sanos.

5.4.3.- Detección de antígenos circulantes en suero de pacientes humanos.

Grupo I: Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo II: Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo III: Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica

Grupo IV: Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica

Grupo I	5/70
Grupo II	3/70
Grupo III	6/63
Grupo IV	2/16

Sensibilidad: 12,5%

Especificidad: 93,54%

Grupo IV

Tratados	0/5
No tratados	2/11

Tratados:

Sensibilidad: 0%

No tratados:

Sensibilidad: 18,18%

5.4.4.- Detección de antígenos circulantes en líquido cefalorraquídeo de pacientes humanos.

Grupo I: Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo II: Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo III: Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica

Grupo IV: Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica. De estos 10 no recibían terapia toxoplásmica en el momento de la extracción y 6 llevaban más de una semana con terapia antitoxoplásmica.

Grupo I	0/70
Grupo II	0/70
Grupo III	0/63
Grupo IV	1/16

Sensibilidad: 6,25%

Especificidad: 100%

Grupo IV

Tratados	0/5
No tratados	1/11

Tratados:

Sensibilidad: 0%

No tratados:

Sensibilidad: 9,09%

5.5.- Desarrollo de métodos de ELISA para la detección de anticuerpos

5.5.1.- Estandarización

5.5.1.1.- Determinación de la cantidad de taquizoitos necesaria para tapizar de la placa.

En distintos pocillos de la placa de ELISA se depositaron cantidades de taquizoitos variables de 10.000, 100.000 y 1.000.000. Sobre estos se ensayaron sueros con presencia conocida de anticuerpos y sin anticuerpos, como los resultados fueron semejantes para las distintas concentraciones, se eligió la cantidad media de 100.000 taquizoitos para tapizar las placas de ELISA.

5.5.1.2.- Valor umbral de los métodos de ELISA para la detección de anticuerpos en ratones:

Como valor umbral se empleó la media de sueros de ratones sin infección por *Toxoplasma gondii* más dos desviaciones típicas.

5.5.1.3.- Valor umbral de los métodos de ELISA para la detección de anticuerpos en pacientes humanos:

Como valor umbral se empleó la media de sueros de ratones sin infección por *Toxoplasma gondii* más dos desviaciones típicas. Como controles adicionales se introdujeron controles suministrados por Sorin de las distintas inmunoglobulinas.

* Para asegurar la reproductibilidad de los resultados tanto dentro de la misma prueba como en pruebas distintas, se realizaron controles de la técnica con sueros con presencia de antígenos conocida y sueros negativos tanto colocándolos en distintas posiciones de la placa de ELISA como realizando las determinaciones dos

días consecutivos.

5.5.2.- Estudio de la Ig G

5.5.2.1.- En ratones.

El valor umbral se estableció en la media de los sueros negativos de control más dos veces la desviación típica, los resultados se expresan como el cociente entre los valores obtenidos en la muestra problema y el valor umbral, por lo que cualquier valor mayor a 1 es considerado positivo.

5.5.2.1.1.- Ratones inoculados por la cepa RH

Día 1 postinoculación	0.67 (-)
Día 3 postinoculación	0.67 (-)
Día 5 postinoculación	0.76 (-)
Día 7 postinoculación	1.11 (+)

5.5.2.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868

Día 1 postinoculación	0.76 (-)
Día 3 postinoculación	0.76 (-)
Día 15 postinoculación	3.14 (+)
Día 21 postinoculación	6.47 (+)
Día 30 postinoculación	6.26 (+)
Día 45 postinoculación	6.35 (+)
Día 60 postinoculación	6.38 (+)

5.5.2.1.3.- Ratonos con infecci3n cr3nica reactivada.

Día 0 postinmunosupresi3n	6.38(+)
Día 7 postinmunosupresi3n	5.32 (+)
Día 14 postinmunosupresi3n	4.08 (+)
Día 21 postinmunosupresi3n	3.58 (+)

La producci3n de Ig G aparece aproximadamente al cabo de 7 días despu3s de la primoinfecci3n por *Toxoplasma gondii*; se produce en las primeras fases de la infecci3n un aumento en el título de anticuerpos. En fases de reactivaci3n de toxoplasmosis cr3nica, debido al estado inmunol3gico del sujeto, no se produce aumento en el título de anticuerpos Ig G.

5.5.2.1.4.- Ratonos sanos

Nº ratones	Ig G
25	0/25

5.5.2.2.- En pacientes humanos

Grupo I: Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*.

Grupo II: Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*.

Grupo III: Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.

Grupo IV: Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.

	ELISA IgG	Microaglut
Grupo I	70/70	70/70
Grupo II	3/70	0/70
Grupo III	34/63	29/63
Grupo IV	16/16	16/16

La IgG aparece en todos los casos de encefalitis toxoplásmica. En cuanto a los otros grupos estudiados los resultados entre las dos técnicas son concordantes en esencia, sin embargo se observa una mayor sensibilidad de la técnica de ELISA sobre la microaglutinación.

5.5.3.- Estudio de la IgM

5.5.3.1.- En ratones.

El valor umbral se estableció en la media de los sueros negativos de control más dos veces la desviación típica, los resultados se expresan como el cociente entre los valores obtenidos en la muestra problema y el valor umbral, por lo que cualquier valor mayor a 1 es considerado positivo.

5.5.3.1.1.- Ratones inoculados por la cepa RH

Día 1 postinoculación	0.67 (-)
Día 3 postinoculación	0.66 (-)
Día 5 postinoculación	1.84 (+)
Día 7 postinoculación	2.58 (+)

5.5.3.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868

Día 1 postinoculación	0.86 (-)
Día 3 postinoculación	0.90 (-)
Día 15 postinoculación	1.32 (+)
Día 21 postinoculación	1.14 (+)
Día 30 postinoculación	1.05 (+)
Día 45 postinoculación	1.30 (+)
Día 60 postinoculación	1.66 (+)

5.5.3.1.3.- Ratones con infección crónica reactivada

Día 0 postinmunosupresión	1.66 (+)
Día 7 postinmunosupresión	2.43 (+)
Día 14 postinmunosupresión	2.64 (+)
Día 21 postinmunosupresión	1.75 (+)

5.5.3.1.4.- Ratones sanos

N° ratones	Ig M
25	0/25

Las Ig M aparecen antes que las Ig G en la primoinfección por *Toxoplasma gondii*; sin embargo se mantienen durante mucho tiempo en el suero.

5.5.3.2.- En humanos.

Grupo I: Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo II: Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos

frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo III: Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica

Grupo IV: Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica

	ELISA IgM	ISAGA
Grupo I	0/70	0/70
Grupo II	0/70	0/70
Grupo III	0/63	0/63
Grupo IV	0/16	0/16

Sensibilidad: 0%

Especificidad: 100%

5.5.4.- Detección de Ig A

5.5.4.1.- En ratones

5.5.4.1.1.- Ratones inoculados con la cepa RH

Día 1 postinoculación	0.38 (-)
Día 3 postinoculación	0.89 (-)
Día 5 postinoculación	1.35 (+)
Día 7 postinoculación	1.98 (+)

5.5.4.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868

Día 1 postinoculación	0.86 (-)
Día 3 postinoculación	0.90 (-)
Día 15 postinoculación	0.86 (+)
Día 21 postinoculación	1.65 (+)
Día 30 postinoculación	1.47 (+)
Día 45 postinoculación	1.18 (+)
Día 60 postinoculación	1.32 (+)

5.5.4.1.3.- Ratones con infección crónica reactivada

Día 0 postinmunosupresión	1.66 (+)
Día 7 postinmunosupresión	1,48 (+)
Día 14 postinmunosupresión	1.78 (+)
Día 21 postinmunosupresión	1.56 (+)

5.5.4.1.4.- Ratones sanos

N° ratones	Ig A
25	0/25

Las Ig A aparecen antes que las Ig G en la primoinfección por *Toxoplasma gondii*; se mantienen durante mucho tiempo en el suero, incluso después de la fase aguda de la enfermedad.

5.5.4.2.- En pacientes humanos.

Grupo I: Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo II: Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo III: Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica

Grupo IV: Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica

Grupo I	6/70
Grupo II	0/70
Grupo III	2/63
Grupo IV	3/16

Sensibilidad: 18,75%

Especificidad: 96,05%

5.6.- Estudio de la avidéz de la Ig G

5.6.1.- En ratón

5.6.1.1.- Ratones inoculados por la cepa RH

Día 1 postinoculación	
Día 3 postinoculación	
Día 5 postinoculación	
Día 7 postinoculación	3,8%

5.6.1.2.- Ratones inoculados con la cepa 868

Día 1 postinoculación	
Día 3 postinoculación	
Día 15 postinoculación	5,4%
Día 21 postinoculación	12,5%
Día 30 postinoculación	5,8%
Día 45 postinoculación	5,8%
Día 60 postinoculación	1,7%

5.6.1.3.- Ratones con infección crónica reactivada

Día 0 postinmunosupresión	1,7%
Día 7 postinmunosupresión	12,5%
Día 14 postinmunosupresión	10,9%
Día 21 postinmunosupresión	12,5%

5.6.2.- En pacientes humanos.

Grupo I: Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*.

Grupo II: Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*.

Grupo III: Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica.

Grupo IV: Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica.

Grupo V: Pacientes inmunocompetentes con presencia de Ig M residual no asociada con infección aguda.

Grupo VI: Pacientes inmunocompetentes con primoinfección

por *Toxoplasma gondii* demostrada por seroconversión.

	Alta avidéz	Baja avidéz
Grupo I	67/70	3/70
Grupo II		
Grupo III	33/34	1/34
Grupo IV	16/16	0/16
Grupo V	24/25	1/25
Grupo VI	0/4	4/4

Presencia de anticuerpos de baja avidéz en casos de primoinfección por *Toxoplasma gondii*

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 96%

Presencia de anticuerpos de baja avidéz en casos de encefalitis toxoplásmica

Sensibilidad: 0%

5.7.- Detección del ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.7.1.- Optimización de los procedimientos de extracción.

5.7.1.1.- En muestras de sangre periférica.

* Se ensayaron los distintos procedimientos de extracción a sangres no coaguladas por la adición de EDTA a las que se les añadió diluciones seriadas de líquido peritoneal con *Toxoplasma gondii*. Cada procedimiento de extracción fue ensayado con 4 tubos, el primero tenía 100ul de líquido peritoneal de ratón inoculado con la cepa RH, el segundo 50 ul, el 3° 25 ul y el cuarto es utilizado como control positivo.

Se ensayaron las siguientes técnicas:

- 1.- Proteinasa K, lisis alcalina y extracción fenol/cloroformo.
 - 2.- Proteinasa K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean
 - 3.- Proteinasa K y lisis alcalina
 - 4.- EDTA y hervir
 - 5.- Lavar con PBS y hervir
 - 6.- Separación de leucocitos con ISOLYMPH, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.
 - 7.- Separación de leucocitos con ISOLYMPH, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con Gene Clean.
 - 8.- Separación de leucocitos con Histopaque, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.
 - 9.- Separación de leucocitos con Histopaque, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.
 - 10.- Wizard Genomic DNA Purification KIT.
- * Cada procedimiento se realizó por duplicado, uno con sangre refrigerada y otro con sangre congelada y descongelada (se rompen los hematies).

	100C	50C	25C	0C	100N	50N	25N	0N
1	+	+	+	-	+	+	+	-
2	+	+	-	-	+	+	-	-
3	+	-	-	-	+	+	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	+	-	-	-
6	+	+	+	-	+	+	+	-
7	+	+	-	-	+	+	+	-
8	+	+	+	-	+	+	+	-
9	+	+	-	-	+	+	+	-
10	+	+	+	-	+	+	+	-

C: Sangre sometida a un proceso de congelación/descongelación

N: Sangre conservada en la nevera

Los procedimientos más efectivos de extracción de ADN son los 1, 6, 8, 10 y no hay diferencias marcadas entre mantener la sangre en la nevera (24 horas) o congelar y descongelar la muestra.

5.7.1.2.- En muestras de líquido cefalorraquídeo

* A una mezcla de líquidos cefalorraquídeos obtenidos por diferentes causas de pacientes humanos se añadió diluciones seriadas de líquido peritoneal de ratón inoculado con la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, cada método de extracción de ADN se valoró en cuatro fracciones, la 1° con 100 ul de líquido peritoneal, la 2° con 50 ul, la 3° con 25 ul y la 4° sin líquido peritoneal.

Se ensayaron las siguientes técnicas:

- 1.- Hervir
- 2.- Proteinasa K y hervir
- 3.- Proteinasa K, hervir y extracción con

fenol/cloroformo.

	100	50	25	0
1	+	-	-	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-

5.7.1.3.- Determinación del límite de detección.

* A partir taquizoitos de la cepa RH previamente purificados de líquido peritoneal de ratón, se ha realizado el límite de detección utilizando como diluyente de los taquizoitos tampon de resuspensión (0,1M Tris-HCl pH(8), 0,01M EDTA pH(8)), se ha establecido en 5 taquizoitos/ muestra.

5.7.2.- Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa a muestras de sangre periférica obtenida en modelos animales.

Se emplearon las siguientes técnicas:

- 1.- Proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo
- 6.- Separación de leucocitos con ISOLYMPH, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo
- 8.- Separación de leucocitos con Histopaque, proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.
- 10.- Wizard Genomic DNA Purification Kit.

5.7.2.1.- Ratones inoculados por la cepa RH

	T 1	T 6	T 8	T 10
Día 1 postinoculación	+	+	+	+
Día 3 postinoculación	+	+	+	+
Día 5 postinoculación	+	+	+	+
Día 7 postinoculación	+	+	+	+

T: Técnica empleada en la extracción del ADN

5.7.2.2.- Ratones inoculados con la cepa 868

	T 1	T 6	T 8	T 10
Día 1 postinoculación	-	-	-	-
Día 3 postinoculación	+	+	+	+
Día 15 postinoculación	+	+	+	+
Día 21 postinoculación	+	+	+	+
Día 30 postinoculación	+	-	-	+
Día 45 postinoculación	+	-	-	-
Día 60 postinoculación	-	-	-	-

T: Técnica empleada en la extracción del ADN

5.7.2.3.- Ratonés con infección crónica reactivada.

	T 1	T 6	T 8	T 10
Día 0 postinmunosupresión	-	-	-	-
Día 7 postinmunosupresión	+	+	+	+
Día 14 postinmunosupresión	+	+	+	+
Día 21 postinmunosupresión	+	+	+	+

T: Técnica empleada en la extracción del ADN

5.7.3.- Aplicación de la PCR a muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes seleccionados.

Grupo I: Pacientes inmunocompetentes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo II: Pacientes inmunocompetentes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*

Grupo III: Pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica

Grupo IV: Pacientes inmunodeprimidos con encefalitis toxoplásmica

	T 2	T 3
Grupo I	0/70	0/70
Grupo II	0/70	0/70
Grupo III	0/63	0/63
Grupo IV	10/16	8/16

T: Técnica empleada en la extracción del ADN

Técnica 2:

Sensibilidad: 62,5%

Especificidad: 100%

Técnica 3:

Sensibilidad: 50%

Especificidad: 100%

Grupo IV

	T 2	T 3
Sin terapia	9/11	7/11
Con terapia	1/5	1/5

T: Técnica empleada en la extracción del ADN

Sin terapia:

Técnica 2: Sensibilidad: 81,8% Especificidad: 100%

Técnica 3: Sensibilidad: 63,63% Especificidad: 100%

Con terapia:

Sensibilidad: 20%

Especificidad: 100%

5.8.- Quimioterapia

5.8.1.- Macrólidos

	7-9 d. p.i.	10-20 d. p.i.	21-30 d. p.i.	Infec. residual ^a
Testigo	100 ^b			
P/S 4/250 mg/kg	0	0	0	- (0)
Espiramicina 200 mg/kg ^c 100 mg/kg ^d	100 90	100		
Azitromicina 200 mg/kg ^c	0	0	0	- (0)
Roxitromicina 200 mg/kg ^c 200 mg/kg ^d	100 0	0	10	+ (61)
Claritromicina 200 mg/kg ^c 100 mg/kg ^d	0 0	0 0	30 20	+(100) +(100)
Miokamicina 200 mg/kg ^c 100 mg/kg ^d	100 100			

^a Entre paréntesis se indica la mortalidad entre los receptores de tejido cerebral de los supervivientes.

^b Porcentaje de mortalidad

^c Cada 24 horas

^d Cada 12 horas

d. p.i.: días postinfección; P/S: pirimetamina/sulfadiazina

5.8.2.- Clindamicina

	7-9 d. p.i.	10-20 d. p.i.	21-30 d. p.i.	Infecc. residual ^a
Testigo	100 ^b			
P/S 4/250 mg/kg	0	0	0	- (0)
Espiramicina 200 mg/kg ^c 100 mg/kg ^d	100 90	100		
Clindamicina 200 mg/kg ^c 200 mg/kg ^d	50 10	100 40	60	+ (100)

^a Entre paréntesis se indica la mortalidad entre los receptores de tejido cerebral de los supervivientes.

^b Porcentaje de mortalidad

^c Cada 24 horas

^d Cada 12 horas

d. p.i.:días postinfección; P/S:pirimetamina/sulfadiazina

5.8.3.- Minociclina

	7-9 d. p.i.	10-20 d. p.i.	21-30 d. p.i.	Infec. residual ^a
Testigo	100 ^b			
P/S 4/250 mg/kg	0	0	0	- (0)
Espiramicina 200 mg/kg ^c 100 mg/kg ^d	100 90	100		
Minociclina 200 mg/kg ^c 200 mg/kg ^d	0 0	0 0	0 0	- (0) - (0)

^a Entre paréntesis se indica la mortalidad entre los receptores de tejido cerebral de los supervivientes.

^b Porcentaje de mortalidad

^c Cada 24 horas

^d Cada 12 horas

d. p.i.:días postinfección; P/S:pirimetamina/sulfadiazina

5.8.4.- Quinolonas

	7-9 d. p.i.	10-20 d. p.i.	21-30 d. p.i.	Infecc. residual ^a
Testigo	100 ^b			
P/S 4/250 mg/kg	0	0	0	- (0)
Espiramicina 200 mg/kg ^c 100 mg/kg ^d	100 90	100		
Ciprofloxac. 200 mg/kg ^c 200 mg/kg ^d	100 100			
Norfloxac. 200 mg/kg ^c 200 mg/kg ^d	100 100			
Ofloxac. 200 mg/kg ^c 200 mg/kg ^d	100 100			
Lomefloxac. 200 mg/kg ^c 200 mg/kg ^d	100 100			

^a Entre paréntesis se indica la mortalidad entre los receptores de tejido cerebral de los supervivientes.

^b Porcentaje de mortalidad

^c Cada 24 horas ^d Cada 12 horas

p.i.: postinfección; P/S: pirimetamina/sulfadiazina

6.- DISCUSION

6.1.- General

6.- DISCUSSION

6.1.- General

La toxoplasmosis es una zoonosis extendida por todo el mundo, el hombre actúa como hospedador intermediario en el ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. En humanos, la prevalencia de seropositividad de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* se incrementa con la edad, y no hay diferencia entre los sexos. En Países como El Salvador, Tahití o Francia la prevalencia llega al 90% en la cuarta década de la vida, en EEUU la prevalencia oscila entre el 3 y el 70% en adultos y en España la prevalencia ronda el 50% en adultos.

Las dos rutas principales de transmisión de *Toxoplasma gondii* son la oral y la congénita. El 25% de los corderos y el 25% de los cerdos presentan quistes tisulares en su carne, mientras que raramente se aísla de carne de vaca (11). Por tanto la ingestión de carne con quistes tisulares, o de verduras con ooquistes son las dos formas más frecuentes de infección en humanos.

Las infecciones producidas por *Toxoplasma gondii* en el hombre son asintomáticas en su gran mayoría, solamente el 10-20% de las infecciones en adulto no inmunodeprimido son sintomáticas (35) y cuando estos síntomas aparecen son leves y autolimitados. Sin embargo, en determinadas situaciones, la infección por *Toxoplasma gondii* adquiere gran importancia clínica, esto sucede cuando la infección se produce durante el período de gestación, por la posibilidad de que se produzca daño fetal y cuando se produce una primoinfección, ya sea por una primoinfección o una reactivación de una toxoplasmosis crónica en un sujeto severamente inmunodeprimido.

Con la aparición de la pandemia por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), la toxoplasmosis se ha convertido en una de las enfermedades más frecuentes en este tipo de pacientes y de más difícil diagnóstico. La encefalitis toxoplásmica en pacientes HIV casi

invariablemente resulta de la reactivación de infecciones latentes (42); la ruptura intermitente de los quistes en el cerebro junto a la respuesta inmune no adecuada origina la reactivación local.

La incidencia de encefalitis toxoplásmica se correlaciona directamente con la prevalencia de anticuerpos anti-toxoplasma en la población y el estado de la infección por HIV de los individuos de la población. La prevalencia entre los pacientes HIV en EEUU oscila entre el 15 y el 40% (46) y llega al 96% en ciertas áreas de Africa y de Europa (47). Aproximadamente, el 45% de los enfermos HIV con anticuerpos frente a *Toxoplasma* desarrollan encefalitis toxoplásmica (48) por lo que en áreas de alta prevalencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* pueden desarrollar encefalitis toxoplásmica entre el 25 y el 50% de los pacientes HIV (46).

La mayor incidencia de encefalitis toxoplásmica se produce en pacientes con menos de 100 CD4/mm³ (43,49). También puede adquirirse la infección por *Toxoplasma gondii* después de estar infectado por HIV (primoinfección); en este caso, la seroconversión ocurre entre el 2 y el 5,5% de los casos (50,51). Estos sujetos están expuestos a sufrir encefalitis toxoplásmica.

El diagnóstico de la encefalitis toxoplásmica en pacientes inmunodeprimidos es difícil mediante los procedimientos existentes en la actualidad, el cultivo del parásito es difícil y la serología tradicional aparece como de poca utilidad debido a la deficiencia del sistema inmune que presentan estos pacientes. Como esta patología es bastante frecuente, sobre todo en pacientes con fases avanzadas de HIV, es necesario desarrollar métodos diagnósticos alternativos que eviten la instauración de tratamientos innecesarios.

6.2.- Sobre el modelo experimental.

Para el estudio del diagnóstico de la toxoplasmosis

es necesario la instauración de modelos animales que reproduzcan las distintas situaciones clínicas que existen en la enfermedad. En este trabajo hemos establecido tres modelos animales que pretenden abarcar las situaciones clínicas más importantes que aparecen en humanos. La primoinfección con síntomas clínicos importantes, análoga a la que puede producirse en un paciente inmunodeprimido, se ha desarrollado mediante la inoculación por vía intraperitoneal de taquizoitos de la cepa RH, una cepa muy virulenta de *Toxoplasma gondii*. Cuando se produjo la muerte de los ratones se observó la presencia de abundantes taquizoitos en el líquido peritoneal. Este modelo es utilizada por la mayoría de los autores debido a que la cepa RH es una de las cepas de referencia de *Toxoplasma gondii*.

El segundo modelo que hemos desarrollado refleja la situación que se produce en la mayoría de los casos de infección humana por *Toxoplasma gondii*: la infección crónica. Tras la inoculación por vía oral de quistes tisulares de una cepa silvestre de *Toxoplasma gondii*, aislada del cerebro de un gato, aparecen en el cerebro y tejido muscular de ratones inmunocompetentes quistes tisulares y en el suero se detecta la presencia de anticuerpos frente al parásito. Este modelo con otras cepas es utilizado por muchos autores.

El tercer modelo es el que refleja la toxoplasmosis crónica reactivada, y se establece sometiendo a un proceso de inmunosupresión ratones crónicamente infectados con cepas cistógenas de *Toxoplasma gondii*, hasta lograr la reactivación de la toxoplasmosis. Sin embargo, no existe un proceso de inmunosupresión aceptado por todos los autores, sino que existen formas muy variadas de provocar la reactivación de la toxoplasmosis.

Gazzinelli y cols. consiguen la reactivación mediante el empleo de anticuerpos anti interferon gamma

o empleando anti-CD4 en combinación con anti-CD8 (80). Suzuki y cols. también la consiguen mediante el empleo de anticuerpos monoclonales contra interferón-gamma endógeno en ratones crónicamente infectados con *Toxoplasma gondii* (81). Vollmer y cols. establecen un modelo de encefalitis toxoplásmica mediante la deplección selectiva de los linfocitos T-4 (células con CD4). (84) Araujo también emplea anticuerpos monoclonales contra los linfocitos L3T4⁺ (CD4⁺) (87).

Además del empleo de anticuerpos monoclonales, se han desarrollado otros sistemas para provocar la reactivación de la toxoplasmosis. Pomeroy y cols. la producen mediante una infección concomitante por citomegalovirus, con lo que consiguen la reactivación a nivel pulmonar fundamentalmente (82). Hoffin y cols. recurren a la inoculación intracerebral de taquizoitos y posterior inmunodepresión con cortisona o ciclofosfamida o ciclosporina (83). Hulinska y cols. consiguen la reactivación de la toxoplasmosis mediante el empleo de cortisona (85).

Las diferencias de procedimientos, tanto por el empleo de diferentes anticuerpos monoclonales, como por el empleo de distintos fármacos inmunosupresores hace que nosotros ensayemos un sistema mixto con anticuerpos monoclonales anti-linfocitos T-4, junto con tratamiento inmunosupresor con ciclosporina y cortisona. La reactivación produce la muerte de los ratones con infección crónica entre los días 20 y 25 de iniciar el tratamiento inmunosupresor, no afectando a los controles no infectados. El desarrollo de otras infecciones se previene en lo posible mediante la administración de un antibiótico de amplio espectro, como es la ciprofloxacina, que no afecta a *Toxoplasma gondii*. Los cerebros fueron estudiados histológicamente y se confirmó la existencia de reactivación. El modelo, aunque menos selectivo que los revisados anteriormente con anti gamma

interferon y anti TCD, reproduce la recrudescencia toxoplásmica cerebral, con encefalitis histopatologicamente comprobada.

En cuanto a los pacientes utilizados en el estudio, se han establecido los grupos que reflejan las situaciones clínicas más importantes que nos podemos encontrar. Entre los sujetos adultos inmunocompetentes, se han elegido sujetos con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*, característicos de una infección crónica, y sujetos no infectados por *Toxoplasma gondii* (sin anticuerpos específicos).

En cuanto a los sujetos inmunodeprimidos, se han dividido en dos grupos en función de los datos clínicos, radiológicos y de respuesta al tratamiento específico administrado. Para la confirmación de encefalitis toxoplásmica se acepta como suficiente la compatibilidad entre estos tres datos, ya que las biopsias cerebrales, para el diagnóstico de la toxoplasmosis, se han desestimado en los últimos años, debido a que el riesgo que conllevan para el paciente no compensa los resultados diagnósticos obtenidos. Los criterios clínicos y de imagen radiológica, confirmados por respuesta positiva al tratamiento han sido empleado por muchos autores, como Dannemann y cols. (101), Hassl y cols. (102), Candolfi y cols. (103), etc. Novati y cols., por su parte, trabajan con un grupo de pacientes con encefalitis toxoplásmica confirmada mediante biopsia cerebral y otro grupo en la que se confirmó por respuesta al tratamiento e imágenes sugerentes en TAC (135).

6.3.- Sobre la detección de antígenos circulantes en el líquido cefalorraquídeo

La detección de antígenos circulantes en los líquidos biológicos de sujetos con toxoplasmosis activa como método diagnóstico ha surgido como una herramienta con grandes perspectivas de éxito. Diversos autores han desarrollado sistemas de detección de antígenos, que se

basan en métodos serológicos tradicionales, así, Fachado y cols. utilizan el método de coagulación con proteína A estafilocócica (91), mientras que Hafid y cols. y Nakao y cols. utilizan el método de la contraelectroforesis (95,99) y Suzuki y cols. un sistema de aglutinación con latex (97).

Sin embargo, la mayoría de los autores utilizan el sistema de ELISA debido a las muchas ventajas técnicas, de sensibilidad y de reproductibilidad que presenta sobre el resto de los sistemas. Entre los que emplean métodos de ELISA hay algunos autores que utilizan anticuerpos monoclonales contra alguna proteína específica del taquizoito de *Toxoplasma gondii*, lo que les confiere una gran especificidad, mientras que otros emplean anticuerpos policlonales obtenidos por hiperinmunización de animales de laboratorio y posterior purificación, estos sistemas aumentan en la sensibilidad porque se ha demostrado que los antígenos circulantes que aparecen en los líquidos biológicos tras la infección aguda por *Toxoplasma gondii* son múltiples. Ise y cols. analizan los antígenos circulantes de *Toxoplasma gondii* por cromatografía líquida de alta resolución y muestra 4 tipos distintos de antígenos entre 400.000 y 45.000 D. (98). Muller y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes en ratones y conejos, tras inoculación de la cepa RH y la cepa HanR de *Toxoplasma gondii*, mediante un método de ELISA que emplea anticuerpos monoclonales, solamente detecta la presencia de éstos en los animales inoculados con la cepa cistógena (95).

Los sistemas que emplean anticuerpos hiperinmunes policlonales carecen de la especificidad que confiere los monoclonales. En nuestro ELISA hemos utilizado sueros hiperinmunes obtenidos de conejo y de cobaya, capaces de detectar muchos de los antígenos de *Toxoplasma*. Sin embargo, al estudiar 25 sueros de 25 ratones sanos (no infectados) hemos detectado de 2 falsos positivos.

El límite de sensibilidad de las técnicas desarrolladas por los distintos autores varía en función de los anticuerpos empleados en el sistema de detección y del valor umbral establecido. Nuestro sistema obtiene un límite de detección de 300 ng/ml de muestra, que es comparable al obtenido por otros autores, Fachado y cols. logra un límite de sensibilidad de 118 ng/ml (91). Ise y cols. establecen que el límite de detección de su sistema es de 250 ng/ml (98). Si se emplean anticuerpos monoclonales en el sistema de ELISA, el límite de sensibilidad disminuye mucho, debido a que únicamente detecta la presencia de una proteína, así Asai y cols. obtienen un límite de sensibilidad de 0,3 ng/ml (209).

Sin embargo, a pesar de la diferencia de sistemas empleados, los resultados obtenidos por los distintos autores son superponibles. En nuestro trabajo, cuando realizamos la detección de antígenos circulantes en casos de primoinfección por inoculación de taquizoitos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, detectamos la presencia de éstos desde el primer día postinoculación hasta la muerte de los ratones. Acebes y cols. mediante un ELISA, los detectan a partir del segundo día postinoculación hasta la muerte de los ratones (93). Fachado y cols. estudian la presencia de antígenos de *Toxoplasma gondii* en orina y encuentra resultados positivos al segundo día postinoculación (91).

Hassl y cols. trabajan con cuatro modelos de toxoplasmosis experimental murina, producidos por inoculación intraperitoneal de taquizoitos de 4 cepas distintas de *Toxoplasma gondii*; estos autores detectan antígenos circulantes, a niveles de ng/ml, en los cuatro casos desde el primer día postinoculación (91). Hafid y cols. con animales infectados con la cepa RH, mediante el método de contrainmunolectroforesis observan el número medio de líneas de precipitación que se incrementa de 1,6 a los 4 días a 5,8 líneas el séptimo día (95).

Asai y cols. investigan la presencia del enzima nucleotido fosfato hidrolasa mediante un sistema de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales y suero de ratones infectados con la cepa RH, detectan el enzima en el suero el día 1 postinoculación, alcanzando concentraciones de 30 ng/ml el día 5 postinfectación (209). Nakao y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes, en ratones inoculados con la cepa RH mediante la técnica de la contrainmunolectroforesis. En los ratones inoculados intraperitonealmente, los antígenos circulantes aparecen en el segundo día postinoculación y se mantienen hasta la muerte de los ratones (99). Turunen y cols. utiliza un sistema de ELISA en casos de toxoplasmosis experimental murina y detectan la presencia de antígenos en tejido al primer día posinoculación y aparecen en suero y en orina al segundo día postinoculación (100).

Cuando estudiamos la detección de antígenos circulantes en el modelo de toxoplasmosis crónica en ratones inmunocompetentes, obtenemos en nuestro trabajo la presencia de antígenos circulantes entre los días 15 a 45 postinoculación, mientras que en los primeros días postinoculación y al cabo de 60 días no detectamos su presencia. Otros autores obtienen resultados semejantes, Acebes y cols. tras inoculación de la cepa T626 que produce una toxoplasmosis crónica, detecta la presencia de antígenos a los 13 días después de la inoculación. (93) Hassl y cols. estudian la aparición de antígenos circulantes en conejos tras inoculación de quistes de *Toxoplasma gondii* por vía oral, aparecen antígenos a las 5 y a las 8 semanas postinoculación. (96) Asai y cols. trabajan con ratones inoculados intraperitonealmente con quistes de la cepa Beberley, y mediante un sistema de ELISA que utiliza anticuerpos monoclonales contra un enzima del taquizoito, detectan la presencia del enzima en el día 3 y el pico se observa en el día 10 con 89 ng/ml; el enzima decrece y desaparece de circulación el

día 56 (209).

Cuando evaluamos la detección de antígenos circulantes en ratones inmunodeprimidos, observamos la presencia de antígenos circulantes desde el día 7 postinmunodepresión hasta la muerte de los ratones. Los autores que han estudiado esta situación han empleado distintos modelos de inmunosupresión, por lo que los resultados son menos comparables. Suzuki y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes de *Toxoplasma gondii* en ratones atímicos inoculados con una cepa no virulenta del parásito, detectando su presencia en las semanas 1 y 3 postinoculación (97). Nakao y cols. en ratones inoculados con la cepa RH y sometidos a tratamiento inmunosupresor detectan la presencia de antígenos circulantes (99).

Por tanto, a pesar de la gran variedad de técnicas empleadas en la detección de antígenos circulantes en modelos animales, con grandes variaciones entre ellas en cuanto sensibilidad y especificidad, esta posibilidad diagnóstica presenta buenos resultados en modelos animales, sin embargo, es necesaria la mejor purificación y estandarización de las técnicas para evitar las reacciones cruzadas que se producen en estas técnicas.

Cuando examinamos muestras procedentes de pacientes humanos los resultados son muy distintos, ya que los modelos experimentales no son absolutamente superponibles. La inoculación por vía intraperitoneal de taquizoitos de la cepa RH crea una primoinfección muy grave en los ratones, que conduce la muerte de los animales en un plazo de 3 a 10 días según la dosis administrada, por lo que es un modelo que no es superponible a ninguna situación clínica humana. Cuando trabajamos con ratones infectados por vía oral con quistes cepas cistógenas de *Toxoplasma gondii*, producimos una gran infectación y detectamos los antígenos al poco tiempo de establecerse la infección, mientras que en

pacientes humanos la primoinfección puede producirse muchos años antes de que se produzca la reactivación y probablemente la infección se produce con dosis mucho más bajas a las administradas a ratones, por lo que la infección crónica por *Toxoplasma gondii* y la posterior reactivación es un proceso mucho menos agudo que el que creamos en los modelos experimentales. Además, en los modelos animales inmunodeprimidos, la inmunodepresión se produce rápida e intensamente, mientras que la inmunosupresión en pacientes HIV es un proceso gradual y que dura muchos años.

Cuando estudiamos la detección de antígenos circulantes en sueros de pacientes humanos obtenemos una baja sensibilidad -12,5%- y debido a la falta de especificidad de nuestro sistema y a la gran cantidad de reacciones cruzadas que presentan los sueros de pacientes con HIV, por la activación policlonal que sufren estos pacientes obtenemos una especificidad del 93,10%. Cuando evaluamos la técnica en líquidos cefalorraquídeos de pacientes humanos corroboramos su escasa sensibilidad (6,25%), sobre todo en sujetos sometidos a terapia antitoxoplásmica (0%), mientras que obtenemos mejores resultados en sujetos no tratados (9,09%), debido a que el líquido cefalorraquídeo es una muestra que presenta mucho menos problemas de reacciones cruzadas, obtenemos una buena especificidad (100%). Existen trabajos de otros autores con resultados variables, Dannemann y cols. realizan un estudio prospectivo de antígenemia en 11 sueros de pacientes con HIV, no encuentra presencia de antígenos en ninguno de ellos, incluso aunque dos presentaban encefalitis toxoplásmica (101). En cambio, Hassl y cols. estudian la presencia de antígenos circulantes en 232 sueros y 40 muestras de LCR correspondientes a 125 pacientes con infección HIV en los estados III y IV. Se detectó la presencia de antígenos circulantes mediante un método de ELISA en 32 sueros de

20 pacientes (16% de las personas investigadas), las antigenemias se correlacionaban con los resultados serológicos y los síntomas clínicos.(102), sin embargo, este autor no establece criterios estrictos de diagnóstico de encefalitis toxoplásmica, ya que no realiza biopsias cerebrales ni considera la respuesta al tratamiento como un criterio de encefalitis toxoplásmica. Candolfi y cols., estudian 115 sueros de 19 pacientes con inmunosupresión por ser receptores de trasplantes y que clínica y serológicamente sufrían una reactivación de la toxoplasmosis, en 8 pacientes se detectó la presencia de antígenos antes del incremento de los niveles de Ig G o a la vez y en un paciente se detectó hasta su muerte. En los demás casos, la presencia de antígenos desapareció cuando aparecieron niveles elevados de Ig G por la formación de inmunocomplejos, por lo que observó que la cinética de los antígenos es muy corta (103); este autor obtiene mejores resultados porque estudia casos de primoinfección, mientras que las encefalitis toxoplásmicas en pacientes HIV son casi siempre reactivaciones.

6.4.- Sobre el uso en el diagnóstico de la determinación de la clase de anticuerpos (Ig G, Ig M, Ig A).

La detección de anticuerpos, tanto los marcadores serológicos clásicos como la Ig G y la Ig M, como los nuevos marcadores surgidos, la Ig A y el estudio de la avididad de la Ig G han sido evaluados en modelos animales y en pacientes humanos.

La Ig G aparece en el modelo experimental de primoinfección con una cepa virulenta de *Toxoplasma gondii* a los 7 días y cuando la infección se lleva a cabo con una cepa cistógena, los resultados obtenidos son semejantes, ya que no se detecta su presencia a los 3 días pero sí se detecta a los 15 días. En los modelos

animales, incluso en fases graves de inmunodepresión, se sigue detectando niveles de Ig G en suero a lo largo de toda la infección. Acebes y cols. estudian la presencia de Ig G e Ig M en un modelo de toxoplasmosis crónica y detectan, al igual que nosotros la presencia de Ig G en la toxoplasmosis crónica a bajas concentraciones y la presencia de Ig M de forma variable (117).

Esto se observa también en los pacientes humanos donde se detecta presencia de Ig G específica en el suero de todos los pacientes con encefalitis toxoplásmica, indicando que son más probablemente cuadros producidos por reactivación de infección crónica y no por primoinfección. También observamos que las técnicas de ELISA son más sensibles que las de microaglutinación para el estudio de la Ig G. Otros autores obtienen resultados semejantes. Derouin y cols., estudian, las respuesta de anticuerpos en pacientes HIV, en el grupo de 62 pacientes con toxoplasmosis activa confirmada por biopsia o respuesta al tratamiento, encuentran anticuerpos Ig G en 61 pacientes (112).

En cuanto a la detección de Ig M en ratones, observamos que aparece al 5° día postinoculación de taquizoitos de la cepa RH y entre el día 3 y 15 tras la inoculación de quistes de la cepa cistógena, la Ig M se mantiene a niveles detectables en suero durante toda la infección, Grant y cols. estudian la presencia de Ig M en dos modelos de toxoplasmosis, en ratones y en ratas (la resistencia natural que presenta la rata a la infección por *Toxoplasma gondii* es comparable a la que presenta el ser humano adulto), encuentra que la Ig M alcanza un máximo en suero a los 40 días manteniéndose después (118). Esta gran permanencia de la Ig M frente a *Toxoplasma gondii* en suero, ha sido descrita muchas veces en sujetos humanos que mantienen valores de Ig M en suero hasta varios años después de la infección aguda por *Toxoplasma gondii* (105,106,107,108,109,110).

En pacientes inmunodeprimidos, en cambio, no se produce habitualmente la respuesta inmunológica de producción de Ig M ante una reactivación toxoplásmica. En nuestro estudio, no se detectó la presencia de Ig M en ninguno de los pacientes con encefalitis toxoplásmica, esto concuerda con lo señalado por otros autores. Derouin y cols. examinan un grupo de 62 pacientes HIV con toxoplasmosis activa confirmada por biopsia o respuesta al tratamiento, encontrando la presencia de Ig M solamente en tres pacientes. (112) Zufferey y cols. estudian 47 pacientes HIV con reactivación toxoplásmica y detectan la presencia de Ig M en el 6% de los pacientes (116).

La respuesta de anticuerpos en sujetos inmunodeprimidos es completamente distinta a la que se produce en sujetos inmunocompetentes. Turunen y cols. determinan anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* en sujetos inmunocompetentes mediante un sistema de ELISA; 27 de 103 donantes de sangre presentan anticuerpos tipo Ig G y uno de ellos presenta además anticuerpos tipo Ig M. En casos de toxoplasmosis aguda en sujetos inmunocompetentes se observa en la fase de infección aguda una elevación de los niveles de Ig G que declinan paulatinamente hasta que se estabilizan a los 2 años. Los anticuerpos Ig M aparecen al principio de la infección y aunque en algunos casos desaparecen a los 1-2 meses en la mayoría de los casos se detecta su presencia al cabo de 6 meses (115).

La Ig A ha surgido en los últimos años como una herramienta a evaluar en el diagnóstico de la toxoplasmosis. En nuestro estudio, aparece en los modelos animales estudiados con una cinética semejante a la Ig M, lo que coincide con otros autores, Grant y cols. estudian la presencia de Ig M e Ig A en dos modelos de toxoplasmosis, en ratones y en ratas y encuentra que la Ig M y la Ig A aparecen al tiempo, alcanzando un máximo

en suero a los 40 días (118).

En sujetos humanos inmunocompetentes, se ha evaluado la detección de Ig A en suero y Jaqueti y cols. observan que permanece detectable después de finalizar la fase aguda de la enfermedad, por lo que no se correlaciona con infección aguda por *Toxoplasma gondii* (119). Francis y cols. estudian la presencia de Ig A y observan que se mantiene en suero durante 6-7 meses y varía en cuanto a grado y duración en cada paciente, siendo todos los pacientes inmunocompetentes (120).

Nosotros hemos detectado la presencia de Ig A en algunos sujetos inmunocompetentes (6/70) no correspondiéndose su detección con infección activa, lo que coincide con lo señalado por otros autores.

Cuando evaluamos la detección de Ig A en sujetos inmunodeprimidos observamos que se detecta en 3 de 16 sujetos con toxoplasmosis activa pero también en 2 de 63 sin encefalitis toxoplásmica pero inmunodeprimidos, esto concuerda con lo señalado por otros autores, Zufferey y cols. estudian 47 pacientes HIV con reactivación toxoplásmica y observan la presencia de Ig A en el 18% de los pacientes (118). Patel y cols. estudian la detección de Ig A en pacientes HIV para establecer su utilidad diagnóstica de infección aguda en este tipo de pacientes y concluyen que tiene un valor limitado (121). Pinon y cols. señalan que en sujetos inmunodeprimidos pero no HIV con toxoplasmosis activa se detectó la presencia de Ig A en todos los casos mientras que en pacientes con HIV y toxoplasmosis aguda detectan la presencia de Ig A en el 38%, sin embargo, en sujetos HIV y sin toxoplasmosis activa se detectó la presencia de Ig A en el 12% de los casos (124).

6.5.- Sobre la utilidad en el diagnóstico de la avidéz de la Ig G.

El estudio de la avidéz de Ig G ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de primoinfecciones, ya que

aparecen anticuerpos de baja avidéz en los primeros meses de la infección. En los modelos animales ensayados en nuestro estudio detectamos la presencia de anticuerpos de baja avidéz tanto tras inoculación de la cepa RH como tras la inoculación de la cepa cistógena, esto indica la utilidad de esta técnica en el estudio de las primoinfecciones por *Toxoplasma gondii*. Nuestros resultados confirman lo hallado por, entre otros, Francis y cols. que ensayan el sistema de detección de la avidéz de los anticuerpos tipo Ig G en pacientes con linfadenopatías por *Toxoplasma gondii*. Cuando el proceso tiene menos de 3 meses de evolución, se detecta anticuerpos de baja avidéz (125). Lappalainen y cols. estudian sueros de mujeres embarazadas inmunocompetentes con primoinfección por *Toxoplasma gondii* y concluyen que la avidéz de las Ig G es el mejor procedimiento de detectar primoinfecciones, presentando mejores resultados para el diagnóstico de este cuadro en sujetos inmunocompetentes que la detección de Ig M y de Ig A (126). Hedman y cols. estudian la avidéz de los mismos anticuerpos en cinco pacientes inmunocompetentes con toxoplasmosis aguda y en 21 pacientes con toxoplasmosis antigua, todos los pacientes son inmunocompetentes, en los 5 con infección aguda encuentran anticuerpos de baja avidéz, mientras que en el resto de los casos los anticuerpos Ig G presentan avidéz alta (127).

Cuando evaluamos la avidéz de IgG específica de sujetos inmunodeprimidos, obtenemos que los anticuerpos Ig G que poseen son de alta avidéz, característicos de infecciones antiguas, lo que confirma que las encefalitis toxoplásmica estudiadas corresponden a procesos de reactivación de una toxoplasmosis crónica. Como esto parece ser el hecho más frecuente en la encefalitis toxoplásmica en inmunodeprimidos es irrelevante.

Por tanto el valor de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de la encefalitis toxoplásmica es muy

limitado, debido a que la respuesta inmune del huésped está muy alterada, siendo la presencia de Ig G en suero el único factor de pronóstico, ya que aumenta las posibilidades de que en el futuro se desarrolle una encefalitis toxoplásmica. Holliman y cols. realizan un estudio serológico entre los pacientes HIV de Gran Bretaña, llegando a la conclusión de que el 27% de ellos, al tener anticuerpos antitoxoplasma tenían peligro de desarrollar una reactivación y que se producía primoinfección en un 0,5-1% de los pacientes (113). Grant y cols. estudian la correlación entre la presencia de anticuerpos antitoxoplasma y el desarrollo de reactivaciones, encuentran anticuerpos en el 32% de los sujetos, apareciendo encefalitis toxoplásmica en el 26% de ellos en menos de dos años de evolución del HIV (114).

6.6.- Sobre el diagnóstico mediante PCR.

Debido a la dificultad diagnóstica de esta patología, la aparición la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, crea nuevas expectativas de que existan posibilidades de mejorar el diagnóstico. Sin embargo, esta nueva tecnología no está estandarizada, cada autor emplea un sistema distinto de extracción de ADN, amplifica una región genómica distinta y realiza un revelado propio.

Uno de los problemas de esta técnica es el peligro de contaminación cruzada entre las muestras debido a la gran cantidad de fragmentos de ADN amplificados que pueden ser origen de una nueva amplificación, por lo que se deben extremar las medidas de precaución.

En cuanto a la extracción del ADN a partir de las muestras clínicas se han desarrollado un gran número de procedimientos distintos con la finalidad de separar el ADN del resto de los componentes celulares, con dos objetivos, recuperar la mayor cantidad posible de ADN a la vez que conseguir el menor número de otras sustancias contaminantes que puedan inhibir la reacción de

amplificación por interferencia la polimerasa. Además en el caso de la sangre estos procedimientos adquieren mayor importancia porque se ha demostrado que la hemina de los hematies inhibe la reacción de amplificación. En el caso del líquido cefalorraquídeo debemos recuperar la mayor cantidad de ADN posible, debido a la escasez de la muestra, mientras que la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción es menos importante.

Previamente al procesamiento de la sangre obtenida de los modelos animales establecidos, hemos realizado un estudio preliminar en el que comparamos varios sistemas de extracción de ADN. De todos los sistemas ensayados los mejores resultados se obtienen con los sistemas: tratamiento con proteinasa K, lisis alcalina y extracción fenol/cloroformo; separación previa de leucocitos con ISOLYMPH y tratamiento posterior con proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo; separación de leucocitos con Histopaque y tratamiento posterior con proteinasa K, lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo y el sistema comercial desarrollado por Promega llamado Wizard Genomic DNA Purification Kit. Estos cuatro sistemas se caracterizan en general por ser más complejos que los otros ensayados, pero son necesarios cuando se procesan muestras de sangre, ya que si empleamos procedimientos más simples no conseguiremos la purificación adecuada del ADN.

También se realizaron ensayos preliminares para establecer la mejor forma de extracción del ADN a partir del líquido cefalorraquídeo, observamos que las dos formas mejores son el tratamiento con proteinasa K con calentamiento a 100° posterior y el mismo tratamiento con posterior extracción con fenol/cloroformo.

En cuanto a la secuencia amplificada, hemos elegido una secuencia repetida 35 veces y descrita por Burg y cols. (131) del gen B1, Wastling y cols. comparan dos secuencias distintas correspondientes a los genes que

codifican la proteína P30 del taquizoito y el gen B1. La amplificación del gen B1 es más sensible que la amplificación del gen que codifica la proteína P30 (134).

La detección del fragmento del ADN amplificado mediante la utilización de sonda con revelado quimioluminiscente, hace que esta técnica pueda ser empleada en los laboratorios que no dispongan de instalaciones para la utilización de isótopos radioactivos. En los primeros momentos del desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa, las sondas empleadas en

la detección del amplificado estaban marcadas con fósforo 32, esto limitaba mucho su uso clínico. La sensibilidad, tanto en cuanto a límite de detección de la técnica como a comparación entre nuestros resultados y los de otros autores, confirma que el revelado quimioluminiscente es tan sensible como el que utiliza fósforo 32, pero al contrario que este no necesita de instalaciones especiales para su empleo.

En cuanto al límite de detección de la técnica se sitúa en 5 taquizoitos por mililitro de muestra, lo que está en el rango de otros autores, Burg y cols. detectan la presencia de un solo microorganismo cuando trabajan con un lisado de parásitos, mientras que detectan la presencia de 10 taquizoitos cuando trabajan con una mezcla de parásitos y leucocitos a razón de 1 parásito por cada 10^5 leucocitos (131). Grob y cols. detectan la presencia de 10 parásitos en 100 ul de muestra con gran cantidad de otras células (140).

La sangre obtenida de los modelos animales de toxoplasmosis experimental fueron procesados por los cuatro sistemas elegidos obteniendo por cualquiera de los cuatro resultados comparables, en el modelo de primoinfección por inoculación de taquizoitos de la cepa RH, se detecta la presencia de ADN en el suero desde el primer día postinoculación hasta la muerte de los

ratones. En el modelo de inoculación de la cepa cistógena por vía oral, aparece la presencia del ADN del parásito en los leucocitos de la sangre al tercer día posinoculación, detectándose hasta los 21 días extrayendo el ADN por cualquiera de las técnicas ensayadas. En cambio solamente se detectaba la presencia de ADN en los días 30 y 45 por las técnicas más sensibles. En cuanto al modelo de toxoplasmosis crónica reactivada, se detecta la presencia de ADN del parásito a partir del día 7 postinmunosupresión por todas las técnicas probadas.

Otros autores han evaluado la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en modelos animales, Weiss y cols. trabajan con un modelo de toxoplasmosis murina aguda, detecta la presencia de taquizoitos en los tejidos a los dos días después de la inoculación y en sangre se detectan a los cinco días postinoculación. Hitt y cols. comparan la utilidad diagnóstica en un modelo de toxoplasmosis experimental en conejos de la reacción en cadena de la polimerasa, el cultivo celular y la inoculación a ratón. Procesan los leucocitos de sangre periférica extraídos de los conejos inoculados y se detectan la presencia del parásito en el 62% de las muestras por inoculación a ratón, en el 37% por PCR y en el 25% por cultivo celular (132).

Cuando aplicamos el método en muestras de líquidos cefalorraquídeo de pacientes humanos, comprobamos que no hemos tenido ningún problema de contaminación ya que, además de los controles internos, en las muestras de pacientes inmunocompetentes sin toxoplasmosis activa y de pacientes inmunodeprimidos sin encefalitis toxoplásmica no se detectó la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* (Especificidad 100%). En cuanto a la sensibilidad observamos que existen algunas diferencias entre los dos procedimientos de extracción del ADN, inclinándonos por realizar el sistema de extracción número 2 (tratamiento con proteinasa K y calentamiento

a 100°C) y si el resultado es negativo, realizar en la misma muestra el proceso 3 (extracción con fenol/cloroformo a partir del último paso del proceso 2), ya que son completamente compatibles.

Hay mucha diferencia entre los líquidos cefalorraquídeos de pacientes con tratamiento antitoxoplásmico ya instaurado y en los no tratados. En el primer caso obtenemos una baja sensibilidad (20%), mientras que entre los no tratados la sensibilidad llega al 81,8%. Esto se corresponde a lo señalado por otros autores, Novati y cols. estudian 19 muestras de líquido cefalorraquídeo correspondientes a 19 pacientes con encefalitis toxoplásmica confirmada mediante biopsia cerebral y 16 líquidos cefalorraquídeos de 16 pacientes con encefalitis toxoplásmica confirmada por respuesta al tratamiento y imágenes sugerentes en el TAC, obtienen resultados positivos en 8/19 (42,1%) y 10/16 (62,5%) respectivamente; entre los que habían recibido terapia antitoxoplásmica durante más de una semana, la sensibilidad bajó al 29% (135).

Otros autores han evaluado la técnica en muestras humanas, con distintos resultados, Cristina y cols. estudian la presencia de *Toxoplasma gondii* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en muestras de líquido cefalorraquídeos y encuentran resultados positivos en 8 de 11 pacientes (136). Ostergaard y cols. estudian 5 líquidos cefalorraquídeos de pacientes con encefalitis toxoplásmica y obtienen resultados positivos en todos ellos, pero de los 33 muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes sin encefalitis toxoplásmica, obtienen un resultado falso positivo (137). Schoondermark-van-de-Ven y cols. ensayan la técnica en 20 líquidos cefalorraquídeos de pacientes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* y encefalitis toxoplásmica demostrada, en nueve LCR de pacientes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* pero sin encefalitis

toxoplásmica y en 4 LCR de pacientes sin anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*. Detecta la presencia del ADN del parásito en 13 de los 20 pacientes con encefalitis toxoplásmica y no detecta la presencia en ninguno de los pacientes sin encefalitis (140). Lebech y cols. dos líquidos cefalorraquídeos de pacientes con encefalitis toxoplásmica demostrada por métodos habituales y en 11 pacientes sin encefalitis toxoplásmica. Encuentran resultados positivos en los dos pacientes con encefalitis toxoplásmica comprobada, mientras que no detecta la presencia del ADN del parásito en los otros pacientes (142).

Por tanto, la reacción en cadena de la polimerasa es la única técnica que sirve para el diagnóstico de una gran parte de las encefalitis toxoplásmicas, esta técnica, con el desarrollo de sondas no isotópicas puede extenderse a muchos laboratorios clínicos, sin embargo, hay que señalar la necesidad de una mayor estandarización de la técnica y indicar que se pueden producir falsos negativos debido sobre todo a que cuando se extraiga la muestra el paciente esté recibiendo ya terapia antitoxoplásmica y quizás al poco volumen de muestra procesado en algunos casos.

6.7.- Sobre la quimioterapia.

El tratamiento de elección de la toxoplasmosis es la combinación de pirimetamina y sulfadiazina (o trisulfapirimidinas); sin embargo, este tratamiento no consigue eliminar la forma quística del parásito y, en pacientes con SIDA, provoca un alto índice de abandono de la terapia debido a la aparición de efectos secundarios. Así, el *Toxoplasma Encephalitis Study Group*, señala que se observaron síntomas de toxicidad, por esta asociación, en el 60% de los pacientes y que se suspendió el tratamiento en el 45% (58).

Por otra parte, el tratamiento con la asociación pirimetamina/sulfadiazina, a pesar de ser considerado

como de elección, no es completamente efectivo en estos pacientes; así Handler y cols obtienen una respuesta clínica satisfactoria en el 29% de los pacientes, una mejoría parcial en el 60% y un fallo en el tratamiento, con resultado de muerte, en el 11% de los casos; además, se observaron 10 episodios de recaída en 6 de 24 pacientes, que se controlaron con la combinación de pirimetamina y sulfadiazina en 8 de los casos (210).

Los resultados de nuestras experiencias señalan que la combinación pirimetamina-sulfadiazina, la azitromicina y la minociclina como los fármacos más eficaces. La azitromicina se revela, en estos ensayos, como el macrólido más prometedor, ya que no solo va a controlar la proliferación del parásito sino que, aparentemente, también consigue erradicarlo. Araujo y cols (160) obtuvieron resultados equiparables, en condiciones similares, y observaron que el tratamiento que hemos aplicado protegía al 80% de los ratones infectados intracerebralmente con *Toxoplasma gondii* (cepa C56), sugiriendo que la azitromicina alcanzaría concentraciones eficaces en el sistema nervioso central. En cuanto a la minociclina, este antibiótico (análogo a la tetraciclina) también muestra una gran actividad en el modelo murino de toxoplasmosis aguda, tal y como habían señalado Chang y cols. (176), autores que obtuvieron un 100% de curación tras tratar con dosis de 100 mg/kg, dos veces al día, durante 12 días, ratones infectados con 10^5 taquizoitos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH); en nuestro caso, tras administrar una sola dosis diaria de 200 mg/kg, durante 10 días, no se ha detectado infección residual.

Con la clindamicina hemos obtenido peores resultados, al igual que Piketty y cols (172); estos autores le reconocen cierto efecto inhibitorio (sobre la proliferación y difusión del parásito) pero no curativo - comportamiento que cabe, así mismo, deducir de nuestros datos- y también, como nosotros, consiguen una respuesta

mucho más satisfactoria con la clásica combinación de pirimetamina y sulfadiazina.

Los datos expuestos, fruto de ensayos "in vivo", pueden correlacionarse con los resultados obtenidos por otros autores en pruebas "in vitro". Harris y cols (162) por ejemplo, trabajando con cultivos celulares (cepa RH/mioblastos L₆ E₉), advierten la actividad y sinergismo de pirimetamina y sulfadiazina, mientras que la clindamicina, sola o en combinación con pirimetamina o sulfadiazina no muestra actividad. Respecto a los macrólidos, la azitromicina, roxitromicina, espiramicina y claritromicina revelan "in vitro" actividad inhibitoria (161). En estas condiciones, Huskinson-Mark y cols (164) observaron que, sobre la forma quística de *Toxoplasma gondii* (forma implicada en las reactivaciones de las infecciones crónicas latentes, como las que se producen en individuos inmunodeprimidos), la azitromicina mostraba mayor actividad que la pirimetamina, la sulfadiazina y la clindamicina.

En nuestras experiencias, la espiramicina, fármaco de elección para el tratamiento de la toxoplasmosis en la mujer embarazada, administrada a dosis de 200 mg/kg, diariamente, durante 10 días, no protege a ninguno de los animales de la infección letal con la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Con este macrólido, otros investigadores han obtenido mejores resultados, también en modelos murinos, aunque Chang y Pechère (156) no pudieron determinar la pauta de tratamiento que confiere un 100% de protección (dosis menores de las requeridas eran tóxicas para el ratón). En las mismas condiciones, la miokamicina y la roxitromicina tampoco se muestran eficaces, pero cuando este último antibiótico se administra con dosis de 200 mg/kg cada 12 horas, el 90% de los animales sobreviven, lo que no sucede con la miokamicina. Chan y Luft (153), después de tratar los ratones (infectados con 200 taquizoitos) con

roxitromicina, 10 mg/día, durante 21 días (lo que supone aproximadamente 666 mg/kg/día), consiguieron un 100% de supervivencia, detectando infección residual en todos los animales. Chang y Pechère obtuvieron resultados similares, tras recibir 5 dosis de 540 mg/kg/día, los ratones infectados con 5000 taquizoitos de la cepa RH sobrevivían, pero el 50% seguía albergando el parásito (156).

La claritromicina -200 mg/kg cada 24 horas- también confiere cierta protección aunque no elimina la infección. Chang y cols (159) trataron ratones infectados con 5000 taquizoitos con dosis de 300 mg/kg/día, durante 9 días, registrando un 100% de supervivencia y un 58% de infección residual.

Nuestros resultados, en concordancia con otros trabajos, sugieren que tanto la minociclina como la azitromicina pueden alcanzar una gran importancia clínica, como tratamientos alternativos a la combinación pirimetamina-sulfadiazina, en casos de que esta combinación no esté indicada; estos fármacos se muestran tanto "in vitro" como "in vivo", claramente superiores a la clindamicina, la claritromicina y la roxitromicina, que están utilizándose ya, solos o en asociación con la pirimetamina, en el tratamiento de algunos casos de toxoplasmosis humana (58,211,212,213,214,215,216,217).

En conclusión, creemos que debe plantearse el estudio de la verdadera utilidad de la minociclina y la azitromicina en el tratamiento de la toxoplasmosis humana, en casos en los que actualmente se recurre al uso de clindamicina, claritromicina y roxitromicina, pues parecen, mejores alternativas.

7.- RESUMEN

Toxoplasma gondii, cuya biología y encuadre taxonómico no se aclaró hasta la década de los setenta, cobró a partir de la segunda mitad de los ochenta nuevo interés al demostrarse su papel como infección oportunista en los pacientes con SIDA. La encefalitis toxoplásmica, por reactivación de una toxoplasmosis crónica, y la toxoplasmosis adquirida por los inmunosuprimidos, es uno de los riesgos frecuentes en estos enfermos. El diagnóstico adecuado del proceso es imprescindible para el establecimiento del tratamiento adecuado, evitando, por otra parte, la carga farmacológica innecesaria y cara de la profilaxis medicamentosa.

Mientras que el diagnóstico de las toxoplasmosis congénita o adquirida está bastante bien estandarizado, el diagnóstico de la toxoplasmosis en los enfermos con SIDA resulta difícil al carecer éstos de capacidad de respuesta inmunitaria. Ante esta necesidad, con el fin de ensayar en él, los métodos que se derivan de la detección de antígenos, la clase de inmunoglobulina presente, la avidéz como indicativo de antigüedad de la infección y la reacción en cadena de la polimerasa con sondas específicas, se diseñó un modelo laboratorial de trabajo, contrastando más tarde la eficacia de los métodos elaborados en él en pacientes humanos aquejados de encefalitis compatibles con toxoplasmosis.

Como primer paso en el establecimiento del modelo, buscamos y aislamos a partir de cerebro de gato, con la técnica que se describe, una cepa cistógena, capaz de la infección asintomática, por vía oral, con quistes y bradizoitos, de ratones NMRI. Se necroxiaron gatos desechados, procedentes del centro de recogida de animales de la Comunidad de Madrid y de Siruela (Badajoz), eligiendo la cepa 868 por su apatogenicidad y capacidad cistógena. La infección crónica producida por

esta cepa, se revierte a infección aguda, mortal para los ratones, mediante inmunosupresión farmacológica y depresión con un monoclonal de la población linfocítica. Al mismo tiempo y como contraste, se empleó, como agente causal de toxoplasmosis aguda (fase de agrupamientos con taquizoitos) la bien conocida cepa RH, mantenida en N₂ líquido.

La primera técnica puesta a punto con el modelo consistió en la detección de antígenos circulantes por ELISA. A este fin y por razones económicas, se prepararon policlonales antitoxoplasma por hiperinmunización de dos especies, cobayo y conejo. El ELISA doble capa detecta antígeno circulante tanto en la infección aguda como crónica, denunciando además la reactivación de la infección crónica de la cepa cistógena. Los resultados sobre el modelo experimental son excelentes. En la infección aguda por la cepa RH se detectan durante todo el período de la infección. En la crónica por la cepa cistógena, durante el tiempo de la infección aguda. La presencia de antígeno vuelve a resultar positiva después de la reactivación experimental de la infección crónica. El traslado de la técnica a la condición humana resultó poco convincente, con sensibilidad baja (12,5%) y especificidad del 93% en sangre periférica de los enfermos con encefalitis toxoplasma-compatible no tratados. Su sensibilidad en el líquido cefalorraquídeo de los mismos enfermos es aún menor. En ninguno de los enfermos tratados se detectó antígeno circulante. Ante estos resultados poco alentadores se exploró la utilidad de la dinámica de clases de anticuerpos, IgG, IgM e IgA, así como la avidéz de las IgG. La dinámica de las inmunoglobulinas en el modelo experimental fue el clásicamente conocido de detección temprana de la infección de la cepa virulenta y mas tardía de la cepa cistógena. Aunque la presencia y persistencia de IgM específica es, según diversos autores y los resultados

de este trabajo, muy frecuente, desaparece en la práctica en los inmunodeficientes con encefalitis toxoplásmica. En el modelo experimental, la IgA tiene un comportamiento prácticamente semejante a la IgM. Su interés diagnóstico en los pacientes inmunodeficientes con encefalitis demostró en nuestras manos, como las de autores precedentes, de valor relativo y poco concluyente. En todos los pacientes con encefalitis toxoplasma-compatible, se detectó la presencia de IgG. La técnica ELISA seguida, tuvo mayor sensibilidad que la aglutinación directa. Comprobamos la avidez de estas IgG específicas, que debe ser baja en las infecciones recientes y alta en las antiguas. En el modelo experimental, se demostró el valor diagnóstico de esta apreciación, al aparecer, consecuentemente a la rotura inmunitaria y recrudescencia, IgG de baja afinidad, lo que significa que la inmunosupresión lograda produjo la recrudescencia, pero permitió la producción (linfocitos memoria) de IgG. Los resultados en los pacientes humanos son diferentes. En los enfermos con encefalitis toxoplasma-compatibles, las IgG encontradas fueron de afinidad alta, lo que hace a la prueba irrelevante para el diagnóstico, pero, en sentido contrario, confirma una vez más, la alta frecuencia de reactivación de una infección crónica como causante de la encefalitis toxoplásmica en los inmunodeprimidos.

El diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requirió, ante la falta de estandarización de los pasos de la misma (extracción, iniciadores, ciclos de termociclador, etc.), el ensayo previo de fijación de las condiciones óptimas del proceso. Cuatro de los sistemas de extracción, sobre los ensayados, proporcionaron, en las muestras hemáticas, resultados aceptables, así como dos para las muestras del líquido cefalorraquídeo. Como iniciadores se utilizaron secuencias repetidas muchas veces en el gen B1 que

aumentan la sensibilidad. La sonda de hibridación reveladora, no isotópica, quimioluminiscente, acerca la técnica seguida a la generalidad de los laboratorios de análisis. De este modo, el límite experimental de detección alcanzado fue de 5 taquizoitos por muestra, lo que es muy útil.

En el modelo experimental, la técnica detecta zooitos en la sangre periférica desde el primer día de infección con la cepa virulenta. En la cepa cistógena, desde el 3° al 21° día de la infección, lo que viene a coincidir con el tiempo esperado de la fase inicial del ciclo; agrupamientos con taquizoitos. El método detecta, lo que es más importante, la reactivación de la infección crónica al 7° día postinmunosupresión. Su extensión al diagnóstico humano, en el líquido cefalorraquídeo, rindió excelentes resultados, con especificidad del 100% y sensibilidad del 81,8% en los pacientes con encefalitis toxoplasma-compatible no tratados. Parece que la detección de ADN específico del parásito es, por el momento, la técnica con mejores resultados.

En cuanto a los ensayos de quimioterapia podemos destacar la buena actividad antitoxoplásmica que presenta los fármacos utilizados clásicamente en el tratamiento de la toxoplasmosis, la combinación de la pirimetamina y sulfadiazina, también presentan buena actividad la minociclina y la azitromicina, mientras que presentan pobres resultados fármacos utilizados en el tratamiento de la toxoplasmosis en determinadas circunstancias como la espiramicina, la clindamicina, la claritromicina y la roxitromicina.

Se concluye la tesis con la sensación de haber cubierto, en buena parte, los objetivos propuestos, contribuyendo al diagnóstico y tratamiento racional de las recrudescencias por *Toxoplasma* en los enfermos con SIDA u otros procesos de inmunosupresión.

8.- CONCLUSIONES

1.- El modelo experimental elaborado: aislamiento de una cepa silvestre cistógena a partir de tejido cerebral de gato (cepa 868) , infección oral crónica asintomática de ratones NMRI y reactivación de la infección crónica, por depresión linfocitaria e inmunosupresores, resultó útil y suficiente para el ensayo de los métodos diseñados de diagnóstico de la reactivación toxoplasmósica . La infección aguda, como contraste necesario, se llevó a cabo por infección intraperitoneal de taquizoitos de la cepa RH.

2.- En el modelo experimental de reactivación focal de la toxoplasmosis crónica, resultó de utilidad para su diagnóstico, la observación de antígeno circulante, determinada por ELISA con policlonales heteroespecíficos, así como el cambio de avidéz de las IgG específicas y la presencia de DNA determinada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados sin embargo no son enteramente traspolables a la especie humana.

3.- Todas las encefalitis estudiadas en enfermos con SIDA, compatibles con toxoplasmosis, fueron, de acuerdo con la clase de inmunoglobulina presente y la alta afinidad de las IgG, recrudescencias de una infección crónica consecuyente de la inmunosupresión. La presencia de IgG específicas, en ausencia de IgM e IgA, en los pacientes inmunosuprimidos, puede considerarse como el indicativo principal de riesgo de encefalitis toxoplásmica.

4.- La detección de clases de Ig, IgM e IgA, carece de valor diagnóstico de la encefalitis toxoplásmica. Tampoco es útil la avidéz de la IgG, que no cambia como acontece en el modelo experimental.

5.- La detección por ELISA de antígenos, tanto en sangre como en LCR de enfermos con encefalitis compatible con toxoplasmosis, es de muy baja sensibilidad, e inútil por lo tanto para el diagnóstico etiológico del proceso.

6.- La reacción en cadena de la polimerasa, con las especificaciones que se indican, parece ser la técnica más útil en el diagnóstico. El revelado con sondas no radioactivas, extiende la técnica al uso de laboratorios de dotación ordinaria. Su sensibilidad es alta, especialmente en pacientes con encefalitis no tratadas con fármacos antitoxoplásmicos.

7.- En cuanto a los estudios de quimioterapia desarrollados sobre *Toxoplasma gondii*, además de comprobar la gran eficacia que presenta la combinación clásica de pirimetamina y sulfadiazina, destaca la buena actividad de la minociclina y la azitromicina, mientras que aparecen con baja actividad antitoxoplásmica fármacos empleados en el tratamiento de la toxoplasmosis humana como la espiramicina, la clindamicina, la claritromicina y la roxitromicina.

9.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sibley, L; Boothroyd, J. (1992). Virulence strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature, 359: 82-85.
- 2.- Frenkel, JK; Dubey, JP; Miller, NL. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. Science, 167: 893-896.
- 3.- Frenkel, JK. (1973). Toxoplasmosis: Parasite life cycle pathology and immunology. In: Hammond ND; Long PL. eds. The Coccidia. 343-410. University Park Press. Baltimore MD
- 4.- Wong, SY; Remington, JS.(1994). Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In Broder S; Merigan TC; Bolognesi D; eds. Medical management of AIDS 223-258. Baltimore: Willian & Wilkins
- 5.- Remington, JS; Cavanaugh, EN. (1965) Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. N. Engl. J. Med. 273: 1308-1310.
- 6.- Jacobs, L; Remington, JS; Melton, ML. (1960) The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 46: 11-21.
- 7.- Dubey, J; Kotula, A; Sharar, A. (1990) Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Parasitol. 76: 201.
- 8.- Dubey, JP. (1988) Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. Am. J. Vet. Res. 49: 910-913.
- 9.- Wallace, GD. (1973). The role of the cat in the natural history of *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22: 313-322.
- 10.- Wallace GD. (1969). Serologic and epidemiologic observations of toxoplasmosis on tree pacific atolls. Am. J. Epidemiol. 90: 103-111.
- 11.- Dubey, JP. (1986). A review of toxoplasmosis in pigs. Vet. Parasitol. 19: 181-223.

- 12.- Riemmann, HP; Meyer, ME; Theis, JH. (1975). Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. J. Pediatr. 87: 573-576.
- 13.- Swartzberg, JE; Remington, JS. (1975). Transmission of *Toxoplasma*. Am. J. Dis. Child. 129: 777-779.
- 14.- Remington, JS; McLeod, R; Desmonts, G. (1994) Toxoplasmosis. In: Remington JS; Clein J; eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4 th. ed. : WB Sanders . In Press. Philadelphia.
- 15.- Neu, HC. (1967). Toxoplasmosis trasmitted at autopsy. JAMA, 202: 284-285.
- 16.- Britt, RH; Enzmann, DR; Remington, JS. (1981). Intracranial infection in cardiac transplant recipients. Ann. Neurol 9: 107-119.
- 17.- Rynning, FW; McLeod, R; Maddox, JC. (1979). Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. Ann. Intern Med. 90: 47-49.
- 18.- Aikawa, M; Komata, Y; Asai, T. (1977). Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. Am. Pathol. 87: 285-296.
- 19.- Murray, HW; Juangbhanich, CW; Nathan, CF. (1979). Macrophage oxygen dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. J. Exp. Med. 150: 950.964.
- 20.- Sibley, LD; Weidner, E; Krahenbuhl, JL. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. Nature 315: 416-419.
- 21.- Adams, LB; Hibbs, JB Jr; Taintor, RR. (1990). Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 144: 2725-2729.
- 22.- Pfefferkorn, ER. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 908-912.
- 23.- Sabin, AB; Feldmann, HA. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new inmunity phenomenon

affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science 108: 660-663.

24.- Schreiber, RD; Feldman, HA. (1980). Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. J. Infect. Dis. 141: 366-369.

25.- Jones, TC; Hirsch, JG. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. J. Exp. Med 136: 1173-1194.

26.- Murray, H; Rubin, B; Masur, H. (1984). Impaired production of lymphokines and immune gamma interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Eng. J. Med. 310: 883.

27.- Murray, H; Welte, K; Jacobs. (1985). Production of and in vitro response to interleukin-2 in the acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Invest. 76: 1959-1964.

28.- Canessa, A; Del Bono, V; Miletich, F. (1992). Serum lymphokines in toxoplasmosis: increase levels of interferon-gamma in immunocompetent patients with lymphadenopathy but not in AIDS patients with encephalitis. J. Infect. Dis. 165: 1168-1170.

29.- Murray, HW; Gellene, RA; Livvy, DM. (1985). Activation of tissue macrophages from AIDS patients: in vitro response of AIDS alveolar macrophages to lymphokines and interferon-gamma. J. Immunol. 135: 2374-2377.

30.- Murray, HW; Scavuzzo, D; Jacobs, JL. (1987). In vitro and in vivo activation of human mononuclear phagocytes by interferon gamma. Studies with normal and AIDS monocytes. J. Immunol. 138: 2457-2462.

31.- Wong, SW; Remington, JS. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS 7: 299-316

32.- Neimark, H. Blaker, RG. (1967). DNA base composition of *Toxoplasma gondii* grown in vivo. Nature 216: 600.

- 33.- Johnson, AM, Dubey, JP, Dame, JB. (1986). Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 64: 351-355.
- 34.- Sibley, L, Boothroyd, J. (1992). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 51: 291-300.
- 35.- Remington, JS. (1974) Toxoplasmosis in the adult. Bull. NY Acad. Med. 50: 211.
- 36.- McCabe, RE, Brooks, RG, Dorfman, RF. (1987) Clinical spectrum of 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. Rev. Infect. Dis. 9: 754.
- 37.- Kean, BH. (1972) Clinical toxoplasmosis: 50 years. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 549.
- 38.- Faruqi, AMA, Frank, M, Rosvali, RV. (1976) Acute acquired toxoplasmosis. South. Med. J. 69: 1234.
- 39.- Masur, H; Jones, TC; Lempert, JA. (1978) Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. Am. J. Med. 66: 396.
- 40.- Perkins, FS. (1973) Ocular toxoplasmosis. Br. J. Ophthalmol. 57: 1
- 41.- Koch, FLP; Wolf, A; Cowen, D. (1943) Toxoplasmic encephalomyelitis. VII. Significance of ocular lesions in the diagnosis of infantile or congenital toxoplasmosis. Arch. Ophthalmol. 29: 1
- 42.- Luft, BJ; Remington, JS. (1988) AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis. J. Infect. Dis 157: 1-6.
- 43.- Dannemann, B; McCutchan, JA; Israelsky, D. (1992) Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin of pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative treatment group. Ann. Intern. Med 116: 33-43.
- 44.- Tirard, V; Niel, G; Rosenheim, M. (1991) Diagnosis of toxoplasmosis in patients with AIDS by isolation of the parasite from the blood. N. Eng. J. Med. 324: 6-34.

- 45.- Hoffin, JM; Remington, JS. (1985) Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS. Arch. Intern. Med. 145: 925-926.
- 46.- Luft, BJ; Remington, JS. (1992) Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin. Infect. Dis. 15: 211-222.
- 47.- Israelsky, D; Remington, JS. (1995) AIDS-associated toxoplasmosis. In Sande M; Volverding P; eds. Medical management of AIDS. : WB Sanders. In press. Philadelphia.
- 48.- Zangerle, R; Allerberger, F; Pohl, P. (1991) High risks of developing toxoplasmosis encephalitis in AIDS patients seropositive to *Toxoplasma gondii*. Meth. Microbiol. Immunol. 180: 59-66.
- 49.- Israelsky, D; Remington, JS. (1993) Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. In: Remington JS; Schwartz M; eds. Current clinical topics in infectious diseases. v. 13, 322-356. Blackwell Scientific Publication; Boston.
- 50.- Partisani, M; Candolfi, E; Mautort, ED. (1991) Seroprevalence of latent *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected individual and long-term follow up of toxoplasma seronegative subjects. VII International Conference of AIDS; Florence, Italy, Abstract PoB 125.
- 51.- Wallace, MR; Rossetti, RJ; Olson, TE. (1993) Cats and toxoplasmosis in HIV-infected adults. JAMA 269: 76-77.
- 52.- Moskowitz, LB; Hensley, GT; Chan, JC. (1984) Brain biopsies in patients with acquired immune deficiency syndrome. Arch. Pathol. Lab. Med. 108: 368-371.
- 53.- Casado Naranjo, I; Lopez Trigo, J; Ferrandiz. (1988) Hemorrhagic abscess in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Neuroradiology 31: 289.
- 54.- Herskovith, S; Siegel, SE; Scheider, AT. (1989) Spinal cord toxoplasmosis in AIDS. Neurology 39: 1552-1553.
- 55.- Kong, MA; Matheron, S; Marche, C. (1990) Diffuse

toxoplasmic encephalitis (DTE) without abscess in AIDS patient. 30th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Atlanta, Georgia, p 279, abstract 1157.

56.- Levy, RM; Bredesen, DE; Roseblum, ML. (1985) Neurological manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): Experience at UCSF and review of the literature. J. Neurosurg. 62: 475-495.

57.- Navia, BA; Petito, CK; Gold, JW. (1986) Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. Br. Med. J. 292: 1108

58.- Haverkos, HV. (1987) Assessment of therapy for *Toxoplasma* encephalitis. The TE study group. Am. J. Med. 82: 907-914.

59.- Cohn, J; McMeeking, A; Cohen, W. (1989) Evaluation of the policy of empiric treatment of suspected *Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Med. 86: 521-527.

60.- Hamed, LM; Schatz, NJ; Galetta, SL. (1988) Brainstem ocular motility defects and AIDS. Am. J. Ophthalmol. 106: 437-442.

61.- Carrazana, EJ; Rositch, EJ; Samuels, MA. (1989) Parkinsonian symptoms in a patient with AIDS and cerebral toxoplasmosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 52: 1445-1446.

62.- Tolgoue, CF; Factor, SA. (1991) Focal dystonia secondary to cerebral toxoplasmosis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. Mov. Disord. 6: 69-72.

63.- Koppel, DS; Daras, M. (1990) "Rubral" tremor due to mid brain toxoplasma abscess. Mov. Disord. 5: 254-256.

64.- Sánchez Ramos, JR; Factor, SA; Weiner, WK. (1989) Hemichorea-hemiballismus associated with acquired immune deficiency syndrome and cerebral toxoplasmosis. Mov. Disord. 4: 266-273.

- 65.- Milligan, SA; Kath, MS; Kraven, TC. (1984) Toxoplasmosis presenting as panhypopituitarism in a patients with acquired immune deficiency syndrome. Am. J. Med. 77: 760-764.
- 66.- Luft, BJ; Brooks, RG; Conley, FK. (1984) Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. JAMA 252: 913-917.
- 67.- Wijdicks, EFM; Borleffs, JCC; Hoepelman, AIM. (1991) Fatal disseminated hemorrhagic toxoplasmic encephalitis as the initial manifestation of AIDS. Ann. Neurol. 29: 683-686.
- 68.- Gray, F; Gherardi, R; Windate, E. (1989) " Diffuse encephalitic" cerebral toxoplasmosis in AIDS. J. Neurol. 236: 273-277.
- 69.- Ciricillo, SF; Rosebūlm, ML. (1991) Use of CT and MR imalling to distinguish intracraneal lesions and to defined the need for biopsy in AIDS patients. J. Neurodurq. 74: 10-29.
- 70.- Porter, SB; Sande, MA. (1988) Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immune deficiency syndrome. Ann. Intern. Med 108: 49-51.
- 71.- Levy, RM; Rosebloom, S; Perrett, LV. (1986) Neuroradiologic findings in AIDS: a review of 200 cases. Am. Neuroradiol. 147: 977-983.
- 72.- De la Paz, R; Enzmann, D. (1988) Neuroradiology of acquired immune deficiency syndrome. In: Rosebloom ML; eds. AIDS and the nervous system. 121-154. Raven Press, New York
- 73.- Renold, C; Sugar, A; Chave, JP. (1992) *Toxoplasma* encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. Medicine 71: 224-239.
- 74.- Israelski, DM; Remington, JS. (1988) Toxoplasmic Encephalitis in Patients with AIDS. Infect. Dis. Clin. North Am. 2: 429-445.
- 75.- Oksenhendler, E; Charreau, I; Tournerie C; Azihary M; Carbon C; Aboulker JPTI. (1994) *Toxoplasma gondii*

- infection in advanced HIV infection. AIDS. 8 (4): 483-7
- 76.- Zangerle, R; Allerberger, FTI. (1994) High risk of developing toxoplasmic encephalitis in AIDS patients seropositive to *Toxoplasma gondii*. J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 7 (2): 207-8
- 77.- Noguez, A; Garcia, M; Ribelles, E; Rivas, C. (1993) Acute toxoplasmosis. Laboratory diagnosis. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 11 (1): 4-7
- 78.- Porter, SB; Sande, MA. (1992) Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome.
N. Engl. J. Med. 327 (23): 1643.
- 79.- Israelski, DM; Remington, JS. (1988) Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Infect. Dis. Clin. North. Am. 2 (2): 429-45.
- 80.- Gazzinelli, R; Xu, Y; Hieny, S; Cheever, A; Sher, A. (1992) Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 149 (1): 175-80
- 81.- Suzuki, Y; Conley, FK; Remington, JS. (1989) Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. J. Immunol. 143: 2045-2050.
- 82.- Pomaroy, C; Kline, S; Jordan, MC; Filice GA. (1989) Reactivation of *Toxoplasma gondii* by citomegalovirus disease in mice: antimicrobial activities of macrophages. J. Infect. Dis. 160: 305-311.
- 83.- Hoffin, JM; Conley, FK; Remington, JS. (1987) Murine model of intracerebral toxoplasmosis. J. Infect. Dis 155: 550-557.
- 84.- Vollmer, TL; Waldor, MK; Steinman, L; Conley FK. (1987) Depletion of T-4 lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system: a model of superinfection in AIDS. J. Immunology 138: 3737-3741.
- 85.- McCabe, RE; Luft, BJ; Remington JS. (1986) The

effects of cyclosporine on *Toxoplasma gondii* in vivo and in vitro. Transplantation 41: 611-615.

86.- Hulinska, D; Sykora, J; Zastera, M. (1990) Effect of cortisone on *Toxoplasma gondii* infection studied by electron microscopy. Folia Parasitologica 37: 207-212.

87.- Araujo, FG. (1991) Depletion of L3T4 (CD4) T Lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. Infect. Immun. 59: 1614-1619.

88.- Carrof, B; Levacher Clergeot, M; Chau, F; Pocardalo, JJ; Derouin, F. (1994) *Toxoplasma gondii*: kinetics of lymphocyte subsets in blood and spleen of perorally infected mice. Exp. Parasitol. 78 (4): 410-7

89.- Derouin, F; Garin, YJ. (1991) *Toxoplasma gondii*: blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. Exp. Parasitol. 73 (4): 460-8

90.- Engvall, E; Perlmann, P. (1971) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8: 871-874.

91.- Van Weemen, B; Schuurs, A. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Lett. 15: 232-236.

92.- Lovborg, L. (1980) Guide to solid phase immunoassays. A/S Nunc, Denmark.

93.- Acebes, MV; Diez, B; Garcia Rodríguez, JA; Viens, P; Cisterna, R. (1994) Detection of circulating antigens in the diagnosis of acute toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51 (4): 506-11

94.- Guo, XH; Chen, GJ; Hsu, PK; Liu, DH; Zheng, HQ. (1991) Studies on the determination of the circulating antigen in experimental toxoplasmosis. Chung Kuo Chi Sheng Chung Hsueh Yu Chi Sheng Chung Ping Tsa Chih. 9 (3): 178-81

95.- Muller, WA; Koch, G; Becker, K. (1991) Experimental animal studies for the detection of circulating *Toxoplasma* antigens. Angew. Parasitol. 32 (2). P 93-8.

96.- Hassl, A; Auer, H; Hermentin, K; Picher, O; Aspöck, H. (1987) Experimental studies on circulating antigen of

Toxoplasma gondii in intermediate hosts: criteria for detection and structural properties. Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg. 263 (4): 625-34.

97.- Suzuki, Y; Kobayashi, A. (1987) Presence of high concentrations of circulating *Toxoplasma* antigens during acute *Toxoplasma* infection in athymic nude mice. Infect. Immun. 55 (4): 1017-8.

98.- Ise, Y; Iida, T; Sato, K; Suzuki, T; Shimada, K; Nishioka, K. (1985) Detection of circulating antigens in sera of rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 48 (1): 269-72.

99.- Nakao, M; Miyamoto, K; Kutsumi, H. (1984) Studies on the circulating antigens in murine toxoplasmosis. Hokkaido Igaku Zasshi. 59 (1): 59-63.

100.- Turunen, HJ. (1983) Detection of soluble antigens of *Toxoplasma gondii* by a four-layer modification of an enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol. 17 (5):768-73.

101.- Dannemann, BR; Israelski, DM; Leoung, GS; McGraw, T; Mills, J; Remington, JS. (1991) *Toxoplasma* serology, parasitemia and antigenemia in patients at risk for toxoplasmic encephalitis. AIDS. 5 (11): 1363-5

102.- Hassl, A; Aspöck, H; Flamm, H. (1988) Circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in patients with AIDS: significance of detection and structural properties. Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg. 270 (1-2): 302-9.

103.- Candolfi, E; Derouin, F; Kien, T. (1987) Detection of circulating antigens in immunocompromised patients during reactivation of chronic toxoplasmosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 6 (1): 44-8.

104.- Brooks, RG; Sharma, SD; Remington, JS. (1985) Detection of *Toxoplasma gondii* antigens by a dot-immunobinding technique. J. Clin. Microbiol. 21 (1):113-6.

105.- Pinon, JM; Thoannes, H; Gruson, N. (1985) An enzyme-linked immunofiltration assay used to compare infant and maternal antibody profiles in toxoplasmosis.

J. Immunol Methods 77: 15-23.

106.- Sulzer, A; Franco, EL; Takafuji, E; Benenson, M; Walls, KW; Greenup, RL. (1986) An oocyst transmitted outbreak of toxoplasmosis: patterns of immunoglobulin G and M over one year. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 290-296.

107.- Brooks, RG; McCabe, RE; Remington, JS. (1987) Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. Rev. Infect. Dis. 9 :1055-1062.

108.- Herbring, P; Van Loon, AM; Rotmans, JP; Van Knapen, F; Van Dijk, WC. (1987) Interlaboratory evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay, antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol 25: 100-105.

109.- Del Bono, V; Canessa, A; Bruzzi, P; Fiorelli, MA; Terragna, A. (1989) Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. J. Clin. Microbiol. 27: 2133-2135.

110.- Jaqueti Aroca, J; Hernandez Garcia, R; Navarro Gallar, F. Garcia Esteban RJ. Martinez-Hernandez D. (1989) Persistencia de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 7(8): 450-1.

111.- Holliman, RE; Johnson, JD; Gillespie, SH; Johnson, MA; Squire, SB; Savva, D. (1991) New methods in the diagnosis and management of cerebral toxoplasmosis associated with the acquired immune deficiency syndrome. J. Infect. 22 (3): 281-5.

112.- Derouin, F; Thulliez, P; Garin, YJ. (1991) Value and limitations of toxoplasmosis serology in HIV patients. Pathol. Biol. (Paris) 39(4):255-9.

113.- Holliman, RE. (1990) Serological study of the prevalence of toxoplasmosis in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus. Epidemiol. Infect. 105 (2): 415-8.

- 114.- Grant, IH; Gold, JW; Rosenblum, M; Niedzwiecki, D; Armstrong, D. (1990) *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. AIDS. 4 (6): 519-21.
- 115.- Turunen, H; Vuorio, KA; Leinikki, PO. (1993) Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) . Scand. J. Infect. Dis. 15 (3): 307-11.
- 116.- Zufferey, J; Sugar, A; Rudaz, P; Bille, J; Glauser, MP; Chave, JP. (1993) Prevalence of latent toxoplasmosis and serological diagnosis of active infection in HIV-positive patients. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis 12: 591-595.
- 117.- Acebes, MV; Diez, B; Nicolas, R; Martin, MT; Sunen, E; Cisterna, R. (1994) Serological parameters for the diagnosis and follow-up of toxoplasmosis. Experimental models. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 12 (3): 141-5
- 118.- Derouin, F. (1990) Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. Infect. Immun. 58 (8): 2446-51.
- 119.- Jaqueti, J; Nicolas, D; Navarro Gallar, F. (1994) Persistence of IgA antibodies against *Toxoplasma gondii* with ELISA. Med. Clin. Barc. 103 (5): 197
- 120.- Francis, JM; Joynson, DHTI. (1993) Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (7): 556-9
- 121.- Patel, B; Young, Y; Duffy, K; Tanner, RP; Johnson, J; Holliman, RE. (1993) Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. J. Med. Microbiol. 38 (4): 286-92
- 122.- Pinon, JM; Thoannes, H; Pouletty, PH; Poirriez, J; Damiens, J; Pelletier, P. (1986) Detection of IgA

specific for toxoplasmosis in serum and cerebrospinal fluid using a non-enzymatic IgA capture assay. Diagn. Immunol. 4 (5):223-7.

123.- McLeod, R; Mack, DG. (1986) Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 136 (7):2640-3.

124.- Pinon, F; Foudrinier, G; Mougeot, C; Marx, D; Aubert, O; Toupance, G; Niel, M; Danis, P; Camerlynck, G; Remy, J; Frottier, D; Jolly, M.H; Bessieres, D; Richard-Lenoble, A; Bonhomme, A. (1995) Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (Ig A), Ig E, and Ig M and analytical study of specific Ig G in immunodeficient patients. J. Clin Microbiol 33: 878-884

125.- THolliman, RE; Raymond, R; Renton ,N; Johnson ,JDI. (1994) The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. Epidemiol. Infect. 112 (2): 399-408

126.- Lappalainen, M; Koskela, P; Koskiniemi, M; Ammala, P; Hiilesmaa V; Teramo K; Raivio KO; Remington JS; Hedman K. (1993) Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. J. Infect. Dis. 167 (3): 691-7

127.- Hedman, K; Lappalainen, M; Seppaia, I; Makela, O. (1989) Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. J. Infect. Dis. 159 (4): 736-40.

128.- Kleppe, KE, Ohtsuka, PF, Kepple, R, Molineux, R, Khorana, HG. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J. Mol. Biol. 56 : 341-361.

129.- Ambroise Thomas, P. Cristina, N. (1991) Results and contributing prospects of molecular probes and genetic amplification in vitro (PCR) in toxoplasmosis. Bull. Acad. Natl. Med. 175 (1): 39-47.

130.- Savva, D; Morris, JC; Johnson, JD; Holliman, RE. (1990) Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. J. Med. Microbiol. 32 (1): 25-31.

- 131.- Burg, JL; Grover, CM; Pouletty, P; Boothroyd, JC. (1989) Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27 (8): 1787-92.
- 132.- Hitt, G; Filice, A. (1992) Detection of *Toxoplasma gondii* parasitaemia by gene amplification, cell culture and mouse inoculation. J. Clin. Microbiol 30: 3181-3184.
- 133.- Guay, JM; Dubois, D; Morency, MJ; Gagnon, S; Mercier, J; Levesque, RC. (1993) Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31: 203-207.
- 134.- Wastling, JM; Nicoll, S; Buxton, D. (1993) Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. J. Med. Microbiol. 38: 360-364.
- 135.- Novati, R; Castagna, A; Morsica, G; Vago, L; Tambussi, G; Ghezzi, S; Gervasoni, C; Bisson, C; d'Arminio Monforte, A; Lazzarin, A. (1994) Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. AIDS. 8 (12): 1691-4
- 136.- Cristina, N; Pelloux, H; Goulhot, C; Brion, JP; Leclercq, P; Ambroise Thomas, PTI. (1993) Detection of *Toxoplasma gondii* in AIDS patients by the polymerase chain reaction. Infection. 21 (3): 150-3
- 137.- Ostergaard, L; Nielsen, AK; Black, FTI. (1993) DNA amplification on cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis among HIV-positive patients with signs or symptoms of neurological disease. Scand. J. Infect. Dis. 25 (2): 227-37
- 138.- Schoondermark van de Ven, E; Galama, J; Kraaijeveld, C; van Druten, J; Meuwissen, J; Melchers, W. (1993) Value of the polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid

- from patients with AIDS. Clin. Infect. Dis. 16 (5): 661-6
- 139.- Brezin, AP; Egwuagu, CE; Burnier, M Jr; Silveira, C; Mahdi, RM; Gazzinelli, RT; Belfort, R Jr; Nussenblatt, RB. (1990) Identification of *Toxoplasma gondii* in paraffin-embedded sections by the polymerase chain reaction. Am. J. Ophthalmol. 110 (6): 599-604.
- 140.- Grob, U; Roggenkamp, A; Janitschke, K; Heesemann, J. (1992) Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. 11: 33-39.
- 141.- E. Van de Ven, W. Melchers, J. Galama, W. Camps, J. Meuwissen. (1991) Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification. J. Clin. Microbiol. 29: 2120-2124.
- 142.- M. Lebech, A.M. Lebech, S. Nelsing, J. Vuust, L. Mathiesen, E. Petersen. (1992) Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from AIDS patients with cerebral toxoplasmosis. J. Infect. Dis 165: 982-3.
- 143.- J.D. Johnson, P.D. Butcher, D. Savva, R.E. Holliman. (1993) Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. J. Infect. 26: 147-158.
- 144.- Nguyen BT; Stadtsbaeder S. (1983) Comparative effects of cotrimoxazole (trimethoprim-sulphamethoxazole), pirimethamine-sulphadiazine and spiramycin during avirulent infection with *Toxoplasma gondii* (Beverley strain) in mice. Br. J. Pharmacol. 79 (4): 923-8.
- 145.- Nguyen BT; Stadtsbaeder S. (1985) Comparative effects of cotrimoxazole (trimethoprim-sulphamethoxazole) and spiramycin in pregnant mice infected with *Toxoplasma gondii* (Beverley strain). Br. J. Pharmacol. 85 (3): 713-6.
- 146.- Harper JS; London WT; Sever JL. (1985) Five drug

regimens for treatment of acute toxoplasmosis in squirrel monkeys. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 (1): 50-7.

147.- Kovacs JA; Allegra CJ; Chabner BA; Swan JC; Drake J; Lunde M; Parrillo JE; Masur H. (1987) Potent effect of trimetrexate, a lipid-soluble antifolate, on *Toxoplasma gondii*. J. Infect. Dis. 155 (5): 1027-32.

148.- Allegra CJ; Kovacs JA; Drake JC; Swan JC; Chabner BA; Masur H. (1987) Potent in vitro and in vivo antitoxoplasma activity of the lipid-soluble antifolate trimetrexate. J. Clin. Invest. 79 (2): 478-82.

149.- Kovacs JA; Allegra CJ; Swan JC; Drake JC; Parrillo JE; Chabner BA; Masur H. (1988) Potent antipneumocystis and antitoxoplasma activities of piritrexim, a lipid-soluble antifolate. Antimicrob. Agents Chemother. 32 (4): 430-3.

150.- Derouin F; Chastang C. (1989) In vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 33 (10): 1753-9.

151.- Chang HR; Arsenijevic D; Comte R; Polak A; Then RL; Pechere JC. (1994) Activity of epiroprim (Ro 11-8958), a dihydrofolate reductase inhibitor, alone and in combination with dapsone against *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 38 (8): 1803-7

152.- Terragna A; Canessa A; Terragna FM; Corradino L. (1984) Attivita della clindamicina e della josamicina nell'infezione sperimentale da *Toxoplasma gondii*. Minerva Med. 75 (39):2305-8.

153.- Chan J; Luft BJ. (1986) Activity of roxithromycin (RU 28965), a macrolide, against *Toxoplasma gondii* infection in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 30 (2): 323-4.

154.- Chang HR; Pechere JC. (1987) Activity of roxithromycin against *Toxoplasma gondii* in murine models. J. Antimicrob. Chemother. 20 Suppl B: 69-74.

155.- Luft BJ. (1987) In vivo and in vitro activity of

roxithromycin against *Toxoplasma gondii* in mice. Eur. J. Clin. Microbiol. 6 (4): 479-81.

156.- Chang HR; Pechere JC. (1987) Effect of roxithromycin on acute toxoplasmosis in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 31 (7):1147-9.

157.- Hofflin JM; Remington JS. (1987) In vivo synergism of roxithromycin (RU 965) and interferon against *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 31 (2):346-8.

158.- Chang HR; Pechere JC. (1988) Activity of spiramycin against *Toxoplasma gondii* in vitro, in experimental infections and in human infection. J. Antimicrob. Chemother. 22 Suppl B: 87-92.

159.- Chang HR; Rudareanu FC; Pechere JC. (1988) Activity of A-56268 (TE-031), a new macrolide, against *Toxoplasma gondii* in mice. J. Antimicrob. Chemother. 22 (3): 359-61.

160.- Araujo FG; Guptill DR; Remington JS. (1988) Azithromycin, a macrolide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 32 (5): 755-7.

161.- Chang HR; Pechere JC. (1988) In vitro effects of four macrolides (roxithromycin, spiramycin, azithromycin [CP-62,993], and A-56268) on *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 32 (4): 524-9.

162.- Harris C; Salgo MP; Tanowitz HB; Wittner M. (1988) In vitro assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii*. J. Infect. Dis. 157 (1):14-22.

163.- Chamberland S; Kirst HA; Current WL. (1991) Comparative activity of macrolides against *Toxoplasma gondii* demonstrating utility of an in vitro microassay. Antimicrob. Agents Chemother. 35 (5):903-9.

164.- Huskinson Mark J; Araujo FG; Remington JS. (1991) Evaluation of the effect of drugs on the cyst form of *Toxoplasma gondii*. J. Infect. Dis. 164 (1):170-1.

165.- Araujo FG; Remington JS. (1991) Synergistic

activity of azithromycin and gamma interferon in murine toxoplasmosis. Antimicrob. Agents Chemother. 35 (8):1672-3.

166.- Araujo FG; Shepard RM; Remington JS. (1991) In vivo activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10 (6): 519-24.

167.- Derouin F; Almadany R; Chau F; Rouveix B; Pocidalo JJ. (1992) Synergistic activity of azithromycin and pyrimethamine or sulfadiazine in acute experimental toxoplasmosis. Antimicrob. Agents Chemother. 36 (5): 997-1001

168.- Araujo FG; Lin T; Remington JS. (1992) Synergistic combination of azithromycin and sulfadiazine for treatment of toxoplasmosis in mice. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11 (1): 71-3

169.- Alder J; Hutch T; Meulbroek JA; Clement JC. (1944) Treatment of experimental *Toxoplasma gondii* infection by clarithromycin-based combination therapy with minocycline or pyrimethamine. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 7 (11): 1141-8

170.- Dumas JL; Chang R; Mermillod B; Piguet PF; Comte R; Pechere JC. (1994) Evaluation of the efficacy of prolonged administration of azithromycin in a murine model of chronic toxoplasmosis. J. Antimicrob. Chemother. 34 (1): 111-8

171.- Mack DG; McLeod R. (1984) New micromethod to study the effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii*: comparison of sulfadoxine and sulfadiazine individually and in combination with pyrimethamine and study of clindamycin, metronidazole, and cyclosporin A. Antimicrob. Agents Chemother. 26 (1): 26-30.

172.- Piketty C; Derouin F; Rouveix B; Pocidalo JJ. (1990) In vivo assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii* by quantification of parasites in the blood, lungs, and brain of infected mice. Antimicrob.

Agents Chemother. 34 (8):1467-72.

173.- Filice GA; Pomeroy C. (1991) Effect of clindamycin on pneumonia from reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 35 (4):780-2.

174.- Pfefferkorn ER; Nothnagel RF; Borotz SE (1992) Parasitocidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant.

Antimicrob. Agents Chemother. 36 (5): 1091-6

175.- Chang HR; Comte R; Pechere JC. (1990) In vitro and in vivo effects of doxycycline on *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 34 (5):775-80.

176.- Chang HR; Comte R; Piguet PF; Pechere JC. (1991) Activity of minocycline against *Toxoplasma gondii* infection in mice. J. Antimicrob. Chemother. 27 (5):639-45.

177.- Araujo FG; Huskinson J; Remington JS. (1991) Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 35 (2): 293-9.

178.- Hudson AT; Dickins M; Ginger CD; Gutteridge WE; Holdich T; Hutchinson DB; Pudney M; Randall AW; Latter VS. (1991) 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. Drugs Exp. Clin. Res. 17 (9): 427-35

179.- Araujo FG; Huskinson Mark J; Gutteridge WE; Remington JS. (1992) In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against the cyst form of *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 36 (2): 326-30

180.- Gutteridge WE . (1991) 566C80, an antimalarial hydroxynaphthoquinone with broad spectrum: experimental activity against opportunistic parasitic infections of

- AIDS patients. J. Protozool. 38 (6): 141S-143S
- 181.- Araujo FG; Lin T; Remington JS. (1993) The activity of atovaquone (566C80) in murine toxoplasmosis is markedly augmented when used in combination with pyrimethamine or sulfadiazine. J. Infect. Dis. 167 (2): 494-7
- 182.- Suzuki Y; Conley FK; Remington JS. (1990) Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. Infect. Immun. 58 (9): 3050-5.
- 183.- Bakhtari SK; Jira J. (1988) Chemotherapy of experimental toxoplasmosis with special reference to robenidine. Folia Parasitol. (Praha) 35 (3): 193-8.
- 184.- Ferrante A; Ljungstrom I; Lederer E. (1988) Antitoxoplasmosis properties of sinefungin in mice. C. R. Acad. Sci. [III]. 306 (3): 109-13.
- 185.- Israelski DM; Tom C; Remington JS. (1989) Zidovudine antagonizes the action of pyrimethamine in experimental infection with *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 33 (1): 30-4.
- 186.- Chang HR; Jefford CW; Pechere JC. (1989) In vitro effects of three new 1,2,4-trioxanes (pentatroxane, thiahexatroxane, and hexatroxanone) on *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 33 (10): 1748-52.
- 187.- Furet YX; Pechere JC. (1991) Newly documented antimicrobial activity of quinolones. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10 (4): 249-54.
- 188.- Derouin F; Piketty C; Chastang C; Chau F; Rouveix B; Pocidalo JJ. (1991) Anti-*Toxoplasma* effects of dapsone alone and combined with pyrimethamine. Antimicrob. Agents Chemother. 35 (2): 252-5.
- 189.- Lindsay DS; Blagburn BL; Hall JE; Tidwell RR. (1991) Activity of pentamidine and pentamidine analogs against *Toxoplasma gondii* in cell cultures. Antimicrob. Agents Chemother. 35 (9): 1914-6
- 190.- Lindsay DS; Blagburn BL. (1994) Activity of diclazuril against *Toxoplasma gondii* in cultured cells

- and mice. Am. J. Vet. Res. 55 (4): 530-3
- 191.- Araujo FG; Slifer T; Remington JS. (1994) Rifabutin is active in murine models of toxoplasmosis. Antimicrob. Agents Chemother. 38 (3): 570-5
- 192.- Blewett DA; Miller JK; Harding J. (1983) Simple technique for the direct isolation of *Toxoplasma* tissue cysts from fetal ovine brain. Veterinary Record 112: 98-100.
- 193.- Rodríguez Díaz JC; Martínez Grueiro MM; Martínez Fernández AR. (1993) Actividad comparada de varios antibióticos frente a *Toxoplasma gondii* en un modelo murino. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 11 (10): 543-546.
- 194.- Hoshino-Shimizu S; Mineo JR; Camargo MA. (1980) Lectin used in the purification process of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. J. Parasitol 66 (6): 989-991.
- 195.- Sambrook J; Fritsch EF; Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. 18.10. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- 196.- Joynton DYM; Paine RA; Balfour AH; Prestage ES; Fleck DG. (1989) Five commercial enzyme linked immunosorbent assay for toxoplasma specific IgM antibody. J. Clin. Pathol. 42: 653-657.
- 197.- Wilson M; Ware DA; Walls NK. (1987) Evaluation of commercial serodiagnostic kits for toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 25: 2262-2265.
- 198.- Verhofstede C; Van Renterghem L; Plum J. (1989) Comparison of six commercial enzyme linked immunosorbent assays for detecting IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Pathol. 42: 1285-1290.
- 199.- Bono V; Canessa A; Bruzzi P; Fiorelli MA; Terragna A. (1989) Significance of specific IgM in the chronological diagnosis of 38 case of toxoplasmic lymphadenopathy. J. Clin. Microb. 27: 2133-2135.
- 200.- Van Knapen F; Panggabean SO; Van Leusden J. (1987) Evaluation of laboratory diagnosis of toxoplasmosis by

means of an ELISA triple test. Detection of class specific IgG, IgM and circulating antigens. J. Clin. Microbiol. 25: 1234-1237.

201.- Turunen HJ. (1983) Detection of soluble antigens of *Toxoplasma gondii* by a four-layer modification of an enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol. 17: 768-773.

202.- Lindenschmidt EG. (1985) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of soluble *Toxoplasma gondii* antigen in acute-phase toxoplasmosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 4: 488-492.

203.- Einsele H, Ehninger G, Steidle M, Vallbracht A, Muller M, Scdmidt H, Saal JG, Waller HD, Muller CA. (1991) Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. Lancet 338: 1170-1172.

204.- Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Jang D, Chernesky MA. (1992) Corfirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men. J. Clin. Microbiol. 30: 2241-2245.

205.- Jaschek G, Gaydos D, Welsh LE, Quinn TC. (1993) Direct detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from asymptomatic and symptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction assay. J. Clin. Microbiol. 31: 1209-1212.

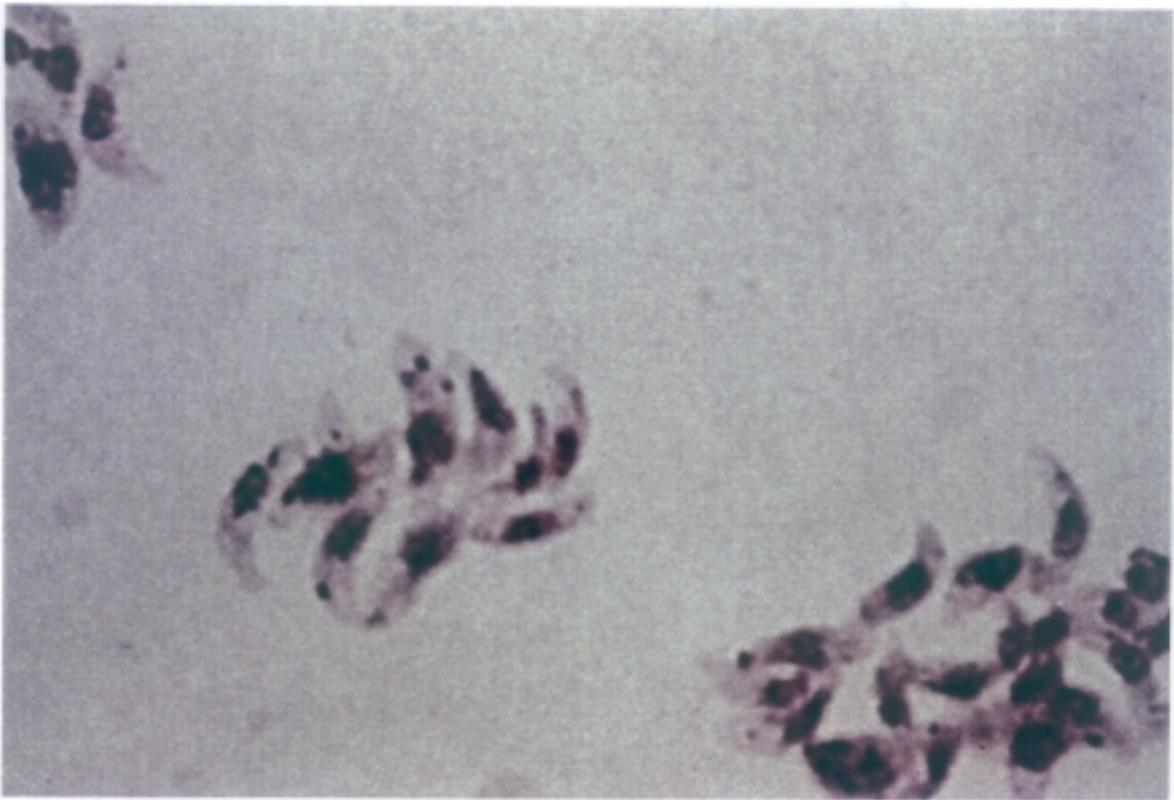
206.- Boom R, Sol CJA, Saliman MMM, Jansen CL, Noordaa J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleid acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.

207.- Lebech AM, Hansen K. (1992) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30: 1646-1653.

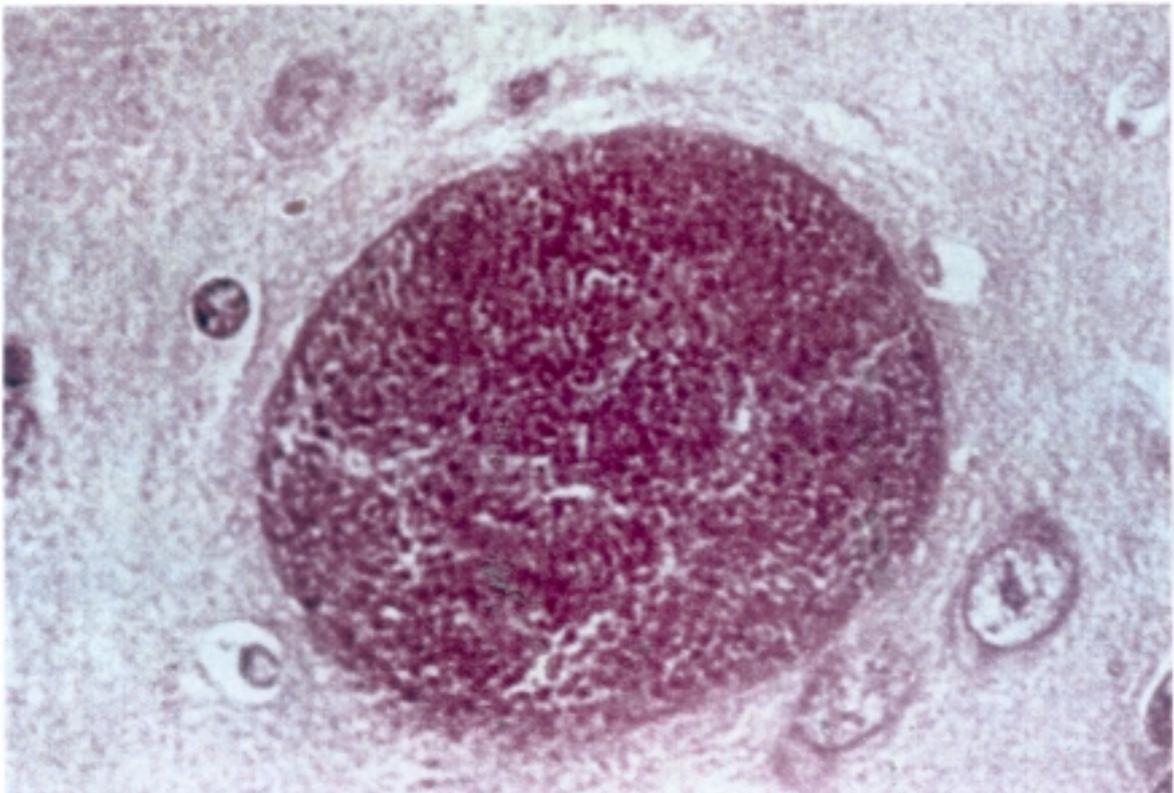
208.- Malloy D, Nauman RK, Paxton H. (1990) Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28: 1089-1093.

- 209.- Asai T; Kim TJ; Kobayashi M; Kojima S. (1987) Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 55 (5):1332-5.
- 210.- Handler M, Ho V, Whelan M. (1983) Intracerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. J. Neurosurg. 59: 994.
- 211.- Leport C, Bastuji-Garin S, Perronne C. (1989) An open study of the pirimethamine-clindamycin combination in AIDS patients with brain toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 1989; 160: 557-558.
- 212.- Danneman BR, Israelski DM, McCutchan. (1988) Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS: preliminary report of the California Collaborative Treatment Group randomized trial of pirimethamine plus sulfonamides versus pirimethamine plus clindamycin [abstract 562]. In: Program and abstracts of the 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology
- 213.- Rolston KVI, Hoy J. (1987) Role of clindamycin in the treatment of central nervous system toxoplasmosis. Am. J. Med. 83: 551-554.
- 214.- Theodossiadis GP, Koutsandrea C, Tzonou A. (1989) A comparative study concerning the treatment of active toxoplasmic retinochoroiditis with argon laser and medication (follow-up 2-9 years). Ophthalmologica 77-83.
- 215.- Snow RB, Lavyne MH. (1983) CNS toxoplasmosis in a patient with AIDS. Infect. Surg. 2: 669-679.
- 216.- Araujo FG, Remington JS. (1974) Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 5: 647.
- 217.- Danneman BR, Israelsky DM, Remington JS. (1988) Treatment of toxoplasmic encephalitis with intravenous clindamycin. Arch. Intern. Med. 148: 2477.

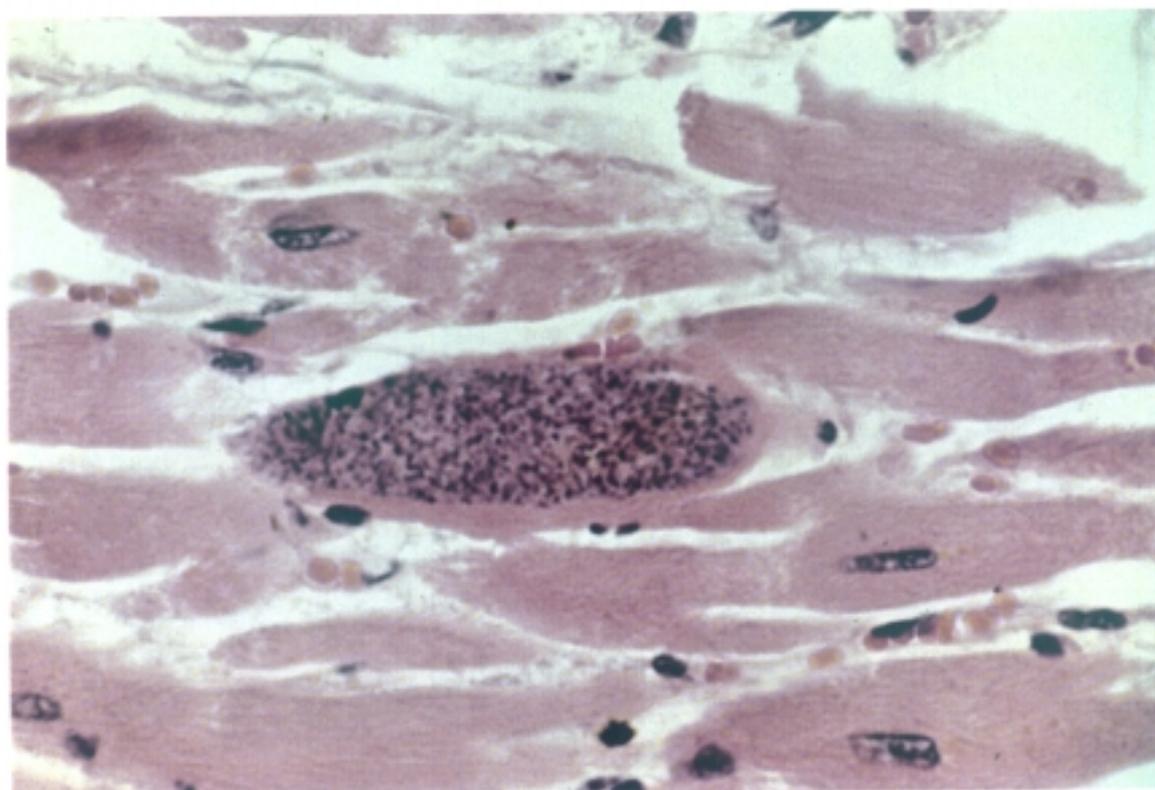
10.- FOTOGRAFIAS



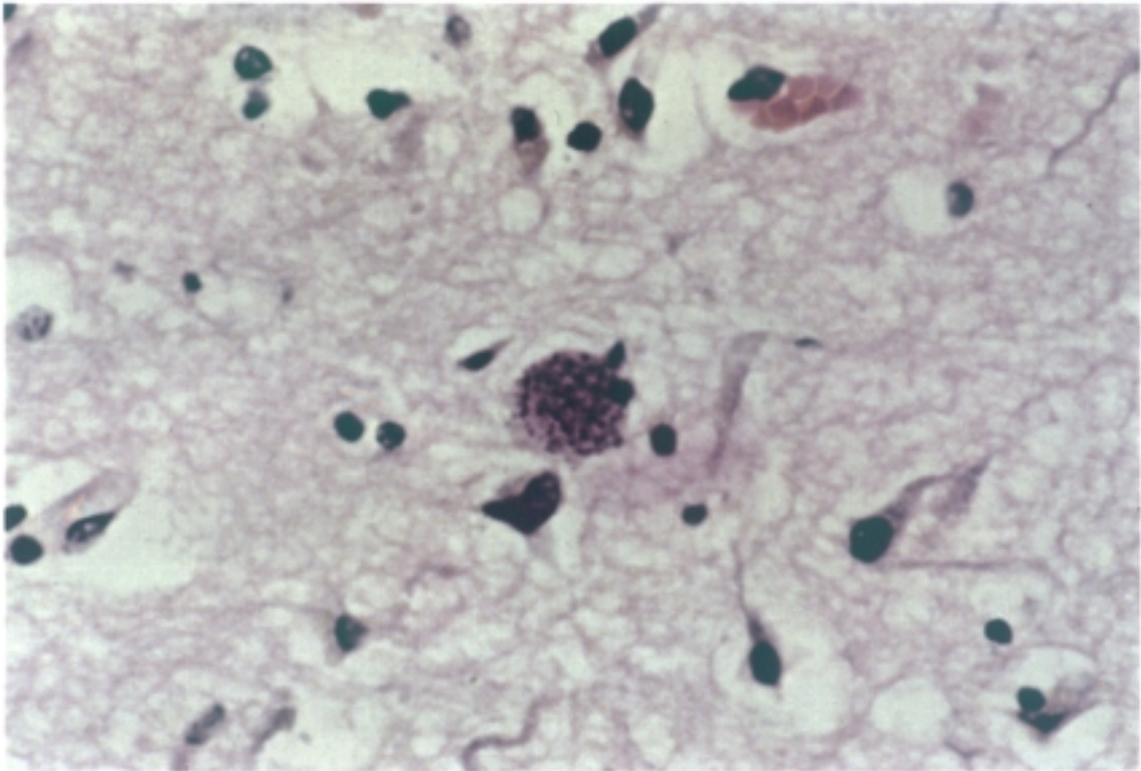
Trofozoitos de *Toxoplasma gondii* en líquido peritoneal de ratón



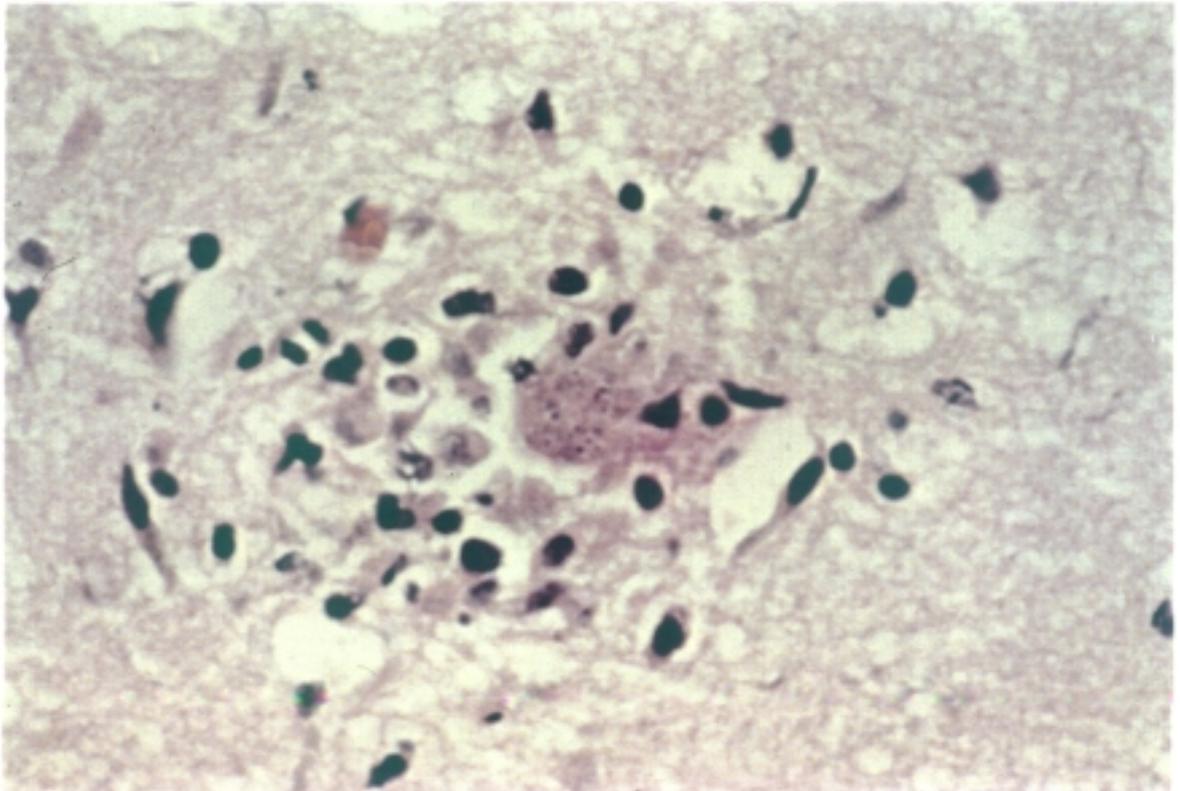
Quiste *Toxoplasma gondii* en cerebro conteniendo numerosos bradizoitos



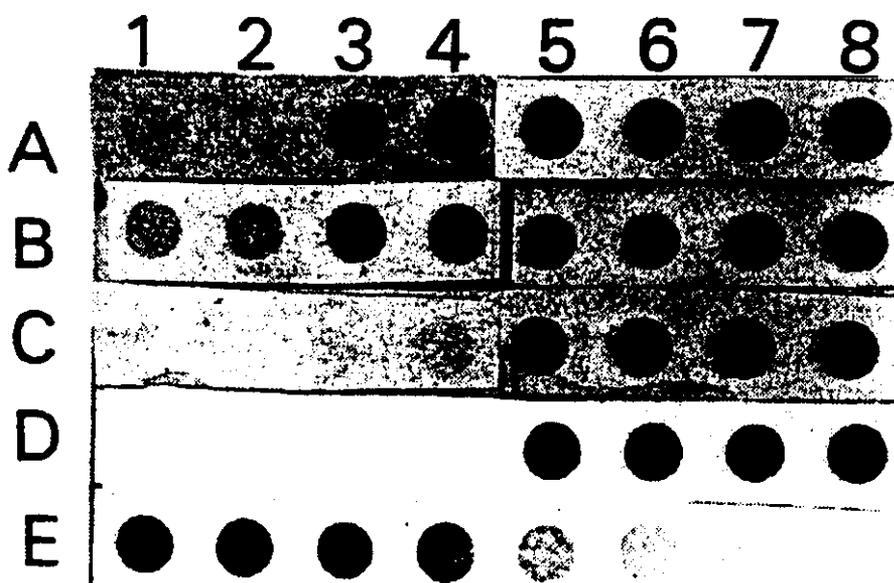
Miocarditis por *Toxoplasma gondii*: Sección histológica correspondiente a un miocardio en la que se aprecia la presencia de múltiples microorganismos en el citoplasma de una miofibrilla (pseudoquiste)



Toxoplasmosis cerebral en un ratón infectado crónicamente: Sección histológica correspondiente a encéfalo en la que se observa un acúmulo de microorganismos en el citoplasma de un macrófago mononuclear y astrocitosis reactiva.



Toxoplasmosis cerebral reactivada: Foco de necrosis en relación con liberación de trofozoitos tras ruptura de un pseudoquiste.



Placa de radiografía en la que observa las impresiones dejadas por la sonda bioluminiscente en casos de presencia de ADN específico. La fila A, B y C muestran amplificadores en los que se detecta la presencia de ADN específico (aparece una mancha negra en la radiografía) y muestras sin ADN específico. La línea E corresponde al límite de detección de la técnica.