

## DETECCIÓN DE TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EN LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO MEDIANTE LA TÉCNICA DE NESTED-PCR

A. HORTÚA

andhort@hotmail.com

S. BELTRÁN

samibemo@hotmail.com

H. OSSA

hossa@impsat.net.co

Laboratorio de Genética y Biología Molecular

Universidad Distrital Francisco José de Caldas

### INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es provocada por el parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii*, de la familia Toxoplasmidae (Flores, 1991). Este parásito puede ser asintomático en adultos con un sistema inmune normal, pero puede ser de gran trascendencia en el feto en gestación y en pacientes con SIDA o deficiencia en el sistema inmune (Montoya, 1996). La presencia de anticuerpos antitoxoplasma indica únicamente que la persona se infectó con el microorganismo en un momento dado y no que haya o esté desarrollando la toxoplasmosis necesariamente, pero un resultado positivo indica que el individuo está en riesgo de desarrollar la enfermedad (Perea, 1983). Si la infección se produce durante el embarazo, existe la posibilidad que la toxoplasmosis sea transmitida al feto ocasionando aborto espontáneo, prematuridad o enfermedades severas en el feto, tales como: hidrocefalia y calcificaciones intracerebrales (Picazo, 1994). En la mayoría de los casos el diagnóstico biológico de la toxoplasmosis congénita se basa en métodos serológicos indirectos; sin embargo, en los últimos años los diversos estudios realizados en Biología Molecular permitieron utilizar la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la enfermedad (Hohlfeld, 1994). Los primeros estudios en PCR fueron dirigidos a la amplificación de la secuencia repetitiva del gen B1 de *Toxoplasma gondii* en el líquido amniótico de mujeres infectadas (Grover, 1990). La prueba de PCR en líquido amniótico es definitivamente más sensible que otras técnicas convencionales usadas, ya que éstas presentan dificultad en establecer un diagnóstico seguro y oportuno, por esto se ha implementando la técnica de PCR en la detección de la toxoplasmosis, aportando un progreso indiscutible en aquellos casos donde los exámenes clínicos y serológicos presentan limitaciones. También disminuye el tiempo de análisis de las muestras arrojando resultados en un período máximo de 24 horas (Jenum, 1998). Este trabajo permitió realizar el diagnóstico seguro y confiable de toxoplasmosis congénita en las muestras de líquido amniótico analizadas, y permitió determinar el tratamiento adecuado y oportuno de las mujeres con toxoplasmosis y que a su vez transmitieron la infección a sus fetos. En el estudio realizado, se encontró 0% de infección congénita en las 109 muestras de líquido amniótico escogidas en forma aleatoria, mientras que en las muestras de líquido amniótico de mujeres que presentaban toxoplasmosis materna se encontró un porcentaje de infección congénita de 10.1%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la detección de la toxoplasmosis congénita, se analizaron 109 muestras de líquido amniótico, escogidas en forma aleatoria, las cuales fueron remitidas al Laboratorio de Genética y Biología Molecular, lugar donde se llevó a cabo el estudio, para realizar diagnósticos prenatales diferentes al de toxoplasmosis congénita. Además se estudiaron 69 muestras de líquido amniótico de mujeres que presentaban títulos de IgM e IgG para la infección por *Toxoplasma gondii*, que fueron remitidas al Laboratorio para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita. En el aislamiento se deben tomar 1.5 ml de líquido amniótico fresco y se centrifuga a 10.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se adiciona solución de lisis celular a 300 µl de precipitado y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. El DNA es purificado con solución de lisis nucleica y precipitación de proteínas. El sobrenadante es transferido a un vial nuevo en donde se precipita el DNA con isopropanol, luego es lavado con etanol al 70% y rehidratado en 50µl de solución de rehidratación (Kit de Aislamiento Promega). La técnica de Nested-PCR es realizada con 2 juegos de *primers* (Inis, 1990). En la primera PCR el DNA es amplificado en 30µl de mezcla maestra (10mM de Tris-HCl, pH 8.3, 50mM de KCl, 1.5 mM de Mg<sub>2</sub>Cl, 200 µM de cada uno de los dNTPs y una unidad de Taq polimerasa), se le adicionan 16.65 pmol de cada uno de los *primers* externos y 1.10µM de cada uno de los *primers* de control interno. La segunda PCR utiliza 1µl del producto de PCR I como molde y lo amplifica en 30µl de solución de mezcla maestra, que contiene 16 pmol de cada *primer* interno (Jenum, 1998). Las muestras son conservadas por 5 minutos a 94°C antes de realizarse los 30 y 25 ciclos de amplificación de la PCR I y PCR II respectivamente (Phrson, 1991). El programa de amplificación de la primera PCR presenta adicionalmente 10 ciclos encargados de la amplificación de los *primers* de control interno. Cada amplificación contiene un control negativo (agua destilada, desionizada) y un control positivo (DNA de la cepa RH de *T. gondii*). Los productos de PCR I y PCR II fueron evaluados en un gel de agarosa al 1.75% que contiene 5 µl de bromuro de etidium (Griffin, 1994).

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

La evaluación de los productos de amplificación de PCR 1 y PCR 2 realizado por electroforesis revela la presencia de una banda de 202 y 115 pb respectivamente, correspondientes al producto de amplificación del gen B1, que determina en las muestras analizadas la infección congénita por *Toxoplasma gondii*. Si no se presenta la infección congénita, la evaluación de los productos de PCR I revela sólo la amplificación del control interno, el cual amplifica un segmento de 429 pb del gen de la hormona de crecimiento humano. El análisis de las 109 muestras de líquido amniótico escogidas al azar no arrojó resultados positivos para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita; mientras que el estudio de 69 muestras de líquido amniótico de mujeres con serología materna positiva determinó que siete presentaron un diagnóstico positivo para infección congénita, es decir, la infección materna se transmitió al feto. El diagnóstico permitió que estas pacientes y los fetos en gestación recibieran un tratamiento seguro y oportuno. Los resultados fueron confirmados por métodos serológicos convencionales.

De 178 mujeres analizadas, se encontraron cinco en el primer trimestre de embarazo, de las cuales una presentó toxoplasmosis materna, pero de éstas ninguna desarrolló toxoplasmosis congénita. 138 mujeres se encontraban en el segundo trimestre de las cuales 44 presentaron toxoplasmosis materna y sólo una transmitió la infección al feto. En el último trimestre de embarazo se encontraron 35 mujeres, de las cuales 24 presentaron toxoplasmosis materna y seis de ellas transmitieron la infección al feto. Según estos resultados podemos decir que el porcentaje de infección congénita es mayor a medida que la edad gestacional aumenta, datos que se encuentran de acuerdo con el estudio publicado por Picazo en 1994, en el cual establece que el último trimestre de embarazo presenta una mayor frecuencia de transmisión de la enfermedad al feto en relación con los dos primeros trimestres.

El análisis de 69 muestras de líquido amniótico de mujeres que presentaban títulos de IgG e IgM para *Toxoplasma gondii*, determinó 10.1% de toxoplasmosis congénita. Esto nos permite pensar que la prevalecía de toxoplasmosis congénita para Colombia ha aumentado en los últimos años, dado que según datos reportados por Corredor en 1988 de 1 a 2% de la población colombiana presentaba toxoplasmosis congénita.

### BIBLIOGRAFÍA

- CORREDOR, J. Estudio Nacional de Salud: Toxoplasmosis en Colombia. Instituto Nacional de Salud. 1988.
- FLORES, A. La Toxoplasmosis: Consideraciones económicas, técnicas y sanitarias. La Cabaña. Vol. 266. 4-10 p.
- GRIFFIN, H. PCR Technology Current Innovation. C.R.C-TRSS. Estados Unidos. 1994. 370 p.
- GROVER, C. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.10 (28). 1990. 2297-2301p.
- HOHLFELD P. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polimerase chain reaction test on amniotic fluid. *New England Journal of Medicine*. Vol. 331, (11).1994.695-699p.
- INIS, Michael. PCR: Protocols a guide to methods and applications. Academia Press. Nueva York.1990.
- JENUM, P. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction. *APMIS*. Noruega. Vol. 7. (106).1998.680-685p.
- MONTOYA, M. Avances diagnósticos en toxoplasmosis: PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas. *Acta Médica Colombiana*. Vol. 21, (3.) 1996. 127-137p.
- PEREA, Evelio. Enfermedades Infecciosas: Patogénesis y Diagnóstico. Salvat Editores. S.A. España. 1983. 1223p.
- PHRSON, M. PCR A practical Aproach. University Press. Nueva York. 1991. 253p.
- PICAZO, J. Protocolos Clínicos de Diagnóstico. Serológico Comentado. No. 6. 1994. 1-9 p.