

Estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH

Nubia C. Ponce Zapata Bact. MSc¹
Jorge E. Gomez Marín MD, MSc, PhD²

Resumen

Objetivo: estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por VIH. **Diseño:** prueba de una prueba. Prueba de oro: constructo diagnóstico (criterios clínicos y radiológicos y respuesta al tratamiento específico). **Lugar:** centros hospitalarios de referencia (tercer nivel) de Bogotá y Armenia **Población:** 15 casos de toxoplasmosis cerebral y 75 controles, todos fueron pacientes con infección por VIH. **Mediciones:** la amplificación del gen B1 se realizó con una PCR anidada y la de SAG2 con una PCR simple. **Resultados:** con los iniciadores para el gen B1 se detectaron hasta 10 fg de ADN de la cepa de *T gondii* diluída en agua, la sensibilidad disminuyó

a 1 pg sí se diluía en sangre. Con los iniciadores para el gen SAG2 se detectó 1 pg de ADN del parásito purificado. Dentro del grupo de casos dos muestras de sangre amplificaron con los iniciadores del gen B1, para una sensibilidad de 13,3% y ninguna muestra con los iniciadores para el gen SAG2. La especificidad fue del 100%. **Conclusiones:** los resultados presentados aquí, muestran que la prueba de PCR en sangre de pacientes infectados por el VIH tiene un valor limitado para el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral pero confirma un diagnóstico clínico cuando es positivo. **Palabras claves:** PCR, *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis cerebral, infecciones oportunistas, VIH. b

Infectio 2003; 7(1): 8-14

Introducción

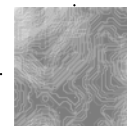
La toxoplasmosis es la infección oportunista más frecuente del sistema nervioso central en pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). El 30% de los individuos con anticuerpos séricos IgG anti-*Toxoplasma gondii* e infección por HIV terminan desarrollando la infección en algún momento de la enfermedad (1). En el Hospital San Juan de Dios en Bogotá, se encontró que el 63% de los pacientes con VIH poseen anticuerpos séricos anti-*Toxoplasma* y la toxoplasmosis cerebral (TC) fue la primera manifestación de la infección por VIH en

el 66% (2). El tratamiento específico llevó a la mejoría en 13 de 15 casos o sea el 86% de ellos (3). El diagnóstico se basa en la presencia de hallazgos clínicos y radiológicos y su confirmación se basa en una respuesta favorable radiológica y clínica. La lesión típica al TAC es múltiple, hipodensa y con predilección por los ganglios basales. Sin embargo los hallazgos de los estudios radiológicos no siempre esclarecen el diagnóstico y de otra parte, los linfomas primarios de cerebro no pueden ser distinguidos de TC por estos métodos. En la práctica la confirmación

1. Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia.

2. Grupo de Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Correspondencia: Jorge E. Gómez Marín Grupo GEPAMOL Centro de Investigaciones Biomédicas Universidad del Quindío, Armenia (Q) Tel/Fax: +57-67-460168 email: jegomezmarin@hotmail.com



diagnóstica se basa en una respuesta favorable al tratamiento específico. Aunque los estudios serológicos han sido menos utilizados, hay investigaciones recientes sobre la respuesta humoral específica que indican que éstos pueden aportar datos valiosos en el diagnóstico y pronóstico de la TC. En un estudio colombiano, se encontró que el 84% de los pacientes con toxoplasmosis cerebral tienen IgA anti-Toxoplasma, mientras sólo 24% de los pacientes con VIH sin TC la tienen y la IgM se halló en el 53% de los pacientes con TC y sólo en el 12% de los que no tenían TC (4). Se debe considerar el diagnóstico de TC en todo paciente con una prueba serológica positiva para VIH o sospecha clínica de inmunosupresión y síntomas de lesión en el sistema nervioso central, tales como focalización (hemiparesia, hemiplejía), lesión cerebral ocupando espacio, alteración en el estado mental o convulsión. El diagnóstico diferencial se debe hacer con linfoma en primer lugar y con leucoencefaloptia multifocal, abscesos fúngicos y por micobacterias.

En la actualidad no existe una prueba única que permita el diagnóstico; el único criterio definitivo para toxoplasmosis cerebral es la respuesta al tratamiento específico para Toxoplasma (Pirimetamina-Sulfas o Clindamicina). Dada la amplitud de diagnósticos posibles en pacientes con sintomatología de sistema nervioso central e inmunosupresión, es deseable contar con técnicas sensibles que permitan la identificación directa de Toxoplasma en muestras cuya toma no sea un proceso riesgoso para el paciente, ya que muestras de líquido cefalorraquídeo pueden estar contraindicados si hay hipertensión endocraneana y de otro lado las pruebas en estas muestras han demostrado poca sensibilidad (5, 6, 7). La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que detecta directamente el ADN del parásito y ha sido evaluada por diferentes autores, empleando diferentes metodologías y muestras, obteniendo una variedad de resultados (7, 8, 9, 10). En este estudio se evaluó la utilidad de la prueba PCR en muestras de sangre, para el diagnóstico de episodios de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH, se determinó y se comparó la sensibilidad y la especificidad de la PCR para detectar el ADN de *T. gondii* con iniciadores para el gen B1 y el gen SAG2. Para estimar estos valores se utilizó como prueba de oro frente a la cual se compararon los resultados de los dos PCR, un constructo diagnóstico basado en criterios clínicos y radiológicos compatibles con toxoplasmosis cerebral y la respuesta a tratamiento específico.

Materiales y Métodos

Pacientes y definición de casos y controles (constructo diagnóstico)

Como no existe una prueba diagnóstico que sea el estándar de oro para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral (11), y con el fin de determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba PCR para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral, los verdaderos positivos y verdaderos negativos se definieron por constructo diagnóstico. Para ello se utilizaron como criterio de definición de toxoplasmosis cerebral los pacientes que con sintomatología compatible respondieron clínica y radiológicamente al tratamiento con Pirimetamina-Sulfadoxina con o sin Clindamicina antes de dos semanas (3). Todos los pacientes que participaron en el estudio presentaban Infección por VIH demostrada por dos pruebas ELISA y Western blot. Los datos clínicos y del laboratorio se obtuvieron por lo consignado en la historia clínica. Las muestras fueron recolectadas de pacientes en los siguientes sitios de atención para pacientes con VIH: en Bogotá el Hospital San Juan de Dios, el Hospital Simón Bolívar, el Hospital La Samaritana y la Fundación EUDES; en Armenia el Hospital San Juan de Dios. En todos los casos se solicitó la firma de un documento de consentimiento informado y los protocolos fueron autorizados por los comités de ética de cada uno de los centros.

Grupo de casos de toxoplasmosis cerebral (verdaderos positivos): este grupo se conformó por 15 pacientes que cumplieron con los siguientes criterios: presencia de una o más masas o abscesos cerebrales en la tomografía axial computarizada (TAC) o por la resonancia magnética nuclear (RNM) y que disminuyen de tamaño luego de siete a 14 días de tratamiento apropiado (Pirimetamina-Sulfadoxina con o sin Clindamicina). El esquema de tratamiento puede ser revisado en otro artículo publicado previamente (3). Todos los pacientes tenían serología IgG positiva para *Toxoplasma gondii* por técnica IFI.

Grupo control (verdaderos negativos): los pacientes del grupo control fueron conformados así: siete pacientes con sintomatología neurológica compatible con masa cerebral que no tuvieron respuesta al tratamiento adecuado anti-Toxoplasma y a quienes se les determinó otra etiología (cisticercosis en un caso, criptococosis en cuatro casos, tuberculosis en un caso y citomegalovirus

en un caso), 35 pacientes que asistían a control de seguimiento sin sintomatología neurológica y serología (anticuerpos IgG) para *T. gondii* negativa, 18 pacientes que asistían a control de seguimiento, sin sintomatología neurológica y serología (anticuerpos IgG) para *T. gondii* positiva y 15 pacientes que asistían a control de seguimiento y en la historia clínica reportaban haber sido tratados para un episodio anterior de toxoplasmosis cerebral

Obtención de taquizoitos

Los taquizoitos del parásito se obtuvieron a partir de líquido peritoneal de ratones machos ICR infectados con la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. La suspensión se filtró en una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 3 μ m.

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI-IgG)

A las muestras de suero de todos los pacientes se les determinaron los títulos de anticuerpos IgG para *T. gondii*, mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. La reacción se consideró positiva cuando se obtenían títulos mayores o iguales a 1/16.

Extracción y purificación de ácidos nucleicos

La extracción de ADN se realizó con el estuche comercial Wizard Genomic ADN de Promega (USA). El proceso de extracción se realiza en cuatro pasos: lisis de células rojas, lisis de las células blancas y sus núcleos, digestión del ARN y precipitación de las proteínas.

Amplificación de ácidos nucleicos

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf - Mastercycler personal. Se amplificó el gen B1, un gen específico de *Toxoplasma* que se encuentra repetido varias veces, utilizando la metodología de PCR anidada descrita previamente (12, 13). En resumen, en una primera amplificación se emplearon los oligonucleótidos 694 a 714 (Oligo N1) *Toxo* N1: 5' - GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG - 3' y 887 a 868 (Oligo C1) *Toxo* C1: 5' - TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC - 3'. En la PCR anidada se utilizaron los nucleótidos 757 a 776 (Oligo N2) *Toxo* N2: 5' - TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG - 3' y 853 a 831 (Oligo C2) *Toxo* C2: 5' - GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC - 3' sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. (Cambridge, USA). El gen SAG2 que codifica una de las cinco proteínas de superficie del taquizoito (P22) fue amplificado con

una PCR simple utilizando los iniciadores Oligo 1 de 26 pb: 5'-GGGGGATC CACCACCGAGACGCCAGC - 3' y Oligo 2 de 28 pb: 5'-GGGGAATTCTTGCCCGTGAGAGACACAG - 3', siguiendo el protocolo descrito previamente (14).

La mezcla de reacción para la amplificación de ambos genes contenía 1 U de Taq, 100 M dNTPs, 1,2 mM de MgCl₂ y 50 picomoles de cada iniciador para un volumen final de 20 μ l. Para la primera amplificación con el gen B1 se realizaron 40 ciclos cada uno con temperatura de denaturación de 94° C por 1 min, temperatura de anillamiento de 53° C por 1 min y temperatura de extensión de 72° C por 1 min. Para la PCR anidada las concentraciones de los reactivos fueron las mismas de la primera PCR y se adicionó 1 μ l del material ya amplificado. El protocolo fue de 14 ciclos cada uno con temperatura de denaturación de 94° C por 1 min, temperatura de anillamiento de 53° C por 30 seg. y temperatura de extensión de 72° C por 30 seg. El protocolo de amplificación para el gen SAG2 fue de 35 ciclos cada uno con temperatura de denaturación de 94° C por 1 min, temperatura de anillamiento de 55° C por 1 min y temperatura de extensión de 72° C por 1 min.

Revelación y visualización del producto de amplificación

La visualización del producto de amplificación, se realizó mediante una electrofóresis en gel de agarosa Nusive - SeaKem 2:1 (1,3%), con buffer TBE 1X y bromuro de etidio en una concentración de 5 g/ml, realizada en una cámara electroforética horizontal (Sigma, USA). El producto de amplificación final esperado con el gen B1 es de 97 pb y para el gen SAG2 es de 438 pb.

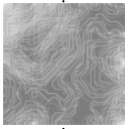
Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó una tabla de contingencia de 2 X 2, a partir de la cual se determinó la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos. La prueba de oro fue un constructo diagnóstico basado en criterios clínicos, radiológicos y de respuesta al tratamiento específico. Mediante el programa Epi Info 6.04 se determinaron los intervalos de confianza del 95% para los resultados obtenidos.

Resultados

Resultados de la estandarización de la PCR

La realización del protocolo para la amplificación



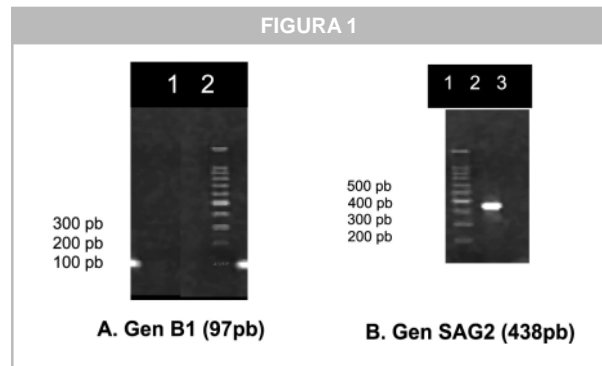
del gen B1 llevó tres horas y media de tiempo para obtener los resultados finales y para SAG2 dos horas. Los productos de amplificación del ADN de *T. gondii* se observaron en el transiluminador de luz ultravioleta. En el gel de agarosa 1,3% se visualizaron las bandas correspondientes a 97 pb para el gen B1 y 438 pb para el gen SAG2 (Figura 1).

Se determinó la cantidad mínima de ADN detectada por la prueba con concentraciones de la cepa de ADN de la cepa RH de *T. gondii* de 1 ng, 100 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg y 1 fg las cuales fueron sometidas al proceso de amplificación con el gen B1 y SAG2. Con los iniciadores para el gen B1 en el gel 1,3 % se observaron productos de amplificación de 97 pb desde la máxima concentración de ADN (1 ng) hasta 10 fg de ADN de *T. gondii* (Figura 2). Para investigar el límite de ADN detectado por la prueba en muestras de sangre, se adicionaron estas mismas diluciones de ADN del parásito a 300 l de sangre total. La sensibilidad de los iniciadores para el gen B1 en presencia de 300 µl sangre disminuyó a 1pg de ADN (Figura 3). La concentración mínima de ADN de *T. gondii* detectada por la PCR usando el juego de iniciadores para SAG2 fue de 1 pg.

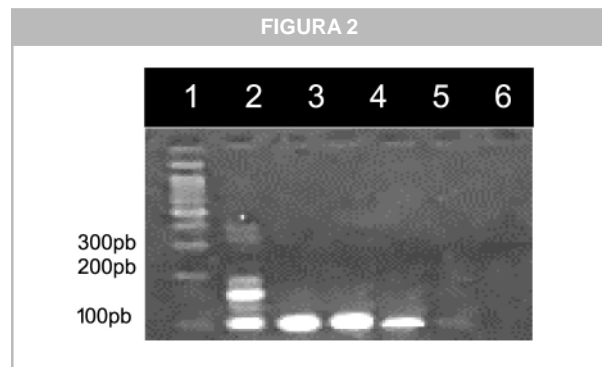
La especificidad de los iniciadores se determinó con la amplificación de 100 pg de ADN obtenido de cepa de *Micobacterium bovis* (donada por el laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud -INS-, Bogotá), 100 pg de ADN de larva de *Taenia solium*, 100 pg de ADN de *Plasmodium falciparum* (donado por el Laboratorio de Bioquímica del INS, Bogotá) y 100 pg de ADN de *Cryptococcus neoformans* (donado por el Laboratorio de Microbiología del INS, Bogotá). Al amplificar el ADN de estos organismos con los iniciadores para el gen B1 y SAG2, no se observó ningún producto de amplificación.

Aplicación en muestras para diagnóstico

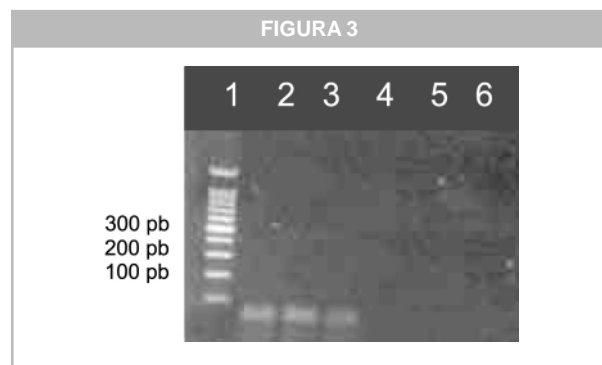
Se procesaron un total de 90 muestras de sangre de pacientes infectados por VIH. Los pacientes eran 78 hombres (86,6%) y 12 mujeres (13,3%), con un rango de edad entre 17 y 55 años. De los 90 pacientes, sólo en 32 (35,5%) se encontraron datos de recuento de linfocitos T CD4+ en el momento de la toma de la muestra. El rango de valores en estos pacientes fue entre 13 y 1.400 células x mm³. Al 100% de las muestras se les determinaron los títulos de anticuerpos IgG para *T. gondii*, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta y se obtuvieron resultados desde 1:64 hasta 1:32.000. El 54,4 % de la población de estudio presentó títulos positivos.



Electroforesis en gel de agarosa (1,3%). Producto de amplificación de la cepa RH de *T. gondii* con los iniciadores para el gen B1 (A) y el gen SAG2 (B) Pozo 1A y B: 100 bp Ladder, Pozo 2A: ADN de *T. gondii* amplificado para el gen B1. Pozo 2B: ADN de *T. gondii* amplificado para el gen SAG2. Pozo 3A y B: Control Negativo (agua destilada).

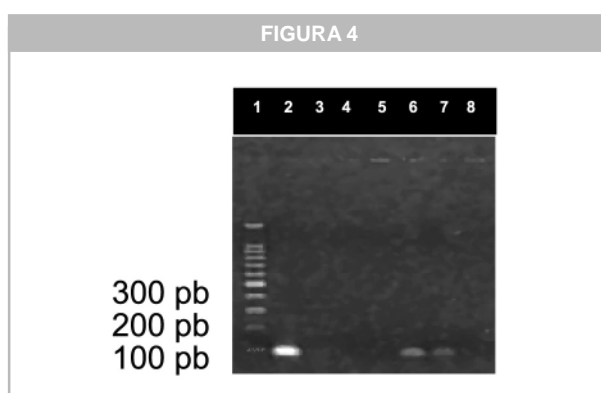


Electroforesis en gel de agarosa (1,3%). Sensibilidad de la prueba de PCR para detectar ADN de *T. gondii* con los iniciadores del gen B1. Pozo 1: 100 bp Ladder. Pozo 2: 1 ng ADN *T. gondii* Pozo 3: 100 pg ADN *T. gondii*. Pozo 4: 1 pg ADN *T. gondii*. Pozo 5: 100 fg ADN *T. gondii*. Pozo 6: 10 fg ADN *T. gondii*. Pozo 7: 1 fg ADN *T. gondii*.



Electroforesis en gel de agarosa (1,3%). Sensibilidad de la prueba de PCR para detectar ADN de *T. gondii* con los iniciadores del gen B1 en sangre. Pozo 1: 100 bp Ladder. Pozo 2: 1 ng ADN *T. gondii*. Pozo 3: 100 pg ADN *T. gondii*. Pozo 4: 1 pg ADN *T. gondii*. Pozo 5: 100 fg ADN *T. gondii*. Pozo 6: 10 fg ADN *T. gondii*. Pozo 7: 1 fg ADN *T. gondii*. Pozo 8: Control Negativo (agua destilada).

De los 15 pacientes con TC, en dos se observó un producto de amplificación de 97 pb con los iniciadores para el gen B1, equivalente a una sensibilidad de 13,3 % (Fig 4). Para investigar la presencia de inhibidores de la PCR en sangre, a las muestras de los pacientes con TC y PCR negativa, se les adicionó 100 pg de ADN de *T. gondii* y fueron re-amplificadas. Todas las muestras negativas de este grupo que se re-amplificaron con ADN de *T. gondii* presentaron banda de amplificación de 97 pb. En ninguna de las muestras de los pacientes con TC se obtuvo producto de amplificación de 438 pb con los iniciadores para el gen SAG2. En ninguna de las muestras de sangre de los pacientes incluidos en el grupo control se observó banda de amplificación



Electroforesis en gel de agarosa (1,3%). Muestras de pacientes amplificadas con los iniciadores del gen B1. Pozo 1: 100 bp Ladder, Pozo 2: ADN de *T. gondii*, Pozo 3: Control Negativo (agua destilada). Pozo 4-8: ADN de pacientes. Pozos 6 y 7: Muestras positivas de pacientes con toxoplasmosis cerebral.

para el gen B1 o para el gen SAG2. Los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos se muestran en la tabla 1. Como el tratamiento o la profilaxis previa puede afectar la sensibilidad de la prueba se averiguó este dato en los 15 casos con toxoplasmosis cerebral. Solo en tres casos se pudo confirmar por datos de historia la presencia de profilaxis previo al ingreso con Trimetoprim-Sulfametoxazol. Dos habían recibido profilaxis y uno no. En los tres casos la prueba de PCR fue negativa. En el resto de casos este dato no estaba consignado. Sobre el tratamiento se debe tener en cuenta que la muestra se obtuvo durante o luego de la primera semana de hospitalización y en todos los casos con terapia específica (Pirimetamina-Sulfadoxina con o sin clindamicina) ya iniciada.

Discusión

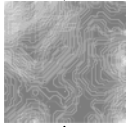
La prueba de PCR es un método directo para la detección de ADN de *T. gondii*, que agiliza la obtención de resultados pues se obtiene en un día, comparada con el tiempo que demora la inoculación en ratón que es de tres a seis semanas ó el cultivo celular que toma de cuatro a 10 días (15). Esta prueba tiene la capacidad de detectar cantidades mínimas de ADN. En el presente trabajo se encontró que tanto con ADN de *T. gondii* como con las muestras de los pacientes, se pudo determinar que el gen B1 presenta mayor sensibilidad que SAG2. Con la cepa del parásito los iniciadores de B1 detectaron hasta 10 fg de ADN del parásito, mientras que SAG2 detectó hasta 1 pg. Con el gen B1 se obtuvo amplificación en dos muestras de sangre de

TABLA 1

Sensibilidad, Especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) de la PCR para *T. gondii*

	N	%	INTERVALOS DE CONFIANZA 95%
SENSIBILIDAD	2/15	13,3 %	2,3 - 41,6
ESPECIFICIDAD	0/75	100 %	93,9 - 100
VPP		100 %	19,8 - 100
VPN		85,2 %	75,7 - 91,6

La sensibilidad y la especificidad se calcularon tomando como base el diagnóstico definitivo determinado por criterios clínicos, radiológicos y de respuesta al tratamiento. Los casos (verdaderos positivos) fueron 15 pacientes con criterios serológicos y radiológicos de toxoplasmosis cerebral que mejoraron antes de dos semanas con tratamiento específico para toxoplasmosis (Pirimetamina-Sulfadoxina con o sin Clindamicina). Los controles (verdaderos negativos) fueron 75 pacientes así: siete pacientes con sintomatología neurológica compatible con masa cerebral que no tuvieron respuesta al tratamiento adecuado anti-Toxoplasma y a quienes se les determinó otra etiología, 35 pacientes sin sintomatología neurológica y serología (anticuerpos IgG) para *T. gondii* negativa, 18 pacientes sin sintomatología neurológica y serología (anticuerpos IgG) para *T. gondii* positiva y 15 pacientes que asistían a control de seguimiento y en la historia clínica reportaban haber sido tratados para un episodio anterior de toxoplasmosis cerebral



pacientes que no amplificaron con SAG2. Esto se puede explicar debido a que en el genoma del parásito se encuentran 35 copias del gen B1 y por lo tanto hay más sitios blanco para que se dé la anillación (16). En un trabajo reciente se comparó la utilización de los genes para P30, B1 y rRNA y se encontró que el uso de la secuencia del gen B1 incrementa la sensibilidad de la prueba (13). En el presente trabajo se usó una PCR anidada que permite que el ADN amplificado en una primera reacción pueda ser reamplificado en una segunda, usando nuevos iniciadores que hibridan con una zona interna de la secuencia amplificada lo que aumenta la sensibilidad de la prueba. La especificidad de la reacción para ADN de otros agentes patógenos la probamos con ADN de *Micobacterium bovis*, larva de *Taenia solium*, *Plasmodium falciparum* y *Cryptococcus neoformans* con los cuales no se obtuvo ningún producto de amplificación ni para el gen B1 ni para el gen SAG2. Resultados similares han sido reportados por otros autores (13).

La sensibilidad obtenida de 13,3 %, fue igual a la reportada en otro trabajo (8), que también en 15 pacientes con diagnóstico toxoplasmosis cerebral, encontraron una prueba de PCR positiva en dos casos. Revisando los resultados de estudios previos se encuentra que las sensibilidades reportadas oscilan entre 10 y 77 % (8, 17, 18). La baja sensibilidad de la PCR en muestras de pacientes con toxoplasmosis cerebral puede tener varias explicaciones:

- 1) La presencia de ADN no específico de las células humanas como los eritrocitos puede disminuir la sensibilidad de la PCR (16). Este hecho lo demostramos cuando al adicionar diferentes concentraciones de ADN de *T. gondii* a 300 l de sangre disminuyó la capacidad de detección de los iniciadores del gen B1 de 10 fg a 1 pg. Cuando se adicionó 100 pg de ADN del parásito a las muestras de pacientes ocurrió amplificación por lo tanto se descarta la presencia de ADN de *Toxoplasma* en concentraciones mayores a 100 pg.
- 2) Los resultados de la PCR mejoran cuando se toman en cuenta sólo los pacientes que no han recibido tratamiento específico para *T. gondii*. En un estudio sobre la utilidad diagnóstica del PCR en el inmunosuprimido se encontró que la sensibilidad del PCR es de 86% en sangre periférica y de 60% en LCR cuando el paciente no ha recibido tratamiento, y de 25% con tratamiento previo o 16% si el paciente recibió profilaxis (7). En el presente trabajo todos los

pacientes habían iniciado tratamiento y en dos de ellos había antecedentes de profilaxis previa.

- 3) Las muestras de sangre se tomaron a los pacientes sólo una vez y se ha sugerido que en estos pacientes ocurre una parasitemia intermitente (8).

En la literatura revisada no se encontraron artículos que emplearan los iniciadores para el gen SAG2 en la amplificación de *T. gondii* en muestras de sangre, por lo cual no se pueden comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con la literatura.

Al procesar las muestras de los pacientes que presentaban alteración neurológica pero con diagnóstico de cisticercosis, criptococosis, tuberculosis y citomegalovirus, no se obtuvieron resultados falsos positivos, por lo que la prueba cuenta con una especificidad del 100%.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la PCR utilizando el gen B1 o gen SAG2 en sangre de pacientes infectados por el VIH, tiene un valor limitado para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral; sin embargo puede confirmar un diagnóstico clínico cuando es positiva. b

Agradecimientos

A los pacientes por su aceptación para participar en el estudio. A los hospitales La Samaritana, Simón Bolívar, San Juan de Dios (Bogotá y Armenia), Santa Clara y a la Fundación EUDES. Al Dr Rubén Nicholls y a la Doctora María Mercedes Santacruz por su apoyo y colaboración durante el estudio. Al Doctor John Carlos Castaño por su apoyo y asesoría en la realización de los ensayos con SAG2. A la Doctora Concepción Puerta y al Doctor Carlos Alvarez por sus consejos y observaciones. A todas las personas del Instituto Nacional de Salud que colaboraron con el desarrollo del trabajo.

Este trabajo fue financiado por la Subdirección de Epidemiología y el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud.

Abstract

Objectives: standardization and clinical validation of polymerase chain reaction (PCR) assay for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in VIH infected patients. **Design:** test of a test. Gold standard: Diagnostic construct (clinical and radiological criteria and response to specific treatment). **Setting:** medical reference centers for VIH infected patients in Bogota

and Armenia. **Population:** 15 cases of cerebral toxoplasmosis and 75 controls, all VIH infected patients. **Methods:** Nested PCR amplification of specific B1 gen of *Toxoplasma* and simple PCR amplification of SAG2 gen. **Results:** B1 gen PCR assay have a sensitivity of 10 fg of seeded DNA of *T gondii* in water and of 1 pg in blood. PCR of SAG2 gen have a sensitivity of 1 pg of parasite DNA. In cases group only two patients were

positive with B1 PCR (13,3%) and any patient with SAG2 based PCR assay. Both PCR were 100% specific. **Conclusions:** PCR in blood have a limited value in VIH infected patients with cerebral toxoplasmosis because his low sensitivity, however a positive result confirms a clinical diagnosis. **Key words:** PCR, *Toxoplasma gondii*, cerebral toxoplasmosis, opportunistic infections, HIV.

Referencias

1. **Luft BJ, Hafner R, Korzun H, Leport C, Antoniskis D, Bosler E, Bourland D, Uttamchandani R, Fuhrer J, Jacobson J, Morlat P, Vilde JL, Remington J.** Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency Syndrome. *New Eng J Med.* 1993; 329: 995-1000.
2. **Alvarado F, Hernández C, Cuervo S, Damian J, Saravia J, Gómez JE.** Toxoplasmosis cerebral en el Hospital San Juan de Dios, Santafé de Bogotá. Resúmen C1. IV Congreso Colombiano de Infectología. *Infectio.* 1999; 3: 35
3. **Gómez JE, Alvarado F, Hernández C, Cuervo S, Saravia J.** Tratamiento de la fase aguda de la toxoplasmosis cerebral con Clindamicina-Falcidar (pirimetamina-sulfadoxina) en pacientes infectados por VIH. *Infectio.* 2001; 5: 163-169
4. **Gómez Marín JE, Corredor A, Murcia M, López MC, Alvarado F, Anzola I, Saravia J.** Valor diagnóstico de la medición de IgG, IgM e IgA anti *Toxoplasma* en pacientes infectados por VIH. *Infectio.* 2000; 4: 4-10
5. **Antinori A, Ammassari A, De Luca A, Cingolani A, Murri R, Scoppettuolo G, Fortini M, Tartaglione T, Larocca LM, Zannoni G, Cattani P, Grillo R, Roselli R, Lacoangeli M, Scerrati M, Ortona L.** Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: A decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology.* 1997; 48: 687-694.
6. **Eggers C, Gross U., Klinker H, Schalke B, Stellbrink H, Kunze K.** Limited value of cerebrospinal fluid for direct detection of *Toxoplasma gondii* in toxoplasmic encephalitis associated with AIDS. *J Neurol* 1995; 242: 644-649.
7. **Foudrinier F, Aubert D, Playgauthier-Toubas D, Rouger C, Beguinot I, Halbout P, Lemaire P, Marx-Chemla C, Pinon JM.** Detection of *Toxoplasma gondii* in Immunodeficient Subjects by Gene Amplification: Influence of Therapeutics. *Scand J Infect Dis.* 1996; 28: 383-86.
8. **Khalifa K, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K.** Value of PCR for Evaluating Occurrence of Parasitemia in Immunocompromised Patients with Cerebral and Extracerebral Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1994, 32: 2813-2819.
9. **Dupoy-Camet J, Lavareda S, Maslo C, Paugam A, Saimot AG, Benarous R, Tourte - Schaefer CI, Derouin F.** Detection of *Toxoplasma gondii* in Venous Blood from AIDS Patients by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 1866-1869
10. **Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen S.** Diagnosis of *Toxoplasma* Parasitemia in Patients with AIDS by Gene Detection after Amplification with Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2327 - 2331
11. **Gildenberg PL, Gathe JC, Kim JH.** Stereotactic Biopsy of Cerebral Lesions in AIDS. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 491-499
12. **Contini C, Seraceni S, Cultrera R.** Different PCR Systems to Detect *Toxoplasma gondii* Tachyzoites or Bradyzoites in Clinical Specimens from Patients with and without Overt Disease. *J Eukaryote Microbiol.* 1999; 46: 77S-78S.
13. **Jones CD, Okbravi N, Adamson P, Lightman S.** Comparison of PCR Detection Methods for B1, P30, and 18s rDNA Genes of *T. gondii* in aqueous Humor. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 2000; 41: 634-644.
14. **Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, Remington JS.** Two Alleles of the Gene Encoding Surface Antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1992; 80: 293-301.
15. **Montoya MT, Gómez JE, Castaño JC, Marx C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM.** Avances Diagnósticos en Toxoplasmosis. *Acta Med Col.* 1996; 21: 127-137.
16. **Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC.** Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction *J Clin Microbiol.* 1989; 27:1787-1792
17. **Joss AWL, Ho-Yen DO.** The effects of sample storage on polymerase chain reaction-based detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluids. *J Med Microbiol.* 1997; 46: 92-96.
18. **Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, Leng B, Lacut JY.** Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in Cerebrospinal Fluid and Blood of Human Immunodeficient Virus-Seropositive Patients. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2421-2426
19. **Guy EC, Joynson DHM.** Potential of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Active *Toxoplasma* Infection by Detection of Parasite in Blood. *J Infect Dis.* 1995; 172: 319-322.