

Aplicación de herramientas serológicas y moleculares para el diagnóstico de coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*

Application of serological and molecular tools for diagnosis of chorioretinitis caused by *Toxoplasma gondii*

Dr. Bernardo Regalado Andújar,^I Dra. Martha Solangel Rodríguez Peña,^{II}
Lic. Jorge Fraga Nodarse,^{II} Dra. Lázara Rojas Rivero,^{II} Dr. Fidel Ángel
Núñez Fernández,^{II} Lic. Luis Enrique Jerez Puebla^{II}

^I Ministerio de Salud Pública. Santo Domingo, República Dominicana.

^{II} Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: *Toxoplasma gondii*, agente causal de la toxoplasmosis, es un protozoo intracelular obligado que puede afectar al globo ocular, siendo la causa más común de uveítis posterior.

Objetivo: determinar la utilidad de las técnicas serológicas y moleculares para el diagnóstico de la toxoplasmosis ocular en pacientes con uveítis. **Métodos:** se diseñó un estudio de corte transversal para comparar un grupo de pacientes afectados por coriorretinitis toxoplásmica y otro con signos sugestivos de coriorretinitis no toxoplásmica. En ambos grupos se utilizaron métodos serológicos como la inmunofluorescencia indirecta y la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA), y la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la toxoplasmosis ocular.

Resultados: las técnicas serológicas permitieron detectar los anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* en 100 % de los pacientes con coriorretinitis toxoplásmica, de ellos fueron positivos a los anticuerpos IgM solo 3 pacientes y 1 tuvo un resultado débil a la avidéz IgG. La reacción en cadena de la polimerasa detectó el ADN de *Toxoplasma gondii* en 15 de los 47 pacientes para una sensibilidad de 31,9 %.

Conclusiones: se reporta la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma*, en todos los casos de coriorretinitis toxoplásmica a través de los métodos serológicos, aunque la técnica más sensible fue la inmunofluorescencia indirecta. Se empleó la

detección molecular del ADN de *Toxoplasma gondii* en pacientes con toxoplasmosis ocular, por primera vez en Cuba. Los resultados permiten sugerir el uso de técnicas serológicas y moleculares que ayuden a confirmar el diagnóstico de infección por *Toxoplasma* en pacientes con coriorretinitis.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, reacción en cadena de la polimerasa, toxoplasmosis ocular.

ABSTRACT

Introduction: *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis, is an intracellular protozoan that can affect the eye, and be the most common cause of posterior uveitis.

Objective: to determine the usefulness of serological and molecular techniques for the diagnosis of ocular toxoplasmosis in patients with uveitis.

Methods: a cross-sectional study was designed in order to compare a group of patients with toxoplasmic retinochoroiditis and another affected by non-toxoplasmic retinochoroiditis. In both groups serological methods such as indirect immunofluorescence assay, immunoassay (ELISA), and the polymerase chain reaction were used for the diagnosis of ocular toxoplasmosis.

Results: serological techniques allowed detecting anti-*Toxoplasma* IgG antibodies in 100 % of patients with toxoplasmic retinochoroiditis, and only 3 patients were positive to IgM antibodies. Finally, only one had a weak result for IgG avidity. The polymerase chain reaction detected DNA from *Toxoplasma gondii* in 15 out of 47 patients for a sensitivity of 31.9 %.

Conclusions: this paper reports the detection of anti-*Toxoplasma* antibodies in all toxoplasmic retinochoroiditis cases by serological methods; but the most sensible method was immunofluorescence assay. The molecular detection of *Toxoplasma gondii*'s DNA in patients with ocular toxoplasmosis was employed for the first time in Cuba. The results suggest that serological and molecular techniques can be applied to confirm the diagnosis of *Toxoplasma* infection in patients with toxoplasmic retinochoroiditis.

Key words: *Toxoplasma gondii*, polymerase chain reaction, ocular toxoplasmosis.

INTRODUCCIÓN

La inflamación intraocular producida por un parásito intracelular obligado conocido como *Toxoplasma gondii*, es la causa más frecuente de enfermedad infecciosa en pacientes inmunocompetentes con uveítis posterior.¹

La toxoplasmosis ocular (TXO) es una manifestación local producto de una infección sistémica por este microorganismo, el cual se extiende a la retina del ojo, provocando una coriorretinitis o retinocoroiditis, tanto en una primoinfección como en la recidiva de una forma congénita. En este último caso se trata de la reactivación de una lesión antigua, puesto que se encuentra una cicatriz pigmentada adyacente al nuevo foco. Estas recidivas se presentan generalmente entre la primera y la tercera décadas de la vida, cuando el parásito enquistado en la

cicatriz se reactiva y libera cientos de parásitos hacia las células retinianas normales. La recurrencia se agrava por la presencia de inmunosupresión, estrés o estados de ansiedad.² El defecto visual es secundario a la necrosis que ocurre en la mácula.³ Igualmente pueden estar afectadas estructuras adyacentes como el nervio óptico y los vasos sanguíneos de la retina.⁴

A pesar de que el diagnóstico de TXO está basado sobre todo en el análisis oftalmológico, las pruebas de laboratorio normalmente pueden ayudar al diagnóstico definitivo.⁵ Además de los signos y síntomas clínicos, algunos autores utilizan como guía para el diagnóstico, la serología, mediante la cual se detectan anticuerpos anti-*Toxoplasma*. Sin embargo, un resultado de serología positiva por sí sola no confirma el diagnóstico.⁶ La respuesta positiva al tratamiento específico es también un dato importante a tener en cuenta.⁷

Recientemente, las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), han sido usadas para detectar el ADN del parásito en diversos fluidos biológicos como humor acuoso,⁸⁻¹⁰ humor vítreo¹¹ y la sangre.^{5,8,12} En pacientes inmunocompetentes el ADN de *Toxoplasma* puede detectarse en muestras de humor acuoso hasta 40 % de los casos diagnosticados clínicamente.^{6,13} En individuos inmunodeprimidos, la sensibilidad de la RCP obtiene valores superiores y es capaz de detectar hasta 75 % de los casos.^{13,14} Como alternativa al humor acuoso, el humor vítreo puede ser utilizado. En este fluido la RCP ha sido capaz de detectar hasta 50 % del ADN en los pacientes inmunocompetentes diagnosticados clínicamente con una toxoplasmosis ocular;¹⁵ sin embargo, la toma de este tipo de muestra solo se justifica para el diagnóstico de casos atípicos severos o complicados que no responden a la terapia anti-*Toxoplasma*.¹⁶

La muestra de sangre es de más fácil acceso que otros fluidos oculares para el diagnóstico de la TXO, y algunos autores han encontrado valores de sensibilidad comparables con los del humor acuoso.^{8,17} Aunque la mayoría de los estudios utilizan fluidos oculares para la detección molecular, esos resultados sugieren continuar la evaluación de la utilidad diagnóstica de la sangre para la detección de infecciones por *T. gondii* en pacientes con sospecha de TXO.

En Cuba existen pocos trabajos publicados sobre esta temática. *Delgado García* y otros,¹⁸ estudiaron 65 casos de coriorretinitis, utilizando el fondo de ojo y la fijación del complemento como métodos para el diagnóstico. Años más tarde, se realizó un estudio en 21 niños con el diagnóstico de coriorretinitis toxoplásmica (CRT), de los cuales 43 % tenía lesiones activas, identificadas a través del fondo de ojo y de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma* IgG por inmunofluorescencia indirecta.¹⁹

En el presente estudio el objetivo era aplicar herramientas diagnósticas como la serología y la biología molecular en muestras de sangre periférica, que contribuyan al diagnóstico temprano de la toxoplasmosis en pacientes con lesión ocular en Cuba, lo que unido a un tratamiento eficaz, ayude a disminuir la morbilidad producida por este agente y a reducir, en la medida de lo posible, las secuelas generadas por esta afección, así como a mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal de comparación de grupos con 67 pacientes de la consulta de uveítis del Hospital oftalmológico "Ramón Pando Ferrer", localizado en

La Habana, a los que se les extrajo muestra de sangre antes del tratamiento específico, para realizar pruebas serológicas y de biología molecular. Todas se trasladaron para ser procesadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Toxoplasma* del Departamento de Parasitología, del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

Formaron parte de esta investigación todos los pacientes con uveítis, independientemente del diagnóstico realizado. Se clasificaron en 2 grupos, según el criterio clínico de los oftalmólogos, por el patrón de la lesión ocular vista al fondo de ojo. El primer grupo estuvo compuesto por 47 pacientes con lesiones sugestivas de una CRT y el segundo grupo por 20 pacientes con signos sugestivos de una coriorretinitis no toxoplásmica (CRNT). La clasificación de cada paciente estuvo a cargo del médico de consulta; a todos se les llenó un documento de consentimiento informado donde se les dio a conocer la importancia, los riesgos, beneficios y la utilidad del estudio, y se les explicó que las muestras bajo investigación se emplearían solo con fines diagnóstico. La aceptación de manera voluntaria, se consignó por escrito.

A cada uno de ellos se les realizó una toma de muestra de 5 mL de sangre y se depositó en tubos de ensayo de 15 mL que contenían 1 mL de ácido cítrico dextrosa (ACD), para la obtención de suero y precipitado celular.

Definiciones

Caso de toxoplasmosis ocular: todo paciente que cumpla con uno (o más) de los criterios clínicos al fondo de ojo siguientes:²⁰

- Lesión primaria o activa: foco de coriorretinitis blanco-amarillento o blanco-grisáceo, algo sobre elevado con bordes borrosos y con edema retiniano adyacente.
- Lesión cicatrizal: cicatriz extensa atrófica con bordes pigmentados, límites bien definidos.
- Lesión recurrente: retinitis focal adyacente a una cicatriz.

*Clasificación clínica de la toxoplasmosis ocular*²¹

- TXO congénita clásica: lesiones radiales que originan una forma de roseta, bilateral, de localización macular.
- TXO no congénita: placa hiperpigmentada con traslucidez de la retina (cicatriz).

Pruebas serológicas

Se realizó inicialmente, la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de los anticuerpos anti-*Toxoplasma* IgG, según lo descrito por Goldman y Cover, 1962.²²

De cada paciente se evaluaron diluciones dobles de suero a partir de 1:16. Las láminas empleadas para la realización de la IFI se encontraban sensibilizadas con antígeno toxoplásmico (cepa RH) cultivado en ratón. A cada pocillo de la lámina se le añadieron 10 µL de muestra de suero del paciente. Los anticuerpos IgG anti-*T. gondii* presentes en la muestra, se unieron al antígeno toxoplásmico fijado en la lámina y formaron complejos, que mediante el lavado permitió eliminar los anticuerpos no específicos, mientras que los específicos permanecieron fijados a la lámina o fase sólida. Los anticuerpos anti-IgG humanos, conjugados con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA, USA), se unieron a las IgG humanas fijadas sobre el antígeno. Mediante el lavado se fijaron en la pared de este, junto con las IgG humanas que pudieron encontrarse presentes. La lectura de la IFI se realizó

con un microscopio de fluorescencia (Leica, Alemania) cuya luz ultravioleta excitaba al isotiocianato de fluoresceína y hacía que emitiera luz fluorescente de color verde.

La técnica de ELISA empleada fue una determinación cualitativa automatizada en los sistemas de la familia VIDAS TOXO, que permitió la detección de las IgG, IgM y avides IgG anti-toxoplásmicas en suero por técnica ELFA (*enzyme linked fluorescent assay*) (Minividas, BioMérieux, Francia). En los pacientes con anticuerpos IgM positivo, la avides IgG ayudó a discriminar una infección antigua de una primo-infección de más de 4 meses.²³

Extracción de ADN

Se utilizó el método tradicional de fenol-cloroformo descrito por *Maniatis* y otros.²⁴ El precipitado celular obtenido de la centrifugación de los 5 mL de sangre total de cada paciente con ACD, fue lavado con tampón fosfato salina (pH 7,5) y disuelto en 300 µL de tampón de lisis (tris-HCl 50 mM pH= 8, EDTA 25 mM, NaCl 25 mM, SDS al 1 %) y 100 µg/mL de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania). El precipitado de los ácidos nucleicos que se obtuvo por centrifugación a 10 000 *g* durante 20 min, fue lavado con etanol 70 % y secado a temperatura ambiente; finalmente se resuspendió en 50 µL de tampón tris-EDTA (TE) (tris HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0), conservándose a - 20 °C hasta ser utilizado en la RCP.

Prueba de reacción en cadena de la polimerasa

Se amplificó un fragmento de 115 pb del gen B1 de *T. gondii* utilizando los cebadores B22 (secuencia 5´-AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA-3´) y B23 (secuencia 5´-TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC-3´) para estos fines.²⁵ La amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 25 µL, conformado por 2,5 µL de tampón de amplificación 10 x (tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM, gelatina 0,01 %) (Promega, EUA), 5 µL de ADN extraído de las muestras de sangre de pacientes, 200 µM de cada dNTP (Promega, EUA), 2 mM de MgCl₂ (Promega, EUA), 0,4 µM de cebadores (oligonucleótidos sintéticos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba), y 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega, EUA).

Para la RCP se incluyó un control positivo en cada experimento y se utilizó como molde 10 ng de ADN de la cepa RH de *T. gondii*. Igualmente, se incluyeron 2 controles negativos en cada experimento; la mezcla de la reacción tenía agua destilada estéril en lugar del ADN molde de *T. gondii* y control negativo de la extracción de ADN, que consistió en seguir el protocolo de extracción, sin partir del precipitado celular. A las muestras que resultaron positivas se les repitió el proceso de amplificación, con el fin de confirmar su positividad, y a las muestras negativas se le realizó un control de inhibición para descartar la presencia de inhibidores de la RCP. Este consistió en añadir a la mezcla de RCP además de la muestra a analizar, 10 ng de ADN de *T. gondii* de la cepa RH utilizado normalmente como control positivo.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, USA) con el programa de amplificación siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación 62 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final después del último ciclo a 72 °C por 10 min. Para la detección del producto de amplificación se analizaron 15 µL de cada mezcla resultante en electroforesis en gel de agarosa 2 %, preparado en tampón tris borato 0,5x (TBE) con bromuro de etidio 0,5 mg/mL. La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante luz ultravioleta, en un transiluminador (U:Genius, Inglaterra).

Para el análisis estadístico de las variables incluidas en el estudio se recopilaron los datos en el programa Microsoft Excel y se procesaron por los paquetes de programas Epiinfo 6.04 y Epidat 3.1. Luego se determinó la frecuencia absoluta y el porcentaje para las variables cualitativas; se utilizó la prueba de chi-cuadrado para comparar los porcentajes y la de Fisher cuando el número de casos era escaso. Para establecer asociaciones se usó el cálculo del riesgo de prevalencia (RP) con intervalos de confianza (IC) al 95 %. En todos los casos la asociaciones se consideraron significativas cuando se obtuvieron valores de $p < 0,05$.

Se calculó el índice Kappa después de obtenidos los resultados de las pruebas serológicas, con el cual se determinó la concordancia entre ellas. Se consideró una escala de interpretación del valor de Kappa en la que fueron aceptables valores mayores o iguales que 0,40 y excelentes los mayores que 0,75.

La sensibilidad y especificidad fue calculada para la prueba de RCP. La prueba de referencia se basó en los criterios clínicos a partir de los cuales se agruparon los pacientes estudiados en 2 grupos como se definió antes. El resultado de la prueba puede ser correcto: verdadero positivo (VP) y verdadero negativo (VN) o incorrecto, falso positivo (FP) y falso negativo (FN).

La sensibilidad diagnóstica es la probabilidad de que en un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo y se determina como la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica, según la fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

La especificidad por su parte es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo y se determina según la fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

La seguridad de la RCP optimizada fue evaluada a partir de la determinación de los valores predictivos positivos y negativos. También se calculó la razón de verosimilitud (RV) o cociente de probabilidad (conocidos en lengua inglesa como *likelihood ratios*).²⁶ Para ello se tuvo en cuenta el resultado positivo (RV+) y el resultado negativo (RV-). Estas razones se calcularon a partir de los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba, empleando las fórmulas siguientes:

$$\text{LR+} = (\text{sensibilidad}/1\text{-especificidad})$$
$$\text{LR-} = (1\text{-sensibilidad}/\text{especificidad})$$

RESULTADOS

En nuestro estudio, de los 47 pacientes con lesiones sugestivas de CRT, 100 % resultó positivo a la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* a través de las pruebas de IFI y ELISA IgG (tabla 1). De estos, solo 3 pacientes (6,4 %), fueron positivos a la prueba de ELISA IgM y 44 negativos (96,3 %).

Tabla 1. Comparación de los resultados de las diferentes pruebas de diagnóstico de laboratorio para la toxoplasmosis entre el grupo de pacientes con coriorretinitis toxoplásmica y coriorretinitis no toxoplásmica

Pruebas de diagnóstico	Grupo I Coriorretinitis toxoplásmica (n= 47)	Grupo II Coriorretinitis no toxoplásmica (n= 20)
	No. (%)	No. (%)
Inmunofluorescencia indirecta		
Positivos	47 (100)	7 (35,0)
Negativos	0 (0)	13 (65,0)
Títulos:		
Bajos	45 (95,7)	4 (20,0)
Intermedios	2 (4,2)	3 (15,0)
Altos	0 (0)	0 (0)
ELISA (IgG)		
Positivos	47 (100)	13 (65,0)
Negativos	0 (0)	7 (35,0)
ELISA (IgM)		
Positivos	3 (6,4)	0 (0)
Negativos	44 (96,3)	20 (5,0)

En cuanto a la detección de anticuerpos por IFI, el riesgo de prevalencia de anticuerpos positivos contra *Toxoplasma* fue 24,18 veces mayor en los que tenían CRT, que con CRNT (RP= 24,18; IC 95 %= 1,6-368,5; $p < 0,01$). Sin embargo, para el ensayo inmunoenzimático el riesgo de prevalencia de anticuerpos positivos contra *Toxoplasma* no fue tan alto (RP= 12,46, IC 95 %= 0,85-183; $p < 0,01$). A los 3 pacientes que resultaron positivos a los anticuerpos IgM, se les realizó la prueba de avidéz IgG para determinar la existencia o no de una infección reciente. De los pacientes 2 tuvieron un resultado fuerte para 66,7 %, solo 1 paciente tuvo un resultado de avidéz IgG débil, para 33,3 %; esto nos hace pensar que tuvo una infección aguda.

Se consideró una titulación baja cuando la dilución mayor positiva fue de 1:16 a 1:64, intermedia de 1:128 a 1:512, y alta de 1:1024 en adelante. Los niveles de anticuerpos IgG por IFI encontrados en los 2 grupos de pacientes fueron bajos e intermedios. En el grupo con CRT se encontraron títulos de 1:16 en 25 pacientes (53,2 %), 1:32 en 14 pacientes (29,8 %) y 1:64 en 6 pacientes (12,8 %); 2 pacientes tuvieron títulos comprendidos entre 1:128 y 1:256 para 2,1 % en ambos casos. En el grupo de CRNT, 65 % tuvo resultados negativos a la IFI, el 35 % restante mostró títulos variables entre 1:16 y 1:128.

De los 67 pacientes comprendidos en el estudio, 54 resultaron positivos a la IFI y a la prueba de ELISA; solo 6 de los pacientes que fueron positivos al ELISA tuvieron un resultado negativo a la IFI, para un índice de Kappa de 0,65, lo que se considera un valor de concordancia aceptable.

De los 47 pacientes del grupo con CRT, con la RCP se detectó el ADN de *T. gondii* en 15 de ellos; a su vez la IFI fue positiva, lo cual representa una sensibilidad diagnóstica de 31,9 % (tabla 2). Todos los pacientes del grupo con CRNT resultaron negativos a la RCP, obteniéndose así una especificidad diagnóstica de 100 %. La seguridad de la prueba se evaluó al determinar los VPP y VPN que fueron de 100 % (IC 95 %: 96,67-100) y 38,46 % (IC 95 %: 24,28-52,65), respectivamente. Es de destacar que de las 15 muestras de sangre positivas por la RCP en el grupo de 47

pacientes con TXO, la mayoría pertenecían a pacientes con coriorretinitis recurrente (13/15; 86,6 %) y solo dos provenían de pacientes con coriorretinitis toxoplásmica aguda (2/15; 13,3 %).

Tabla 2. Relación entre los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa-B1 y la presencia o ausencia de toxoplasmosis ocular en los hallazgos clínicos relacionados con la enfermedad

Reacción en cadena de la polimerasa-B1	Pacientes		
	Total	Coriorretinitis toxoplásmica (n= 47)	Coriorretinitis no toxoplásmica (n= 20)
Positivo	15	15 (31,91 % ^a)	0
Negativo	52	32	20 (100 % ^b)
Total de pacientes	67	47	20

^a: sensibilidad diagnóstica de la reacción en cadena de la polimerasa-B1,
^b: especificidad diagnóstica de la reacción en cadena de la polimerasa-B1.

La razón de verosimilitud para los negativos fue de 0,68 (IC 95 %: 0,56-0,83), esto se corresponde con cambios insignificantes según la clasificación de *Jaeschke*.²⁶ La razón de verosimilitud para los positivos resultó imposible de determinar al existir un valor igual a 0.

DISCUSIÓN

El examen clínico-oftalmológico a través del fondo de ojo se considera de mucho valor para el diagnóstico de esta entidad. Por medio del oftalmoscopio, los especialistas pueden observar lesiones oculares que por sus características clínicas determinan el grado de actividad y así clasificarlas en primarias o recurrentes.²⁷ Sin embargo, la existencia de una severa reacción inflamatoria o, en ocasiones, de lesiones atípicas pueden dificultar el diagnóstico oftalmológico, por lo que se hace necesario la realización de pruebas serológicas y moleculares con la finalidad de detectar anticuerpos específicos.^{16,28}

Dentro de los métodos diagnósticos serológicos se encuentran la IFI y la prueba de ELISA, cuyos resultados positivos para los anticuerpos tipo IgG, indican que el paciente presenta títulos de anticuerpos contra el parásito. Un resultado negativo descarta el origen toxoplásmico. Los anticuerpos IgG específicos alcanzan una concentración máxima de 1 a 2 meses después de la infección y permanecen positivos indefinidamente.

La toxoplasmosis es una de las infecciones parasitarias más frecuentes del mundo, con hasta 300 millones de personas infectadas, una seroprevalencia que varía desde 10 y 50 % en países desarrollados de clima templado, y hasta más de 80 % en países subdesarrollados del trópico.²⁹ En este estudio, 47 (100 %) pacientes con CRT resultaron positivos a través de las pruebas serológicas de IFI y ELISA IgG, lo cual demuestra que habían sufrido un episodio de infección por *Toxoplasma*. Resultados similares se reportaron por algunos autores,³⁰ que evaluaron pacientes con TXO por estos mismos métodos, obteniendo una positividad a los anticuerpos IgG de 80 a 100 %. Recientemente, *Mattos* y otros⁵ estudiaron 49 pacientes procedentes de Brasil con lesiones oculares sugestivas de TXO, y encontraron

resultados serológicos igual positivos.⁷ Los 35 casos con CRNT que resultaron tener títulos bajos e intermedios por medio de la IFI, pudieron deberse a lo reportado por *Spalding* y otros, quienes refieren que las encuestas serológicas han permitido estimar que más de 10 % de la humanidad ha tenido contacto con este parásito, por lo que la prevalencia de anticuerpos en la población sana es elevada; a su vez plantea que la relación existente entre el clima caluroso y húmedo aumenta la frecuencia de esta enfermedad.³¹

Para determinar el momento aproximado de la infección en estos pacientes seropositivos a IgG se estudiaron los anticuerpos IgM específicos. Su presencia aparece en la primera semana de la infección y es un marcador de fase aguda de la enfermedad. En el transcurso de varios meses desaparece y su ausencia indica una infección de más de 6 meses de evolución.^{2,7} En nuestra investigación, 3 de los pacientes (6,4 %) del grupo con CRT, se mostraron positivos a la prueba de ELISA IgM. Eso puede ser debido a la presencia de una coriorretinitis activa. Estos resultados coinciden con lo descrito por *Lappalainen* y otros.³² Años más tarde, *Mattos* encontró en su estudio que todos aquellos casos que resultaron positivos a IgG, fueron negativos para ELISA IgM. Es habitual encontrar en las coriorretinitis activas que en los títulos bajos de IgG no se detecten las IgM.⁵ Para determinar si la infección primaria o reciente en nuestros pacientes correspondió a un período menor de 4 meses, se realizó el estudio de avidéz IgG en los que tenían anticuerpos positivos a IgM. Se encontró que en uno solo de estos 3 pacientes, el resultado de la avidéz fue débil o positivo, indicando que pudo existir una infección aguda reciente adquirida o una reactivación asociada a cicatriz previa. De esta manera se pudo confirmar que todas las muestras de pacientes con infección toxoplásmica crónica mostraron también alta avidéz. Estos hallazgos son similares a los de otros autores, en los cuales los pacientes estudiados con TXO que tuvieron una avidéz IgG débil, también fueron positivos a los anticuerpos IgM.^{2,23}

En nuestra investigación, aunque la totalidad de los pacientes con CRT resultaron positivos a las técnicas de IFI y ELISA con un índice de concordancia aceptable, la IFI demostró ser más útil. Algunos autores plantean que la combinación de varias técnicas aumenta la especificidad del diagnóstico.¹⁶

La RCP ha mostrado ser una herramienta útil en el diagnóstico de la TXO sobre todo en los pacientes con severa reacción inflamatoria del vítreo que presentan una típica apariencia denominada comúnmente como "faro en la niebla". Los pacientes con sida, a diferencia de la toxoplasmosis ocular tradicional, tienen una presentación diferente de la enfermedad, con una amplia variedad de signos clínicos; las lesiones pueden no originarse de cicatrices coriorretinianas previas, pueden ser bilaterales, difusas y multifocales, y el diagnóstico diferencial incluye: citomegalovirus, necrosis retinal externa progresiva, necrosis retinal aguda causada por los virus herpes simple o varicela zóster, tuberculosis, toxocariasis, cisticercosis, retinitis sifilítica y retinitis candidiásica.^{15,16}

Se utilizó la RCP convencional y se obtuvo una sensibilidad diagnóstica de 31,9 %, así como una especificidad de 100 %. La sensibilidad está dentro del rango de lo reportado en los escasos estudios que evalúan la RCP en pacientes inmunocompetentes, para este tipo de fluido bilógico (6,6- 68,75 %).^{5,8,12,16,17}

Al evaluar la razón de verosimilitud para los negativos de la RCP, se encontraron cambios insignificantes según la clasificación de *Jaeschke*,²⁶ lo que habla a favor de la buena especificidad de la técnica y confirma su utilidad para descartar los casos negativos. Estudios futuros, empleando mayor número de muestras, pudieran mejorar los resultados obtenidos, sobre todo si se tiene en cuenta que no existe una regla de oro definida para la TXO, lo cual hace difícil determinar con exactitud

los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica de la RCP. Adicionalmente, sería muy útil seguir evaluando diferentes muestras biológicas en paralelo como el humor acuoso y vítreo, por medio de estos procedimientos moleculares.

Recientemente, *Mattos* y otros, utilizando el mismo juego de cebadores empleados aquí (B22-B23), reportaron una sensibilidad similar a la encontrada por nosotros (40,8 %), al evaluar la sangre de 49 pacientes brasileños con TXO, teniendo en cuenta los criterios clínicos.⁵

Se demostró la utilidad de la técnica de RCP para detectar la infección en la sangre de pacientes tanto en infecciones activas o agudas, como en casos de coriorretinitis recurrente, lo que demuestra la utilidad de esta técnica para detectar casos positivos en ambas formas clínicas de la TXO. Este parásito permanece silente y en fase inactiva en diferentes zonas del organismo (músculos, pulmón, cerebro, etc.). En un porcentaje de pacientes (alrededor de 2 %), la infección puede reactivarse por mecanismos hasta ahora poco conocidos y dar una respuesta inflamatoria local. En el caso del ojo, esta reactivación puede derivar en una destrucción de la retina recurrente, provocando destrucción del tejido y necrosis celular con la consiguiente pérdida severa de la agudeza visual. Resultados similares a este han sido reportados por otros autores, que igualmente sugieren que la circulación de los parásitos en sangre de individuos inmunocompetentes puede estar asociada a la reactivación de la enfermedad ocular, debido a ruptura de los quistes de otros tejidos del cuerpo además del tejido ocular; por lo tanto, sugieren que no debe ser considerado como un evento local.^{5,8,17}

La RCP-B1 al utilizar muestra de sangre mostró valores similares de validez y seguridad diagnóstica a los reportados en la literatura, lo cual constituye un aval para la utilización de esta técnica en las condiciones cubanas.

En resumen, este trabajo demuestra por primera vez en Cuba, la utilidad del uso combinado de métodos de diagnóstico serológicos y moleculares para confirmar la presencia de infección por *T. gondii* en los casos con coriorretinitis. Entre ellos, los métodos serológicos fueron de gran ayuda para el diagnóstico de la TXO por su mayor sensibilidad, mientras que la RCP-B1 mostró su utilidad máxima para descartar los casos negativos debido a su mayor especificidad. Teniendo en cuenta estos resultados y los de otros estudios realizados por diferentes autores,^{17,18} se sugiere continuar las investigaciones con estas técnicas de diagnóstico para evaluar su aplicabilidad con otros tipos de muestras biológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:941-5.
2. Holland GN, O'Connor GR, Belfort Jr R, Remington JS. Toxoplasmosis. En: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR, editors. *Ocular infection and immunity.* St Louis: Mosby Year-Book; 2006. p. 1183-223.
3. Pardo A, Callizo J, Valldeperas X. Revisión de la prevención y tratamiento de la toxoplasmosis ocular. *Tarragona. Rev An Oftalmol.* 2004;12:11-20.

4. Sudharshan S, Ganesh SK, Biswas J. Current approach in the diagnosis and management of posterior uveitis. Indian J Ophthalmol. 2010;58:29-43.
5. Mattos CC, Meira LS, Ferreira AI, Frederico FB, Hiramoto RM, Almeida GC, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70:362-6.
6. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96(S1):205-15.
7. Montoya TG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis 2002;185(Suppl 1):73-82.
8. Figueroa MS, Bou G, Marti-Belda P, Lopez-Velez R, Guerrero A. Diagnostic value of polymerase chain reaction in blood and aqueous humor in immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. Retina. 2000; 20:614-9.
9. Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, et al. Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. J Clin Microbiol 2009;47:2131-5.
10. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N, Mochizuki M. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiplex and quantitative real-time. Jpn J Ophthalmol. 2011;55(5):495-501.
11. Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 1996;23:277-82.
12. Silveira C, Vallochi AL, Rodrigues da Silva U, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB, et al. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. Br J Ophthalmol. 2011;95(3):396-400.
13. De Boer JH, Verhagen C, Bruinenberg M, Rothova A, de Jong PT, Baarsma GS, et al. Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. Am J Ophthalmol. 1996;121:650-8.
14. Danise A, Cinque P, Vergani S, Candino M, Racca S, De Bona A, et al. Use of polymerase chain reaction assays of aqueous humor in the differential diagnosis of retinitis in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1997;24:1100-6.
15. Montoya J, Parmley S, Liesenfeld O, Jaffe G, Remington J. Use of the polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis. Ophthalmology. 1999;106:1554-63.
16. Gegundez JA. Exploraciones complementarias en las uveítis. Arch Soc Esp Oftalmol. 2003;78:1-5.
17. Bou G, Figueroa MS, Martí-Belda P, Navas E, Guerrero A. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 1999;37:3465-8.

18. Delgado G, González C. Coriorretinitis por toxoplasmosis: estudio de 65 casos. Rev Cubana Med Trop. 1978;30:69-78.
19. González I, Díaz M, Pérez J. Coriorretinitis por *Toxoplasma* en niños. Rev Cubana Med Trop. 1999;51:138-42.
20. Álvarez G, Rey A, Adán A. Características clínicas de toxoplasmosis ocular en población inmigrante del área de Barcelona: estudio de 22 pacientes. Arch Soc Esp Oftalmol. 2010;85:202-8.
21. Campos A M, Mariastrid C, Carreño M. Breve descripción de la toxoplasmosis [citada 13 Feb 2012]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/macr091/toxoplasmosis-11555328>
22. Goldman M, Cover RK. Fluorescence inhibition test for toxoplasmosis. Public Health Lab. 1962;20:80-7.
23. Lappalainen M, Koskela P, Koskiniem M, Ammala P, Hilesnaa V, Terano K, et al. Toxoplasmosis acquired during pregnancy. Improved serodiagnosis based on avidity of IgG. J Infect Dis. 1993;167:691-7.
24. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York; 1992.
25. Burg JL, Grove CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Directed and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; 27:1787-92.
26. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL, the Evidence-Based Medicine Working Group. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? JAMA. 1994;271:703-7.
27. Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier Jr MN, et al. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. Mem Inst Oswaldo Cruz . 2009;104:345-50.
28. Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Mazier D, Paris L. Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2008;46:1965-7.
29. Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H, et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep. 2009;58(RR-4):1-207.
30. Garweg JG, Scherrer J, Wallon M, Kodjikian L, Peyron F. Reactivation of ocular toxoplasmosis during pregnancy. BJOG. 2005;112:241-2.

31. Spalding SM, Amendoeira MR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38:173-7.

32. Heukelbach J, Meyer-Cirkel V, Sabóia R, Gomide M, Nogueira JA, Saweljew P, et al. Waterborne Toxoplasmosis, Northeastern Brazil. Emerg Infect Dis. 2007;13:287-9.

Recibido: 30 de mayo de 2012.

Aprobado: 4 de octubre de 2012.

Martha Solangel Rodríguez Peña. Laboratorio Nacional de Referencia de *Toxoplasma*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, La Lisa. AP 601, CP 13000. La Habana, Cuba. Correo electrónico: msol@ipk.sld.cu