

SIMPOSIO: ZONOSIS PARASITARIAS. NUEVOS ENFOQUES DESDE EL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA INEI-"DR. CARLOS G. MALBRÁN"

DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DE LA TOXOPLASMOSIS

Ledesma B. A. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI "Dr. Carlos G Malbran
"ANLIS e-mail: bibilede@anlis.gov.ar

La mayoría de las infecciones causadas por el parásito *Toxoplasma gondii* son relativamente inofensivos pero en algunos casos la infección puede causar una enfermedad grave e incluso mortal. El resultado de una infección con *T. gondii* puede depender de varios factores, aunque sólo el estado inmune del huésped se ha demostrado que juegan un papel importante. En las últimas décadas, el diagnóstico molecular que se basa en la detección de ADN genómico del parásito, se ha utilizado con éxito en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénitas, ocular y en pacientes inmunocomprometidos a partir de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico (LA), biopsia tejido de cerebro, humor vítreo, humor acuoso, líquido de lavado broncoalveolar (BAL). En el Laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) se ha desarrollado la técnica de PCR Cualitativa con el objetivo de detectar reactivaciones precozmente en pacientes seropositivos que reciben un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) Para el proceso de amplificación se utilizó el gen universal B1, repetido tandem 35 veces. Se analizaron: 104 muestras de sangre entera, 5 lavados broncoalveolar (BAL) y 1 biopsia. Donde de las muestras de sangre 32 (30.76 %) fueron positivas y 72 (69.23%) negativas. De las 5 muestras de BAL 4 fueron positivas (80%) y 1 negativa (20%); por último se analizó una biopsia con resultado negativo. La técnica de PCR demostró ser útil para la detección de la reactivación de toxoplasmosis en pacientes transplantados pero representa una limitación en la imposibilidad de cuantificar la cantidad de parásitos presentes en las muestras. La PCR en tiempo real es una nueva tecnología, que ha revolucionado el diagnóstico molecular, por tener la ventaja de la detección automática de los productos amplificados, evitando así la posible contaminación y reducción del riesgo de obtener resultados falsos positivos. En el laboratorio se analizaron dos marcadores moleculares, denominados B1 y TgIRE para la detección de taquizoítos circulantes de *T. gondii* mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando dos sistemas de detección, TaqMan y SYBR Green I. El análisis del estudio comparativo se basó en la diferencia en el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de detección (Ct) en las distintas cantidades de taquizoítos (Tq), donde se evidenció una sensibilidad superior del sistema TaqMan frente al SYBR Green I en ambos marcadores biológicos. El marcador B1 permitió la detección de 10 Tq mediante ambos sistemas; aunque reveló un valor de Ct superior para TaqMan (34.15 ± 0.99) frente a SYBR Green I (37.51 ± 1.538) y en un caso TaqMan detectó el ADN correspondiente a solo 1Tq. La diferencia entre los sistemas fue más evidente en el elemento TgIRE donde el límite de detección para SYBR Green I fue de 1000Tq con valores de la media de Ct de 39.24 ± 0.39 , cercanos al final del ciclo de amplificación, en cambio para el sistema TaqMan fue 100 veces superior, al permitir la detección de 10 tq con valores de Ct promedio de 38.27 ± 1.071 . Estos valores permitieron observar que B1 denota un límite de detección superior a TgIRE dentro del sistema más sensible. Dado estos resultados se evaluaron distintos fluidos biológicos por el sistema de detección B1-TaqMan, que

suministraron los siguientes resultados: en muestras de humor acuoso la detección de la carga parasitaria fue de entre 1000 a 10 tq; en muestras de LCR los valores se situaron cercano al límite de detección de entre 1 y 10 taquizoítos; en muestras de sangre el valor de detección fue inferior a 10 tq; en muestras de tejido la detección fue próximo entre 1000 a 1 taquizoítos y en muestras de líquido amniótico no se ha evidenciado presencia de ADN de *T. gondii*. Estos resultados permiten proponer al sistema B1-TaqMan como una herramienta valiosa en el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis humana, en pacientes inmunosuprimidos donde su sistema inmunológico está deteriorado y los test serológicos utilizados para la detección de anticuerpo anti-*T. gondii* son de poca utilidad.