

## Caracterización biológica y antigénica de cepas de *Toxoplasma gondii* aisladas de carnes de cerdo en un frigorífico de Bogotá

### Biologic and Antigenic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Swine Meat From Frigorifics

CLAUDIA HERRERA<sup>1</sup> NHORA DE SÁNCHEZ<sup>2</sup> ANDREA HORTÚA M.SC, SANDRA BELTRÁN, M.SC, YARIMA CONTRERAS<sup>3</sup>, M.SC.

<sup>1</sup> M.Se., investigadora asociada, Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, CIMPAT; profesora de cátedra, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Los Andes, Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, CIMPAT Apartado aéreo 4976. Carrera 1ª No. 18-A-10- Bogotá, D. C., Colombia. Telefax: +57-1-3324540. [cherrera@uniandes.edu.co](mailto:cherrera@uniandes.edu.co)

<sup>2</sup> M.Se., profesora de planta, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Los Andes, Bogotá, D. C., Colombia.

<sup>3</sup> Estudiantes de Maestría, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, CIMPAT Universidad de Los Andes, Bogotá D. C., Colombia.

Fecha de recepción: 11/03/2005 - Fecha de aceptación; 13/09/2005

## RESUMEN

**Objetivo.** Caracterizar biológica, antigénica y molecularmente siete cepas de *Toxoplasma gondii*, cinco aisladas de cerdos en un frigorífico en Bogotá (PC117, 5TN, 61, 84 y 121) y una aislada de heces de gato (Yaco) en Montería, Córdoba, Colombia. Se tomó como referencia la cepa tipo I RH. **Materiales y métodos.** Es un estudio comparativo entre cepas. Se inocularon en ratones para obtener sueros y evaluar la respuesta inmunológica. Los sueros se sometieron a la técnica de inmunofluorescencia indirecta, IFI, para detección de anticuerpos IgG anti-toxoplasma. Se utilizó la técnica de Western-blot para observar el perfil antigénico entre cepas. Para este estudio se usaron fracciones proteicas de las cepas PC 117 RH y 5TN enfrentadas a sueros humanos con títulos superiores a 1/256. A los cerebros de ratones infectados se les realizó una evaluación microscópica y molecular. **Resultados.** La respuesta inmune inducida por las cepas presentó títulos entre 1/16 y 1/64 ocho días después de la infección, y se mantuvo casi hasta 90 días. Se encontraron diferencias antigénicas entre las cepas de alta virulencia, RH, PC117 y 5TN. Se obtuvieron quistes de la cepa Yaco y 121. La presencia del parásito se confirmó por PCR en

Yaco, 121, 61 y 84. **Conclusiones.** Existen diferencias entre las cepas analizadas que muestran que las aisladas de cerdo presentan una mayor virulencia en comparación con la de gato. Esto sugiere que podría existir alguna diferencia genómica entre las cepas. Estas cepas podrían usarse como antígeno nativo en la prueba de IFI.

**Palabras clave:** *Toxoplasma gondii*, aislamiento de cepas, caracterización, inmunofluorescencia indirecta.

---

## ABSTRACT

**Objective.** A molecular, antigenic, and biologic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* was performed, five isolated from pigs from one of Bogotá', Colombia, slaughterhouse. (PC117, 5TN, 61, 84 and 121) and one isolated from cat feces in Montería, Córdoba, Colombia (Yaco). As reference strain was used type I RH. **Methods.** Comparative study within strains. Strains were inoculated in mice in order to obtain serum and evaluate the immunologic response. Serums were analyzed by the indirect immunofluorescence technique (IFI) to detect antibodies IgG *anti-Toxoplasma*. A Western-blot technique was used to visualize an antigenic profile within strains analyzed. For this study, protein fractions of RH y 5TN PC 117 strains were used against human serum with titres over 1/256. Also, a molecular and microscopic evaluation of infected mice brains was performed. **Results.** Induced molecular response of the strains had titres within 1/16 and 1/64 eight days post-infection, and it remained until 90 days after infection. Differences were found within high virulence strains (RH, PC117 y 5TN) at antigenic level. Cysts of Yaco and 121 strains were obtained. The presence of the parasite was confirmed in Yaco, 121, 61 y 84 by PCR technique. **Conclusions.** There are differences within all analyzed strains, showing that the strains isolated from pork meat are more virulent than the strain isolated from cat. This suggests that a genomic difference could exist within them. These strains may be used like native antigen in IFI tests.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, isolation strain, characterization, indirect immunofluorescence technique.

---

## INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii*, el agente causal de la toxoplasmosis, tiene como hospederos definitivos a los integrantes de la familia *felidae* y como hospederos intermediarios a 220 vertebrados, aproximadamente, entre los cuales se encuentran el hombre y el cerdo (1).

Los estudios realizados en modelos de ratón indican que las cepas tipo I son altamente virulentas y son las responsables de causar infección aguda en ratones; las cepas tipo II y III son relativamente no virulentas y están asociadas con la infección crónica en estos animales (2). Estos estudios despertaron el interés de muchos investigadores, quienes se formularon el siguiente interrogante: ¿es posible que, al igual que sucede en los modelos de ratón, la progresión y la variabilidad de la enfermedad en humanos puedan deberse al tipo de cepa que cause la infección? (3).

Durante los últimos años, se han adelantado algunos estudios dirigidos al análisis de la población genética del parásito en muestras de pacientes infectados y se encontró que el 75% de los casos de infección congénita analizados en España, presentaba infección con cepas tipo I (4); en Francia, el 76% de los casos de infección congénita analizados, al igual que el 76% de los pacientes inmunosuprimidos incluidos en el estudio, presentaba infección con *T. gondii* causada por cepas tipo II (5).

Lo mismo ha sucedido con los estudios orientados a lograr la serotipificación de las cepas de *T. gondii*. Por ejemplo, Handman y Remington detectaron y caracterizaron antígenos de la membrana del parásito, por medio de los cuales se ha podido llegar a afirmaciones interesantes sobre las diferencias existentes en cuanto a dichos antígenos, en cepas virulentas tipo 1 y en

cepas no virulentas tipo 2 y 3 (esta clasificación es válida para estudios en los modelos de ratón) (2, 6, 7).

Con el análisis de proteínas Western-blot, Sharma y Remington (8) demostraron que tres cepas estudiadas compartían ocho proteínas mayores, pero que, en cada tipo de cepa, había antígenos específicos menores que no se compartían. También se describió un anticuerpo monoclonal que reconocía un antígeno de membrana de 23 kd en cepas virulentas y que, aparentemente, estaba ausente en cepas no virulentas (9).

Por diferente vía, se reportaron tres patrones isoenzimáticos diferentes en siete cepas de *T. gondii*.

Las tres cepas altamente patogénicas, que no producen ooquistes en gatos, exhibieron un patrón, mientras que las cepas no letales, productoras de ooquistes, se pudieron dividir en otros dos patrones diferentes al patrón de las cepas virulentas (10, 11).

Igualmente, Sibley y Boothroyd estudiaron 28 cepas de *T. gondii*, aisladas de ratones infectados, las cuales presentaban diferencias en el tipo de virulencia. Por medio del estudio de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), demostraron que había patrones indistinguibles en las cepas virulentas; las cepas no virulentas mostraban patrones heterogéneos (7, 12).

Recientemente, se han realizado más estudios moleculares para diferenciar el tipo de cepa y tratar de entender por qué unas cepas tienen la capacidad de invadir más rápidamente y en mayor proporción que otras. Wong *et al.*, en 1993, encontraron que la actividad de la ADN polimerasa era mayor en las cepas virulentas que en las cepas no virulentas y que, probablemente, esta actividad estaba relacionada con la tasa de proliferación celular, como lo había sugerido Spandari en 1978 (9).

Más tarde, en 1995, esta afirmación fue demostrada por Makioka *et al.*, quienes usaron la cepa RH (13) altamente virulenta y la cepa ME49 no virulenta, encontrada por Lunde y Jacobs en 1983; Makioka confirmó el incremento en la actividad de la ADN polimerasa de la cepa RH al compararla con la cepa no virulenta ME49 (11). Por otro lado, se han llevado a cabo estudios de caracterización genética que han permitido observar que las cepas virulentas tienen un genotipo esencialmente idéntico, mientras que las no virulentas muestran un leve polimorfismo (7).

En España, se han hecho estudios de caracterización genética de cepas procedentes de animales de consumo humano y se encontró que existe una relación entre el tipo de cepa de *T. gondii* más frecuentemente observado en estos animales y el tipo de cepa detectado en los pacientes inmunosuprimidos y en los casos de infección congénita causada por el parásito (14).

En Colombia, se requiere determinar el tipo de cepa de mayor circulación, mediante caracterizaciones basadas en el comportamiento biológico y el perfil antigénico de cepas aisladas de diferentes hospederos. Esto permitiría tener mayor información epidemiológica sobre la toxoplasmosis en nuestro país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico, animales de experimentación.** Se usaron ratones de la cepa CFW (*Carwort Farm inbreed of Webster*), de 21 a 36 días de nacidos y de 3 g de peso, aproximadamente. Estos ratones fueron suministrados por el bioterio del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Los Andes.

Se obtuvieron muestras de suero de los ratones infectados con *T. gondii* con el fin de medir la respuesta inmune montada por el hospedero en el periodo posterior a la infección. Se analizaron algunas muestras de cerebro para verificar la presencia del parásito, por medio de observación microscópica de los quistes y detectándolos directamente por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Cepas.** Se evaluaron siete cepas extraídas de diferentes hospederos ([tabla 1](#)) procedentes de un frigorífico de Bogotá, al cual llegan cerdos provenientes de diferentes lugares de Colombia. La cepa aislada de heces de gato es proveniente del departamento de Córdoba.

**Tabla 1****CEPAS EVALUADAS EN EL ESTUDIO**

Cepa	Forma parasitaria	Hospedero
RH	Taquizoítos (referencia)	Humana
YACO	Ooquistes; heces	Gato
5TN	Taquizoítos	Cerdo
PC117	Taquizoítos	Cerdo
61	Quistes	Cerdo
84	Quistes	Cerdo
121	Quistes	Cerdo

Para la caracterización biológica y antigénica de las cepas extraídas de carne de cerdo, se tomó como parámetro la cepa RH (tipo I) y la cepa no virulenta Yaco (tipo II), aislada de heces de gato y caracterizada en el CIMPAT.

**Obtención de sueros inmunes.** Se inocularon cuatro ratones con cada cepa (61, 84, 121 y Yaco) y, como controles negativos se evaluaron dos ratones inoculados con PBS. No se evaluaron las cepas PC117, 5TN y RH, ya que el tiempo para inducir la producción de anticuerpos es muy corto.

Los sueros obtenidos se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), para observar la respuesta inmunológica del ratón frente a las cepas. La reacción se consideró positiva cuando se obtuvieron títulos de 1/8 o mayores.

**Detección de quistes cerebrales.** Se extrajo el cerebro de los ratones inoculados con las cepas 61, 84, 121 y Yaco para practicar improntas en láminas que, posteriormente, se colorearon con PAS (*Periodic Acid Schiff*), ya que los quistes de *T. gondii* son positivos para ella. Después de colorear las láminas se observaron directamente al microscopio con 40 y 100 aumentos.

**Análisis del perfil antigénico.** Se evaluaron las cepas PC117, 5TN y RH por ser cepas virulentas y de rápida replicación, lo que permite obtener formas libres en el líquido intraperitoneal del ratón; se obtuvieron, aproximadamente, entre  $3,5 \times 10^7$  y  $4,0 \times 10^7$  taquizoítos para cada una de las cepas, contados en cámara de Neubauer. Se utilizó el Western-blot; como anticuerpo primario, se usó el suero humano positivo para IgG de *T. gondii* en un título de 1:1256 proveniente del banco de suero del CIMPAT y como anticuerpo secundario, anti-IgG humano marcado con peroxidasa (Sigma®).

Se estandarizaron las condiciones del gel de SDS-PAGE para obtener una buena separación de las proteínas. Se utilizó el gel concentrador al 5% y el de corrido a una concentración de 12%.

**Análisis molecular.** A partir de las muestras de cerebro de los ratones inoculados con las diferentes cepas, se realizó la extracción de ADN con el método *salting-out*, para llevar a cabo el análisis molecular por medio de PCR anidada; se emplearon dos parejas de iniciadores externos e internos (15), dirigidos a amplificar un segmento de 221 pb del locus SAG-2 del parásito ([véase tabla 2](#)).

**Tabla 2****GRUPOS DE INICIADORES UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN**

INICIADORES	SECUENCIA 5'-3'	PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN
SAG2F3 (sentido externo)	5'-TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC-3'	326 pb
SAG2R3 (antisentido externo)	5'-TCAAAGCGTGCAATTATCG-3'	
SAG2F2 (sentido interno)	5'-ATTCTCATGCCTCCGCTTC-3'	221 pb
SAG2R (antisentido interno)	5'-AACGTTTCACGAAGGCACAC-3'	

Los productos de amplificación se evaluaron en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Posteriormente, se visualizaron bajo luz ultravioleta.

Para la primera amplificación del locus SAG2, la mezcla de reacción contenía 1 mM de solución tam-pón de PCR, 1,5 U/ul de taq polimerasa, 0,088 mM dNTP, 1,4 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,3 mM de cada iniciador externo, y se agregaron 3 ul de ADN para completar un volumen final de 25 ul.

La mezcla de reacción para la PCR anidada utiliza los mismos reactivos de la primera reacción con las mismas condiciones de concentración, excepto que se usan los iniciadores internos y, como plantilla, se toma 1 ul de una dilución 1/10 del producto de amplificación de la primera PCR.

El programa de amplificación para las dos PCR presentaba las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de amplificación para la PCR 1, y 40 para la anidada, con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 54°C por 30 segundos, extensión a 68°C, 45 segundos y para las dos PCR se corría una extensión final a 68°C por 5 minutos.

## RESULTADOS

**Respuesta inmunológica mediante inmunofluo-rescencia indirecta.** Se analizaron 176 muestras de suero de los ratones inoculados con las diferentes cepas, tomadas en un periodo de 63 días ([figuras 1, 2, 3 y 4](#)).

En la [figura 1](#) se observa que las muestras de suero de los dos grupos de ratones, 1 y 2 (clasificación hecha según el tiempo de inoculación: los ratones del grupo 1 se inocularon 4 días antes que los del grupo 2), empiezan a presentar una respuesta inmunológica desde el día 14, con títulos de 1/32 y 1/ 16, respectivamente. Las muestras de suero obtenidas fueron positivas a la dilución 1/32, hasta el último día de análisis.

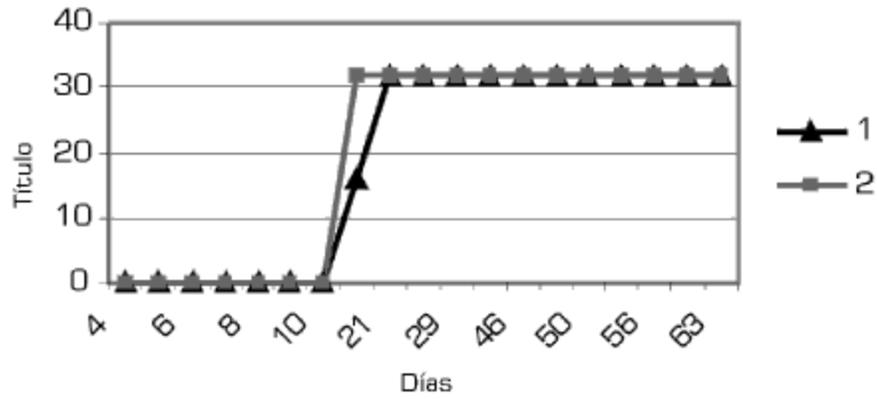
Estudios previos realizados en el Centro de Investigación en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT), por el grupo de Toxoplasmosis y Parasitología en General, demostraron que la cepa Yaco es tipo II (no virulenta).

La respuesta inmunológica de esta cepa está acorde con los resultados obtenidos por Nguyen en 1996 (16) con la cepa Beverley (tipo II) de referencia internacional; los ratones inoculados comenzaron a presentar títulos a los 11 días después de la infección y el resultado se mantuvo positivo hasta el día 525 del estudio, momento en que éste terminó.

En la [figura 2](#) se observa que las muestras de suero de los dos grupos de ratones (1 y 2) comienzan a presentar respuesta inmunológica desde el día 21 y 8, respectivamente, con un título de 1/16.

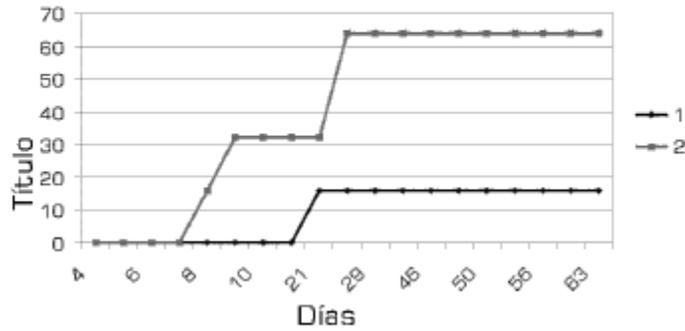
**Figura 1**

**RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LOS RATONES INFECTADOS CON LA CEPA YACO OBTENIDA A PARTIR DE OOQUISTES ENCONTRADOS EN HECE DE GATO**



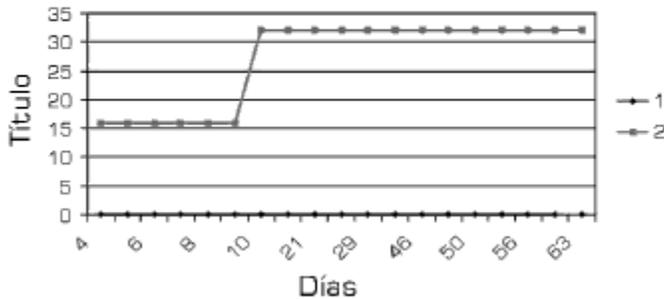
**Figura 2**

**RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LOS RATONES INFECTADOS CON LA CEPA 61, OBTENIDA A PARTIR DE CARNE DE CERDO CONTAMINADA CON QUISTES DE *TOXOPLASMA GONDII*.**



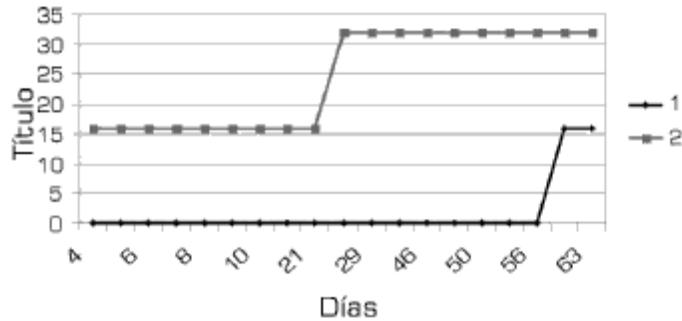
**Figura 3**

**RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LOS RATONES INFECTADOS CON LA CEPA 84, OBTENIDA A PARTIR DE CARNE DE CERDO CONTAMINADA CON QUISTES DE *TOXOPLASMA GONDII*.**



**Figura 4**

**RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LOS RATONES INFECTADOS CON LA CEPA 121, OBTENIDA A PARTIR DE CARNE DE CERDO CONTAMINADA CON QUISTES DE *TOXOPLASMA GONDII*.**

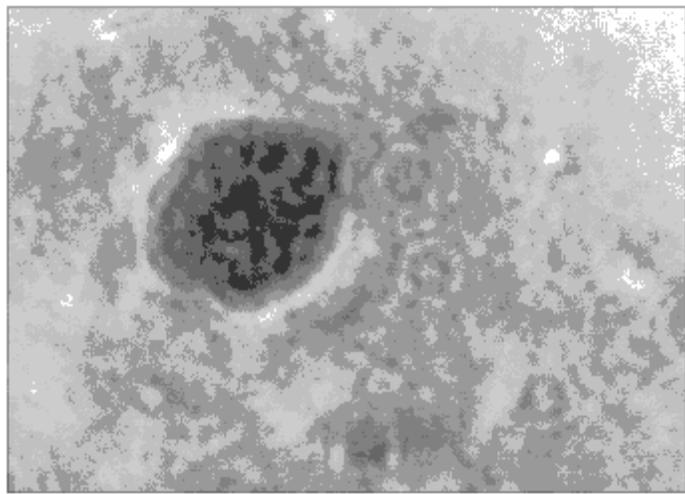


A diferencia de lo que se observó con la cepa Yaco, la cepa 121 presentó respuesta inmunológica a partir del día 4, lo que nos permitiría pensar que esta cepa es un poco más inmunogénica que las demás. Es posible que los futuros estudios de tipificación molecular permita aclarar si esta diferencia en la respuesta inmunológica se relaciona con su perfil genético.

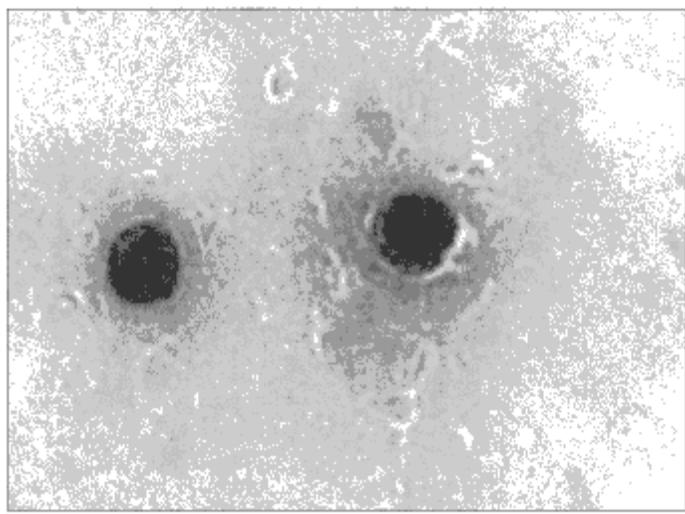
**Detección de quistes en cerebro.** Una vez realizada la tinción con PAS, se hizo la observación microscópica y se encontraron quistes ([figuras 5, 6 y 7](#)). En las láminas se observa que la tinción con PAS tiñe de rojo la membrana del quiste, debido a la reacción con el glicógeno que la compone.

**Figura 5**

**QUISTE DE *TOXOPLASMA GONDII*, COLOREADO CON PAS.  
CEPA YACO. AUMENTO DE 100X  
(CONTRERAS, 2003).**



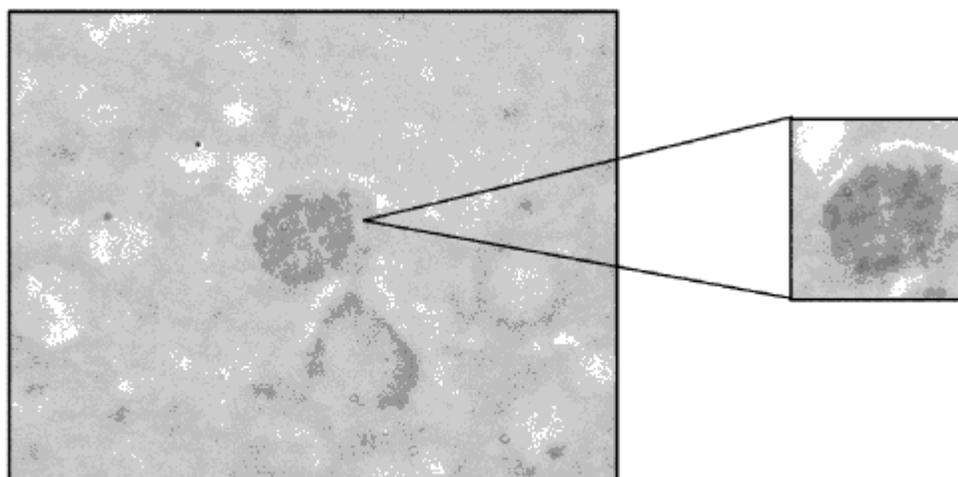
**5a**



**5b**

**Figura 6**

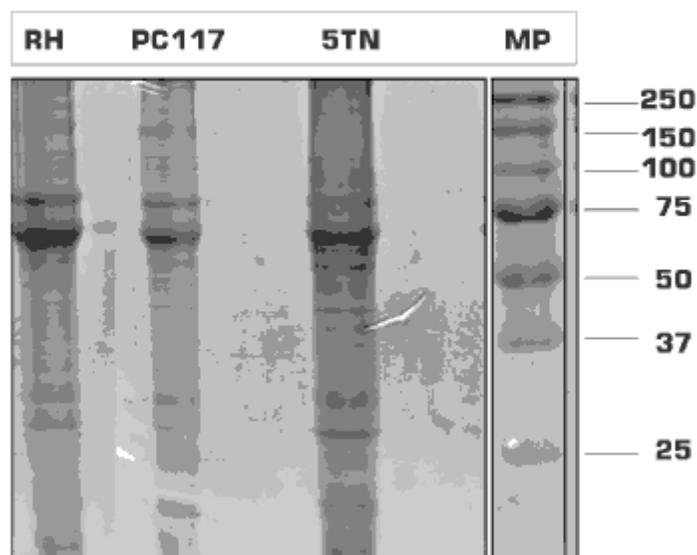
QUISTE DE *T. GONDII* TEÑIDO CON PAS, CEPA 121, AUMENTO 100X.



**Perfil antigénico.** La reacción inmunológica se llevó a cabo mediante corrido de fracciones proteicas de las cepas PC117, RH y 5TN. El gel muestra que las tres cepas comparten un patrón similar de bandas de proteínas; sin embargo, se presentan bandas en RH y 5TN que no se encuentran en PC117 ([figura 7](#)).

**Figura 7**

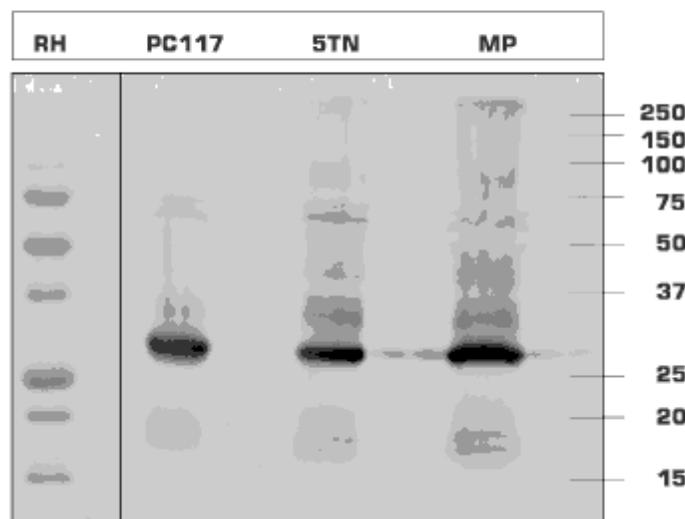
ELECTROFORESIS EN GEL DESNATURANTE DE LAS CEPAS RH, PC117 Y 5TN DE *T. GONDII*.



Se observa una banda cercana a los 70 kd ([figura 8](#)) que podría ser la reportada por Neida *et al.* (17), involucrada en el proceso de conversión de taquizoítos a bradizoítos; es más fuerte en la cepa 5TN. También, se observan bandas de entre 30 y 37 kd para las tres cepas y una banda en RH y 5TN de 18 kd, aproximadamente.

**Figura 8**

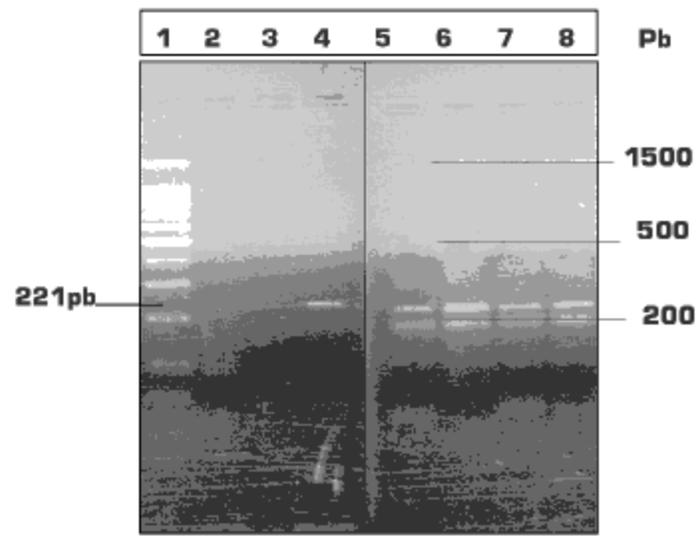
**MEMBRANA DE NITROCELULOSA TRATADA CON ANTICUERPO EN DILUCIÓN 1/100 Y ANTI IgG MARCADA CON PEROXIDASA EN DILUCIÓN 1/1000.**



**Análisis molecular.** En el gel de agarosa se observa amplificación de la banda esperada, de un peso molecular de 221 pb, en los carriles 1, 2, 3, 4 y 8; evidencia la presencia de ADN de *T. gondii* en los cerebros de los ratones infectados con cada una de las cepas (figura 9).

**Figura 9**

**ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA. 1) CEPA 61, 2) CEPA 84, 3)CEPA 121, 4) CEPA YACO, 5) MARCADOR DE PESO, 6) CONTROL NEGATIVO DE LA INOCULACIÓN (RATÓN INOCULADO CON PBS), 7) CONTROL NEGATIVO DE LA REACCIÓN Y 8)CONTROL POSITIVO (CEPA RH).**



## ANÁLISIS

La respuesta inmunológica de la cepa 61 muestra una notable diferencia frente a lo observado con la cepa Yaco, lo cual podría indicar que esta cepa es tipo I (virulenta), lo cual explicaría su muy notable poder patógeno en ratones. Sin embargo, es necesario confirmar esta hipótesis por medio de estudios moleculares.

Según los estudios realizados por Brown, en 1994 (18), la respuesta inmunológica de los ratones frente a la infección con *Toxoplasma gondii* no sólo depende del poder patogénico de la cepa, sino también, del estado inmunológico del animal inoculado. Esto podría explicar porqué los ratones del grupo 1 no presentaron respuesta inmunológica a la infección con el parásito.

Como se ha señalado en los resultados, fue posible observar quistes de *T. gondii* en cerebro de ratones infectados. El quiste de la cepa 121 mide 7,68  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, tamaño acorde con el tiempo infección, el cual corresponde a 7 meses. Los quistes de la cepa Yaco observados midieron entre 5,4 y 6  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, en 4 meses de infección, un poco más grandes -comparativamente con la cepa 121- para el corto tiempo de infección.

Para poder reportar la presencia de quistes es necesario que los ratones sobrevivan 30 días o más, tiempo en el cual el hospedero ha podido responder adecuadamente ante el parásito y se forman los quistes en el tejido.

Este comportamiento se observó en las cepas 61, 84, 121 y Yaco. Sólo se buscaron los quistes en el cerebro de los ratones, y no en otro tejido, ya que en este animal el cerebro es la zona más susceptible para su formación, como lo demostraron Garnham *et al.*, en 1962.

Una de las más abundantes proteínas de superficie halladas en *Toxoplasma*, es la correspondiente a p30, que constituye el 5% de la proteína total del taquizoito. Esta proteína aparece en las tres cepas en estudio, lo cual demuestra que el gen P30 se conserva mucho en todas las cepas de *T. gondii* (19).

También, se ha encontrado otro tipo de proteínas que se comparten entre las diferentes cepas de *T. gondii*, correspondientes a las proteínas que se encuentran en los gránulos densos de 23 y 28,5 kd. Se observa una banda cercana a los 70 kd que podría ser la reportada por Neide *et al.* (16), involucrada en el proceso de conversión de taquizoítos a bradizoítos; es más fuerte en la cepa 5TN. También, se observan bandas de pesos entre 30 y 37 kd para las tres cepas y una banda en RH y 5TN de 18 kd, aproximadamente.

Todos los aislamientos de cepas de *T. gondii* realizados a partir de carnes de cerdo muestran ser de tipo II, al ser comparadas con la cepa Yaco aislada de gato. Esto podría demostrar la gran cronicidad que muestran los pacientes infectados con *T. gondii* en nuestro país. En todo caso, se hace necesario realizar estudios a fondo de genotipificación de las cepas, para poder dar mayor información sobre las diferentes patologías en pacientes infectados con *T. gondii*.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Al Frigorífico Guadalupe, por habernos permitido realizar el muestreo en sus instalaciones.

## REFERENCIAS

1. **DUBEYJP.** *Toxoplasmosis of animals and man.* Florida: Ed. CRC Press Inc; 1986. p.1-194.
2. **NGUYEN T, KESEL M, BIGAIGNON G, HOET P, PAZZAGLIA G, LAMMENS M, DELMEE M.** Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of

infected mice. Clin Diagn Lab Immunol. 1996;3:635-9.

3. **Boothroyd J, Grigg M.** Population biology of *Toxoplasma gondii* anú its relevanceto human infeetion: do different strains cause different disease? Curr Opin Microbiol. 2002;5:438-42.

4. **FUENTES I, RUBIO J, RAMÍREZ C, ALVAR J.** Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J Clin Microbiol. 2001;39:1566-70.

5. **AJZENBERG D, COGNE N, PARÍS L, BESSIERES M, THULLIEZ P, FILISETTI D, PELLOUX H, MARTY P, Dardé M.** Genotypeof 86 *Toxoplasma gondii*isolated associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 2002;186:684-9.

6. **HANDMAN E, GODING JW, REMINGTON J.** Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1980;124:2578-83.

7. **SIBLEY LD, BOOTHROYD J. C.** Virulent strains of *Toxoplasma gondii* compuse a single clonal lineage. Nature (London). 1992;359:82-5.

8. **SHARMA SD, MULLENAX J, ARAUJO FG, ERLICH H, Remington JS.** Western-blot analysis of the antigens of *Toxoplasma*. J Immunol. 1983;131:576-84.

9. **WONG SY, REMINGTON J. S.** Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS. 1993;7:299-316.

10. **Me. leod R, Mack D, Brewn C.** *Toxoplasma gondii* New advances in celular and mollecular biology. Exp Parasitol. 1991;72:109-21.

11. **Makioka A, Kobayashi A.** Toxoplasmicidal activity of macrophages activated by recombinant major surface antigen p (30) of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 1993;;2851-2.

12.**SIBLEY LD, PFEFFERKORN I, BOOTHROYD JC.** Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. ParasitologyToday. 1993;9:392-5.

13.**Sabin AB, Feldman H. A.** Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science. 1948; 108:660-4.

14. **FUENTES I, RODRÍGUEZ M, LADRÓN DE GUEVARA C, PÉREZ C, DEL CASTILLO F, GUTIÉRREZ M, RUBIO J.** Comunicaciones. Caracterización genómica de cepas de *Toxoplasma gondii* asociadas a casos de toxoplasmosis en España. Enf Emerg. 2004; 6:189-200.

15. **HOWE D, HONORE S, DEROUIN F, SIBLEY L.** Determinaron of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 1997;35:1411-4.

16. **NGUYEN TD, DE KESEL M, BIGAIGNON, G, HOET P, PAZZAGLIA G, LAMMENS M, DELMEE M.** Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, uriñe, and brains of infected mice. Clin Diagn Lab Immunol. 1996;3:635-9.

17. **NEIDE M. SILVA. GAZZINELLI D. SILVA E, FERRO V.** Expression of *Toxoplasma gondii*-*spec*lflc heat shock protein 70 during *in vivo* conversión of bradyzoites to tachyzoites. Am Soc Microbiol. 1998;66:3959-63.

18. **Brown C, Mcleod R.** Mechanisms or survival of mice during acute and chronic *Toxoplasma gondii* infeetion. ParasitologyToday. 1994;10:290-2.

19.**SIBLEY D, MORDUE D, HOWE DK.** Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. Immunobiology. 1999;201:210-224.

**Calle 118 No. 15-24 Oficina 503, Bogotá, D. C., Colombia**  
**Teléfono 215 3714 y 215 3517**

 e-Mail  
[acin@etb.net.co](mailto:acin@etb.net.co)