

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

**FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
GRADO ACADÉMICO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**“REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA NARRATIVA: EVALUACIÓN DE
LAS CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO ANALÍTICO DE LOS
KITS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DE
TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EN LOS ÚLTIMOS 10 AÑOS”**

Por:

**SOL CAROLINA MOLINA RIVAS
MARÍA ISABEL VACA VALLADARES**

Directora:

Dra. ENMA VERÓNICA PÁEZ ESPINOSA

QUITO, 2022

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Sol Carolina Molina Rivas, C.C 2200479091; autora del trabajo de graduación intitulado: "Revisión bibliográfica narrativa: Evaluación del rendimiento analítico de los kits de PCR en tiempo real para diagnóstico de Toxoplasmosis congénita en los últimos 10 años", previo a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica Clínica:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Sol Carolina Molina Rivas
C.C. 2200479091

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Isabel Vaca Valladares, C.C 1726742545; autora del trabajo de graduación intitulado: "Revisión bibliográfica narrativa: Evaluación del rendimiento analítico de los kits de PCR en tiempo real para diagnóstico de Toxoplasmosis congénita en los últimos 10 años", previo a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica Clínica:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



María Isabel Vaca Valladares
C.C. 1726742545

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación de las señoritas Sol Carolina Molina Rivas y María Isabel Vaca Valladares intitulado **“Revisión bibliográfica narrativa: Evaluación del rendimiento analítico de los kits de PCR en tiempo real para diagnóstico de Toxoplasmosis congénita en los últimos 10 años”** ha concluido de conformidad con las normas establecidas por la Unidad Académica, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in purple ink that reads "Verónica Páez E." with a horizontal line underneath the name.

Dra. Enma Verónica Páez Espinosa
Directora

Quito, 17 de junio del 2022

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Wilson Molina, Anita Rivas, mis hermanos, mis sobrinas y a Ricardo, por su apoyo a lo largo de mi vida y de mi carrera universitaria.

Sol Carolina Molina Rivas

DEDICATORIA

El presente trabajo dedico principalmente a Dios, quien me ha guiado toda mi vida y me ha dado la fuerza necesaria para continuar y cumplir con mis objetivos.

A mis padres, Anita y Bolívar, que han sido incondicionales en mi vida, me han dado amor y apoyo durante toda mi carrera profesional.

A mi hija Sofía por ser mi motor, inspiración y mi vida entera, indudablemente quien me ha motivado a culminar mi carrera.

A mi esposo Luis, que con su apoyo, amor, confianza y paciencia me ha ayudado a cumplir con cada meta que me he propuesto.

A mi hermana, amiga y consejera por ser mi respaldo y mi apoyo en los momentos más difíciles.

A mi tía Marita, que desde el cielo ella me bendice cada día, fue y será una de las personas que siempre confío en mí.

María Isabel Vaca Valladares

AGRADECIMIENTO

A Dios por las bendiciones que me ha dado tanto a mí como a mi familia.

Agradezco de manera especial a nuestra tutora porque después de cada tutoría me sentía motivada por siempre brindarnos su tiempo y sus buenas recomendaciones para que nuestro trabajo mejore y sea de calidad.

A mis padres que siempre fueron grandes modelos a seguir y me inculcaron grandes principios y valores.

A mis hermanos por haberme dado muchos momentos de alegría y por qué siempre me han brindado de su apoyo.

Sol Carolina Molina Rivas

AGRADECIMIENTO

A Dios que me ha dado la sabiduría y fuerza para seguir día a día a pesar de las dificultades.

A mis padres, mi hija, mi esposo y mi hermana por estar siempre en este camino tan importante de mi vida.

A mi amiga Sol por cumplir este reto juntas, pese a todas las dificultades hoy podemos decir que lo logramos.

A mi directora de tesis Doctora Verónica Páez, quien con su experiencia, conocimiento, paciencia y motivación nos orientó en la realización de este trabajo. Gracias Doc. por siempre motivarme.

A las casas comerciales, quienes nos ayudaron con el envío de los insertos.

Y sin duda alguna a mi querida Pontificia Universidad Católica del Ecuador, que me abrió sus puertas y me permitió seguir la carrera que tanto quiero “Bioquímica Clínica”, y a todos los docentes que con paciencia me han sabido enseñar y guiar en todo el transcurso universitario.

María Isabel Vaca Valladares

RESUMEN

Revisión bibliográfica narrativa: Evaluación de las características del rendimiento analítico de los kits de PCR en tiempo real para diagnóstico de Toxoplasmosis congénita en los últimos 10 años.

Introducción: En mujeres embarazadas la infección por *Toxoplasma gondii* puede dar lugar a la toxoplasmosis congénita. En la actualidad, el diagnóstico molecular de esta parasitosis se ha convertido en el estándar de oro que está reemplazando a las técnicas serológicas, cuya eficacia presenta una serie de limitaciones. El estudio del nivel de sensibilidad y especificidad analíticas de los kits utilizados en el diagnóstico molecular de esta parasitosis es fundamental para la implementación de nuevos protocolos de detección prenatal de toxoplasmosis congénita en el país.

Metodología: Se realizó una revisión bibliográfica narrativa de tipo descriptivo y retrospectivo sobre las características del rendimiento analítico de los kits comerciales de RT-PCR para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita en los últimos 10 años a nivel mundial. Para la recopilación de los artículos científicos se realizó la búsqueda en bases de datos y repositorios. Los artículos fueron seleccionados a través de los criterios de STROBE. Con la información seleccionada se realizaron tablas comparativas de las características de rendimiento analítico de tres kits.

Resultados: Del análisis de los seis artículos seleccionados se obtuvieron tres kits comerciales ampliamente utilizados en el diagnóstico de Toxoplasmosis Congénita por RT-PCR, basados en la amplificación de los genes REP-529 y RE. Los kits *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, Bio-Evolution y LightMix® se caracterizaron por presentar niveles elevados de sensibilidad y especificidad analíticas, con escasa variabilidad entre ellos. Cada kit posee métodos de procesamiento específicos. El kit cualitativo ELITe MGB® contiene N-uracil glicosidasa termolábil que evita la contaminación por arrastre de ADN, y ofrece una Máster Mix lista para su uso; el kit Bio-Evolution permite el uso de una amplia variedad de kits de extracción de ADN y además emite resultados tanto cualitativos como cuantitativos; mientras el kit LightMix® es un ensayo de tipo cualitativo, cuyos reactivos deben ser reconstituidos, incrementando el tiempo de preparación de la muestra y los errores de pipeteo.

Conclusión: En base al análisis comparativo de los artículos seleccionados, se concluyó que el kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® es el más sensible, específico y accesible, por lo que se considera el kit más adecuado para su aplicación en Ecuador.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis congénita, RT-PCR, diagnóstico molecular *T. gondii*.

ABSTRACT

Narrative literature review: Evaluation of the analytical performance characteristics of real-time PCR kits for the diagnosis of congenital Toxoplasmosis in the last 10 years.

Introduction: In pregnant women, *Toxoplasma gondii* infection can lead to congenital toxoplasmosis. Currently, the molecular diagnosis of this parasitosis has become the gold standard that is replacing serological techniques, whose effectiveness has several limitations. The study of the level of analytical sensitivity and specificity of the kits for the molecular diagnosis of this parasitosis is essential for the implementation of new protocols for prenatal detection of congenital toxoplasmosis in the country.

Methodology: A descriptive and retrospective narrative bibliographic review was carried out based on the characteristics of the analytical performance of commercial RT-PCR kits for the diagnosis of congenital toxoplasmosis in the last 10 years worldwide. For the collection of scientific articles, a search was carried out in databases and repositories. The articles were selected through the STROBE criteria. With the selected information, comparative tables of the analytical performance characteristics of the selected kits were made.

Results: From the analysis of the six selected articles, three commercial kits widely used in the diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by RT-PCR, based on the amplification of the REP-529 and RE genes, were obtained. The *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, Bio-Evolution and LightMix® were characterized by high levels of analytical sensitivity and specificity, with little variability between them. Each kit has specific processing methods. The ELITe MGB® qualitative kit contains thermolabile N-uracil glycosidase that prevents contamination by DNA carryover and offers a ready-to-use Master Mix; the Bio-Evolution kit allows the use of a wide variety of DNA extraction kits and provides both qualitative and quantitative results. Finally, the LightMix® kit is a qualitative assay, whose reagents must be reconstituted, increasing sample preparation time and pipetting errors.

Conclusion: Based on the comparative analysis of the selected articles, it was concluded that the *Toxoplasma g.* ELITe MGB® is the most sensitive, specific, and accessible, which is why it is considered the most suitable kit for its application in Ecuador.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, congenital toxoplasmosis, RT-PCR, T. gondii molecular diagnosis.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
AGRADECIMIENTO.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE ANEXOS.....	xviii
LISTA DE SIGLAS O ABREVIATURAS.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación.....	6
1.2. Planteamiento del problema.....	8
1.3. Pregunta de investigación.....	9
1.4. Objetivos.....	10
1.4.1. Objetivo general.....	10
1.4.2. Objetivos específicos.....	10
1.5. Delimitación del estudio.....	10
2. MARCO METODOLÓGICO.....	11
2.1. Tipo de estudio.....	11
2.2. Identificación del campo de estudio.....	11
2.3. Proceso de revisión bibliográfica.....	11
2.3.1. Selección de las fuentes de información.....	12
2.3.2. Búsqueda bibliográfica.....	14
2.3.3. Estrategias de búsqueda.....	15
2.3.4. Registro de estrategias de búsqueda y selección.....	15
3. SELECCIÓN DE ARTÍCULO.....	17
3.1. Criterios de búsqueda.....	17
3.2. Pasos de depuración de selección de la información.....	18
3.3. Descripción general de los artículos seleccionados para el estudio.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Estudios de las características analíticas de ensayos clínicos de detección de TC.....	20
4.2. Características de sensibilidad y especificidad del rendimiento analítico de los ensayos comerciales para el diagnóstico de TC por RT-PCR.....	24

4.2.1. Características de extracción de muestras utilizadas por los estudios.	24
4.2.2. Características de los kits comerciales utilizados en los estudios seleccionados.....	28
4.2.3. Termocicladores y efecto sobre los resultados de la amplificación de los genes diana de <i>T. gondii</i>	31
4.3. Semejanzas y diferencias del rendimiento analítico de los kits de RT-PCR. ...	34
4.4. Ventajas y limitaciones del uso de los kits de RT-PCR.	40
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes de búsqueda bibliográfica de las bases de datos de la hemeroteca virtual de la PUCE	13
Tabla 2. Fuente de búsqueda bibliográfica de los repositorios de las universidades ..	13
Tabla 3. Términos MeSH y DeCS para la búsqueda	15
Tabla 4. Características de los artículos seleccionados.....	21
Tabla 5. Características de extracción de muestras	25
Tabla 6. Características de los kits comerciales	29
Tabla 7. Equipos de RT-PCR utilizados.....	31
Tabla 8. Semejanzas y diferencias del rendimiento analítico de los kits de RT-PCR ..	37
Tabla 9. Características de los kits utilizados	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Interpretación de inmunoglobulinas	3
Gráfico 2. Algoritmo de diagnóstico serológico	4

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de proceso de revisión bibliográfica 12
- Figura 2.** Diagrama de flujo de cuatro fases propuesto por prisma..... 17

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de estrategia de búsqueda	49
Anexo 2. Matriz de recolección de información primaria	51
Anexo 3. Lista de verificación de información de STROBE	52
Anexo 4. Matriz de información de artículos excluidos	55
Anexo 5. Matriz de almacenamiento de artículos seleccionados.....	62
Anexo 6. Matriz de recolección de información final.....	64

LISTA DE SIGLAS O ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- EIA: Técnicas de enzimoimmunoensayo
- *GPC: Guías de Prácticas Clínicas*
- *GRA: Antígeno de gránulos densos*
- *Ig: Inmunoglobulina*
- MSP: Ministerio de Salud Pública
- P30: Proteína de superficie
- RPM: revoluciones por minuto
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- RE: Región de repetición
- REP: Elemento de repetición pares de bases
- SAG: Antígeno de superficie
- SNC: sistema nervioso central
- TC: Toxoplasmosis congénita
- *T. gondii: Toxoplasma gondii*
- UNG: N-uracil glicosidasa

1. INTRODUCCIÓN

El *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un protozoo tisular e intracelular obligatorio de distribución cosmopolita, miembro del grupo de parásitos coccidios formadores de quistes tisulares, conocido por ser el agente causal de la toxoplasmosis en una gran variedad de animales de sangre caliente incluido el ser humano (Cofre et al., 2016). El *T. gondii*, como todos los miembros del Phylum Apicomplexa, se caracteriza por presentar un ciclo de vida complejo que da lugar a varias formas de diferenciación celular llamadas: ooquiste, taquizoíto, bradizoíto, esporozoíto y quiste tisular, las cuales son de mucha importancia en la transmisión de la enfermedad (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2020).

Los huéspedes definitivos pertenecen a la familia Felidae en la que se encuentra el gato doméstico, el cual elimina en las heces los ooquistes no esporulados, los cuales esporulan entre 1 a 5 días posteriores para ser infecciosos. La infección en el humano ocurre por la ingesta de alimentos con ooquistes que se transforman en taquizoítos, y pueden ser localizados en el tejido nervioso y en los músculos para convertirse en bradizoítos de quiste tisular. Los gatos contraen la infección cuando consumen los huéspedes intermediarios, tales como pájaros y roedores que ingieren arena, agua o algún tipo de vegetal contaminado con los ooquistes, pero también se puede infectar al consumir de manera directa los ooquistes esporulados o transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y por vía transplacentaria (CDC, 2020).

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica provocada por la infección por *T. gondii*. En mujeres embarazadas la infección ocurre por transmisión vertical donde *T. gondii* atraviesa la barrera transplacentaria e infecta al feto, ocasionando la toxoplasmosis congénita (TC), caracterizada por comprometer al sistema nervioso central (SNC), producir enfermedad generalizada con secuelas no modificables por el tratamiento (Pomares y Montoya, 2016). Se estima que la TC tiene una incidencia de 1,5 casos por cada mil nacidos vivos (Méndez et al., 2021).

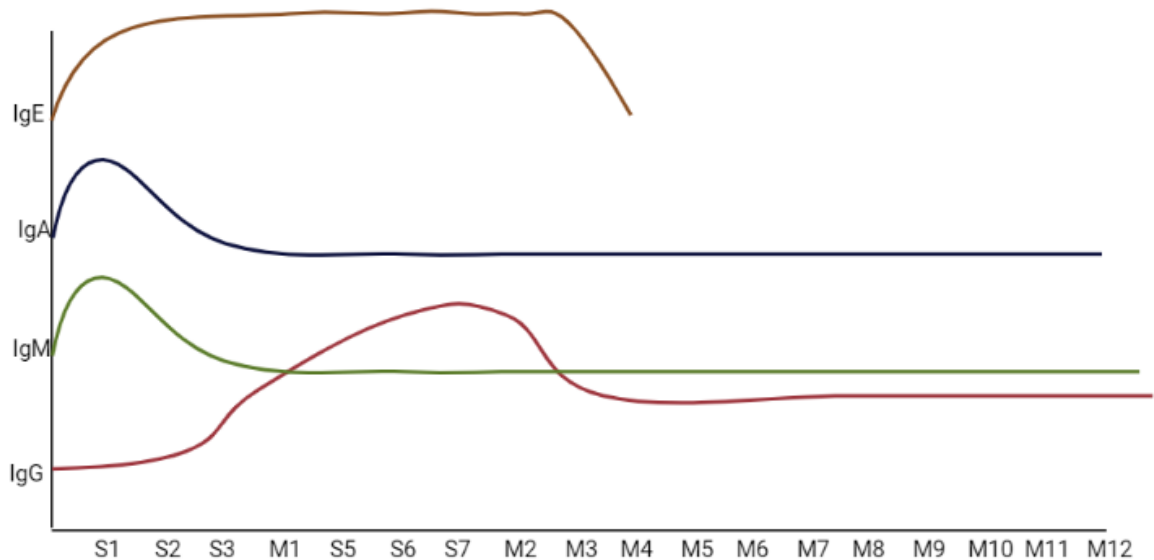
La TC es consecuencia de una infección primaria intragestacional aguda. La patogenicidad de la TC depende del periodo de embarazo de la infección materna, de la gravedad de la infección intrauterina, del tratamiento materno y de la virulencia del parásito actuante (Carral et al., 2018). Si la infección ocurre durante el primer trimestre la toxoplasmosis es más grave que si esta se produce en el tercer trimestre. La gran mayoría de nacidos vivos no presentan ningún síntoma al nacer, sino que desarrollan síntomas

tales como pérdida de la vista (el más común), hidrocefalia, retinocoroiditis, pérdida auditiva o discapacidad intelectual a lo largo de los años. En raras ocasiones se produce incluso la muerte (Méndez et al., 2021).

El diagnóstico de TC se realiza mediante información clínica asociada a pruebas serológicas o moleculares. El método más utilizado para el diagnóstico es la detección serológica; mediante este método se llega a detectar anticuerpos de *T. gondii* de tipo IgG, IgM e IgA. El diagnóstico se obtiene mediante la combinación de los resultados de anticuerpos de *T. gondii* (Pomares y Montoya, 2016). Para la interpretación de resultados es importante considerar los valores de los anticuerpos antes mencionados. IgG es positiva en la primera-segunda semana post-infección, se eleva en la semana sexta-octava y se detecta durante toda la vida. La presencia de IgM en cualquier paciente indica exposición a *T. gondii*. Con respecto a la IgM, esta se encuentra positiva en la primera semana post-infección, alcanza su pico más alto al mes y empieza a descender a los dos o tres meses. La expresión de IgA es muy parecida a la IgM y puede detectarse hasta después de un año (Gráfico 1). Las IgA e IgM son las más usadas para información que para el área de diagnóstico (Baquero-Artigao et al., 2012).

Gráfico 1.

Interpretación de Inmunoglobulinas



- IgG: 1 a 2 semanas aparece, semana 6 a 8 incrementa y a lo largo de la vida persiste.
- IgM: se eleva en la semana 1 y descienden en las semanas 2 o 3, persiste por varios años.
- IgA: se eleva en la semana 1 y descienden en las semanas 2 o 3 y persiste hasta el año.
- IgE: se eleva en los primeros meses y desciende a los 4 meses.

Fuente: Investigación.

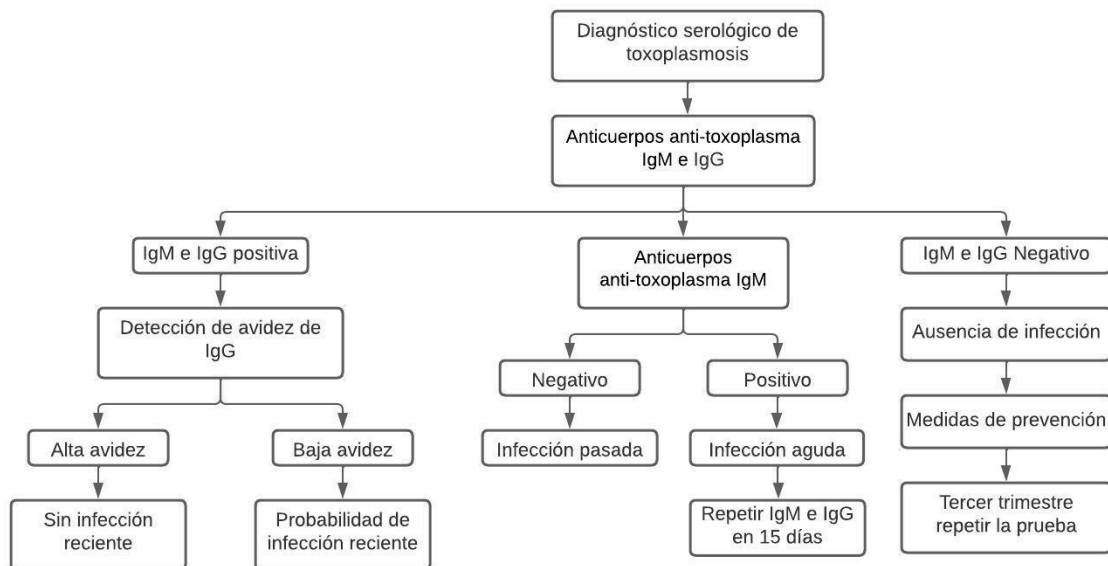
Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Adaptado de: *Guía de la sociedad Española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita*, Baquero-Artigao et al., 2012.

El Ministerio de salud pública (MSP) del Ecuador, en la guía de práctica clínica indica la realización de pruebas inmunológicas para la identificación de toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus, herpes simple y VIH (TORCH) a todas las mujeres embarazadas con la finalidad de identificar de manera precoz la presencia de estos procesos infecciosos. El diagnóstico serológico de toxoplasmosis se realiza en el primer control y en el tercer trimestre de embarazo como se detalla en el Gráfico 2 (MSP, 2019).

Gráfico 2.

Algoritmo de diagnóstico serológico



Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Adaptado de: *Guía de práctica clínica*, por MSP, 2019.

Las pruebas serológicas han sido de gran ayuda para el diagnóstico de toxoplasmosis, pero la interpretación de estas pruebas resultó ser compleja, en cuanto al diagnóstico de TC, ya que para emitir resultados se debe tener en cuenta si la infección es reciente o pasada para determinar el tipo de inmunoglobulina que se debe analizar. Para solventar este problema se han introducido las pruebas moleculares, las cuales tienen la ventaja de detectar directamente al parásito a través de la identificación de su ADN mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Baquero-Artigao et al., 2012). Esta técnica permite amplificar las secuencias de ADN, esto ha fomentado la investigación en varios campos de la biología molecular, cuyo genoma en su mayor parte ha sido identificado, permitiendo discriminar las secuencias repetitivas conservadas específicas de *T. gondii*, teniendo en cuenta los segmentos diana para identificar el fragmento que se desea detectar, cuyo hallazgo en la muestra del paciente es indicativa de infección; por lo que es importante tener el conocimiento genómico del parásito (Kralik y Ricchi, 2017).

El genoma de *T. gondii* tiene un tamaño estimado de 65 MB y un número aproximado de 14 cromosomas (Lorenzi et al., 2016). Su secuencia genómica se caracteriza por la presencia de una serie de dominios no identificados por ser repetitivos y/o no clonables, lo cual no permite que se dé un ensamblaje ininterrumpido. Al producirse un ensamblaje interrumpido, las regiones repetitivas son capaces de tener genes codificantes de proteínas, los cuales aún se desconocen. Se han desarrollado nuevas tecnologías que han dado paso a un mejor entendimiento del genoma al enfocarse en una sola molécula de secuenciación (Xia et al., 2021).

El empleo de pruebas moleculares basadas en métodos de amplificación de ADN permite identificar el *T. gondii*. La prueba de PCR en tiempo real (RT-PCR) ofrece un diagnóstico rápido y efectivo de la TC en mujeres embarazadas por su alta sensibilidad (Robert-Gangneux et al., 2017). La RT-PCR emite un diagnóstico de toxoplasmosis basado en la amplificación de las secuencias genéticas de *T. gondii* SAG1, SAG2, SAG3, SAG4, B1, REP-529, P30, GRA4, GRA6 y GRA7; siendo los genes REP-529 y el gen B1 aquellos con una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica (Rahimi Esboei et al., 2022). Pomares y colaboradores reportaron, en el año 2020, que el gen REP-529 es más sensible que los otros genes debido a que es un gen repetitivo (Pomares et al., 2020).

Los kits comerciales de RT-PCR, presentan diferentes características de desempeño analítico para la detección de *T. gondii*, las mismas que dependen del fabricante y sirven para validar cada una de las técnicas (Sterkers et al., 2010), dando lugar a un nuevo campo de estudio con buenas perspectivas de normalización y utilización de rutina de estos kits para el tamizaje y diagnóstico precoz de TC, por la elevada sensibilidad analítica, especificidad analítica y facilidad de ejecución de la prueba.

Estas características de rendimiento analítico son indispensables para emitir una valoración precisa y fiable; con parámetros importantes como la sensibilidad y la especificidad analíticas, que sirven para evaluar el desempeño de la prueba diagnóstica.

Por lo tanto, la eficiencia diagnóstica está asociada al rendimiento analítico y a otros aspectos como el tiempo de respuesta de la prueba y la facilidad de ejecución, lo cual ha propuesto un diagnóstico a tiempo y un tratamiento seguro, favoreciendo la identificación precoz del parásito minimizando o incluso evitando daños graves e irreversibles al feto en desarrollo.

1.1. Justificación

Entre el 25 al 30 % de la población de países en vías de desarrollo y desarrollados puede padecer la infección por *T. gondii* (Chegeni et al., 2019). La infección es prevenible con los programas de control durante el embarazo y sus secuelas se pueden evitar o aminorar con el tratamiento adecuado. A pesar de la importancia de esta parasitosis en la gestante, en el Ecuador no hay datos estadísticos oficiales actualizados que establezcan un perfil epidemiológico de la enfermedad, solo se cuenta con datos inconsistentes de pocas investigaciones con población muy limitada (Sánchez et al., 2020).

T. gondii es un protozoo que mediante la transmisión vertical puede causar daños al feto, perjudicando el desarrollo intrauterino y aumentando la probabilidad de aborto espontáneo, malformaciones fetales o nacimientos prematuros (Macedo-da-Silva et al., 2020). En México se ha realizado una encuesta Nacional Seroepidemiológica en la que se concluye que existe un 65% de gestantes que pueden adquirir la infección por *T. gondii* y transmitir al feto, por lo que se constituye en un verdadero problema de salud pública (Pérez, 2015).

Tradicionalmente, para el diagnóstico de TC se usan técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA), que se basan en la cuantificación de anticuerpos anti-toxoplasma. En el Ecuador, el MSP recomienda realizar el panel de TORCH a mujeres embarazadas, mediante pruebas serológicas (Ministerio de Salud pública del Ecuador [MSP], 2015). El diagnóstico serológico de *T. gondii* en mujeres embarazadas se basa en la aplicación del algoritmo diagnóstico presentado en el gráfico 2, que se basa en la investigación de las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE específicas en sangre. Las IgM, IgA e IgE no atraviesan la placenta, su detección indica producción fetal y se las utiliza como marcadores serológicos de infección congénita (Carral et al., 2018)

El diagnóstico serológico da lugar a obtener resultados equívocos por el tiempo transcurrido de la infección y los procedimientos que se debe llevar a cabo para realizar estas pruebas lo cual limita la reproducibilidad de los resultados obtenidos (Carral et al., 2018). Estas deficiencias producen una pérdida de tiempo en el establecimiento del diagnóstico definitivo dando lugar a retrasos significativos en la toma de decisiones y medidas adecuadas para evitar o disminuir las consecuencias graves y permanentes que el toxoplasma puede producir en el feto en desarrollo (Bin y Almushait, 2012) (Matas, s. f.).

El aislamiento de *T. gondii* es una importante herramienta para el diagnóstico de la TC; más del 10% de los pacientes con marcadores serológicos negativos son diagnosticados mediante este método (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Por esta razón, para tener un diagnóstico temprano que sea sensible y específico, varios estudios se han centrado en el uso de técnicas moleculares de identificación de secuencias específicas del genoma del parásito tales como RT-PCR. Existen en la actualidad algunos kits ya disponibles en el mercado que son aplicados en el diagnóstico de TC de manera rutinaria en diferentes países del mundo (Ammar et al., 2020) (Morelle et al., 2012). Es así como en esta última década se ha observado un incremento en el número de ensayos moleculares para la identificación tanto cualitativa como cuantitativa del *T. gondii*, muchos de los cuales son comercializados y utilizados en el Laboratorio Clínico.

La técnica RT-PCR ayuda a detectar directamente al *T. gondii* tanto en la madre como en el feto. Algunos estudios se han centrado en el gen B1 y el REP-529 como secuencias fundamentales para el diagnóstico de toxoplasmosis (Robert-Gangneux et al., 2017). Estudios donde se han comparado estas dos amplificaciones usando baja cantidad de ADN de *T. gondii* han demostrado que el REP-529 incrementa la sensibilidad del ensayo (Edvinsson et al., 2006). Ciertos estudios han demostrado que el uso del REP-529 es más sensible para muestras biológicas como líquido amniótico, placenta y líquido cefalorraquídeo (Cassaing et al., 2006).

Un diagnóstico por medio de pruebas serológicas conlleva mucho tiempo por lo cual se obtienen resultados tardíos, ya que es importante realizar una correlación entre la clínica del paciente y los resultados de las pruebas de inmunoensayo, mientras que las nuevas técnicas de diagnóstico de RT-PCR, ayudan a obtener datos más sensibles y específicos. Actualmente existen varios ensayos comerciales, basados en la técnica de RT-PCR, siendo una gran opción para el diagnóstico, sin embargo, al no encontrarse estandarizados, presentan una serie de variaciones de rendimiento analítico, debido a factores tales como el tipo de muestra, el método de extracción de ADN de *T. gondii* o la secuencia de amplificación utilizada (Robert-Gangneux et al., 2017).

Debido a estos antecedentes, se ha realizado esta revisión bibliográfica, la cual incluye la literatura científica publicada en los últimos 10 años, enfocada al rendimiento analítico de algunos de los ensayos comerciales utilizados en el diagnóstico clínico de TC en la actualidad.

Este estudio se usará como base para investigaciones futuras en el área técnica y de calidad. Al proporcionar información actualizada elaborada con rigor científico sobre las características de desempeño analítico de los ensayos de detección de *T. gondii* a través de la técnica de RT-PCR, se está proporcionando una fuente de información independiente que pueda ser utilizada en la selección y utilización del kit de diagnóstico molecular más adecuado a las necesidades de cada laboratorio, que a su vez podrá ofrecer a la gestante un diagnóstico más rápido y eficiente, ayudando al médico a intervenir de manera precoz y apropiada en la infección por *T. gondii* en pacientes embarazadas.

1.2. Planteamiento del problema

La toxoplasmosis congénita tiene características que la hacen merecedora de una mayor atención debido a que es causante del incremento de la morbilidad y mortalidad, lo cual se ha convertido en una inminente amenaza para la salud pública (El Bissati et al., 2018). La TC puede llegar a causar daños neurológicos y/u oculares y la mayoría de las investigaciones que emergen de los países latinos han reflejado que la seropositividad es muy elevada (Amendoeira y Millar, 2021).

El Ecuador tiene Guías de Prácticas Clínicas (GPC) para el control prenatal, donde recomienda que las mujeres embarazadas se deben realizar el panel de TORCH, en el cual están incluidas las pruebas para diagnóstico de *T. gondii*. El protocolo oficial para el diagnóstico de infección materna y neonatal se basa en pruebas serológicas para la detección de anticuerpos de *T. gondii*, y se realiza mediante la demostración de seroconversión o ante la presencia de IgM positiva con anticuerpos IgG de baja avidéz (MSP, 2015). Sin embargo, el empleo de pruebas serológicas presenta desventajas como la necesidad de realizar pasos extras como la titulación en resultados positivos, retrasando la entrega de los resultados. Para superar estos inconvenientes, se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico, las cuales están basadas en la detección directa del ADN del parásito (Baquero-Artigao et al., 2012).

Además de lo indicado anteriormente, se ha evidenciado que un gran número de neonatos infectados son asintomáticos, con un 80% que presentan durante su desarrollo problemas neurológicos o visuales. Por todas las razones expuestas, es fundamental la aplicación de método de diagnóstico precoz que presenten elevada sensibilidad y especificidad, donde los riesgos falsos negativos tanto para la madre como para el feto se vean reducidos a niveles mínimos (Baquero-Artigao et al., 2012).

El análisis molecular de esta parasitosis en la gestante a través de la técnica RT-PCR, es una alternativa válida que puede tanto reemplazar al diagnóstico serológico de TC o colaborar con éste en caso de dudas, ya que el análisis molecular es capaz de alcanzar dependiendo de la técnica aplicada, resultados más rápidos con niveles de especificidad y valores predictivos positivos cercanos al 99-100% (Thalib et al., 2005), llegando incluso a indicar la carga parasitaria de la madre al momento del diagnóstico, lo cual es un elemento fundamental para la predicción de las secuelas de la parasitosis en el feto, así como en el tipo de intervención médica necesaria en casos de positividad (Baquero-Artigao et al., 2012).

En la última década se han generado una gran variedad de ensayos comerciales, basados en la técnica de RT-PCR que tienen una alta especificidad y sensibilidad, lo cual permite que el diagnóstico de TC sea más rápido y efectivo (Robert-Gangneux et al., 2017). Sin embargo, cada kit comercial presenta una serie de diferencias no solo con relación al blanco molecular (secuencia de ADN que identifica), sino al origen de la muestra, tipo de extracción, características de amplificación, tipo de termociclador y/o software de interpretación de resultados, las cuales carecen de una estandarización internacional. La importancia de la aplicación de estos ensayos en el diagnóstico de TC, hace necesario el estudio de las características de rendimiento analítico de algunos de los kits disponibles comercialmente para evaluar la autenticidad de los datos de los fabricantes y de esta manera seleccionar las pruebas con mejor eficiencia diagnóstica para su aplicación en los laboratorios del Ecuador.

1.3. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las diferencias del rendimiento analítico en relación con la especificidad y sensibilidad que presentan los ensayos moleculares basados en la técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Describir y comparar las características de rendimiento analítico de los ensayos moleculares comerciales en relación con la sensibilidad y especificidad analítica de los kits de PCR en tiempo real estandarizados para el diagnóstico clínico de toxoplasmosis congénita.

1.4.2. Objetivos específicos

- Detallar las características de rendimiento analítico de cada uno de los kits de RT-PCR para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita seleccionados.
- Establecer las semejanzas del rendimiento analítico entre los diferentes kits de RT-PCR seleccionados.
- Establecer las diferencias del rendimiento analítico entre los diferentes kits de RT-PCR seleccionados.
- Identificar las ventajas y limitaciones que presenta el uso de estos kits comerciales de RT-PCR en el laboratorio de diagnóstico clínico.

1.5. Delimitación del estudio

Este trabajo, al ser una revisión bibliográfica narrativa, se limita a recoger los datos publicados en los artículos académicos publicados en los últimos 10 años, con respecto a las características de rendimiento analítico de los kits comerciales para el diagnóstico molecular de toxoplasmosis congénita.

No utiliza una estrategia de búsqueda exigente ni usa métodos estadísticos. Este estudio se va a limitar al estudio comparativo de los kits comerciales utilizados para el diagnóstico clínico y no analiza datos de ensayos designados para investigación o estudios taxonómicos del toxoplasma.

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de estudio

Esta revisión es de tipo narrativo, descriptivo y retrospectivo sobre los parámetros del rendimiento analítico de ensayos moleculares comercializados por diferentes industrias, todos ellos basados en la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de la TC. Es de tipo descriptivo porque se analizaron artículos publicados a nivel mundial y es de tipo retrospectivo porque se utilizaron publicaciones científicas disponibles en los últimos 10 años.

2.2. Identificación del campo de estudio

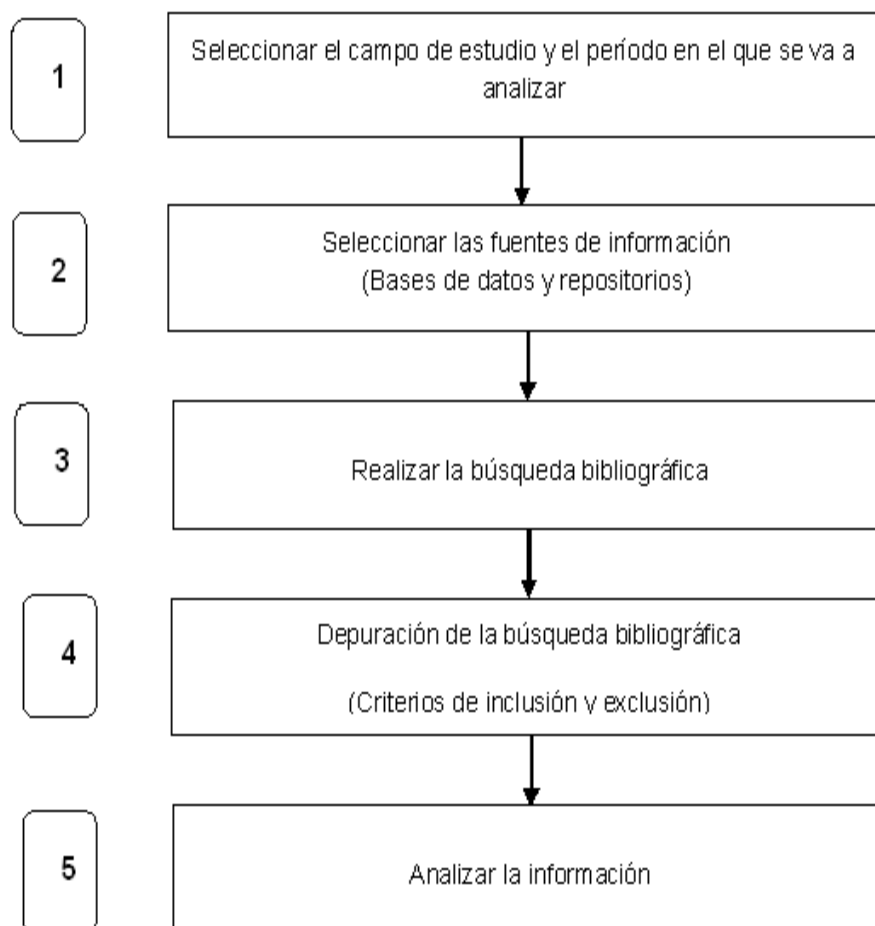
La investigación consistió en una revisión bibliográfica narrativa dentro del campo de la biología molecular y la parasitología.

2.3. Proceso de revisión bibliográfica

Para el proceso de la revisión bibliográfica, se utilizó el diagrama de Medina representado en la Figura 1 y el diagrama de flujo propuesto por Moher, Liberati, Tetzlaff, Altman y the PRISMA group en el año 2009 detallado en la Figura 2 (Medina, Marín y Alfalla, 2010).

Figura 1.

Diagrama de proceso de revisión bibliográfica



Nota. Adaptado de “Una propuesta metodológica para la realización de búsquedas sistemáticas de bibliografía” C. Medina, J. Marín y R. Alfalla, 2010, WPOM, 1(2), 13-30. <https://doi.org/10.4995/wpom.v1i2.786>

2.3.1. Selección de las fuentes de información

La recopilación, interpretación y síntesis de la investigación se realizó mediante las fuentes de información primaria, secundaria y terciaria, para describir los diferentes kits de RT-PCR para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita mediante el análisis de las características de desempeño analítico de estos. Las fuentes primarias fueron libros y artículos científicos seleccionados de las bases de datos adscritas a la PUCE (Tabla 1). En las fuentes secundarias se realizó la búsqueda en repositorios de universidades como

se detalla en la Tabla 2. Las fuentes terciarias son directorios de organizaciones internacionales, donde se adquirieron los insertos.

Todas estas fuentes de información facilitaron la recopilación, interpretación y síntesis de la investigación la cual se enfocó en describir las características de rendimiento analítico de cada kit de RT-PCR mediante el análisis de la evidencia científica.

Tabla 1.

Fuentes de búsqueda bibliográfica de las bases de datos de la hemeroteca virtual de la PUCE.

Fuentes	Dirección de URL
Pubmed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
Scopus	https://www.scopus.com/home.uri?zone=header&origin=
Science Direct	https://www.sciencedirect.com/
Web of Science	https://wosapp.puce.elogim.com/WOS_GeneralSearch_inp ut.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=5D1txl4YKdbIATI9ztD&preferencesSaved=
Dialnet	https://dialnet.unirioja.es/
BVS	https://bvs-ecuador.bvsalud.org/
Clinical Key	https://clinicalkey.puce.elogim.com/#!/https://www.sciencedirect.com/

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Tabla 2.

Fuente de búsqueda bibliográfica de los repositorios de las universidades.

Fuentes	Dirección de URL
Repositorio PUCE	http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12168
Red de repositorio de acceso abierto del Ecuador	https://rraae.cedia.edu.ec/
Repositorios en acceso libre para medicina	https://biblio.fcm.unc.edu.ar/repositorios-para-localizar-publicaciones-de-medicina-en-acceso-libre/http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12168

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

2.3.2. Búsqueda bibliográfica

Se realizó la búsqueda bibliográfica de artículos científicos observacionales descriptivos y analíticos. Estos artículos fueron completos y estuvieron relacionados con *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis congénita y diagnóstico molecular. De igual manera los artículos solo estuvieron afines con mujeres embarazadas con toxoplasmosis, y con estos artículos, se realizó el análisis del kit más efectivo para el diagnóstico temprano de toxoplasmosis congénita. Se obtuvo los insertos de diferentes casas comerciales y con esto se realizó la comparación con los artículos seleccionados.

Criterios de inclusión

- Población: mujeres embarazadas.
- Edad: mujeres en edad fértil.
- Pruebas: pruebas moleculares (RT-PCR)
- Criterios geográficos: a nivel mundial.
- Fecha de los artículos: últimos 10 años.
- Idioma: español e inglés.
- Tipo de texto: artículo completo.
- Acceso: gratuito.
- Revistas científicas cuyo índice de calidad SJR (SCImago Journal & Country Rank) este entre Q1, Q2 y Q3.

Criterios de exclusión

- Artículos científicos que no mencionen el diagnóstico molecular de TC en mujeres embarazadas a nivel mundial.
- Artículos científicos que se relacionen con el diagnóstico de toxoplasmosis congénita en animales
- Artículos científicos que utilizan los ensayos moleculares para el estudio taxonómico del *T. gondii* en mujeres embarazadas.
- Artículos que estén publicados antes del 2010.

2.3.3. Estrategias de búsqueda

Se realizó la búsqueda utilizando combinaciones de términos MeSH como de términos DeCS que se encuentran en la Tabla 3, para facilitar la búsqueda se utilizó los diferentes sinónimos de las palabras. Los términos mencionados fueron combinados con los operadores booleanos, tales como AND; OR Y NOT para facilitar la búsqueda y a su vez se usaron los diferentes filtros que cada base de datos los proporcionada tomando en cuenta los criterios de inclusión que se establecieron que se encuentran en el apartado 2.3.2.

Tabla 3.

Términos MeSH y DeCS para la búsqueda.

Términos MeSH	Términos DeCS
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. gondii</i>	<i>T. gondii</i>
Congenital toxoplasmosis	Toxoplasmosis congénita
Real time PCR	PCR en tiempo real
RT-PCR	RT-PCR
Quantitative PCR	PCR cuantitativa
<i>T. gondii</i> molecular diagnosis	Diagnóstico molecular <i>T. gondii</i>

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

2.3.4. Registro de estrategias de búsqueda y selección

La estrategia de búsqueda (Anexo 1) utilizada para adquirir la información de los artículos científicos que se seleccionaron fue:

- Establecimiento de los criterios de inclusión.
- Se usó cada estrategia de búsqueda para cada base de datos, utilizando términos MeSH, DeCS y operadores booleanos.
- Se investigó distintas bases de datos.
- Se registró la información en el gestor bibliográfico Zotero, con carpeta compartida.
- Depuración de la información duplicada.

- Uso de las matrices de recolección.
- Lectura del título y resumen de los artículos seleccionados.
- Eliminación de los artículos que no cumplen.
- Lectura completa de lo artículos seleccionados.

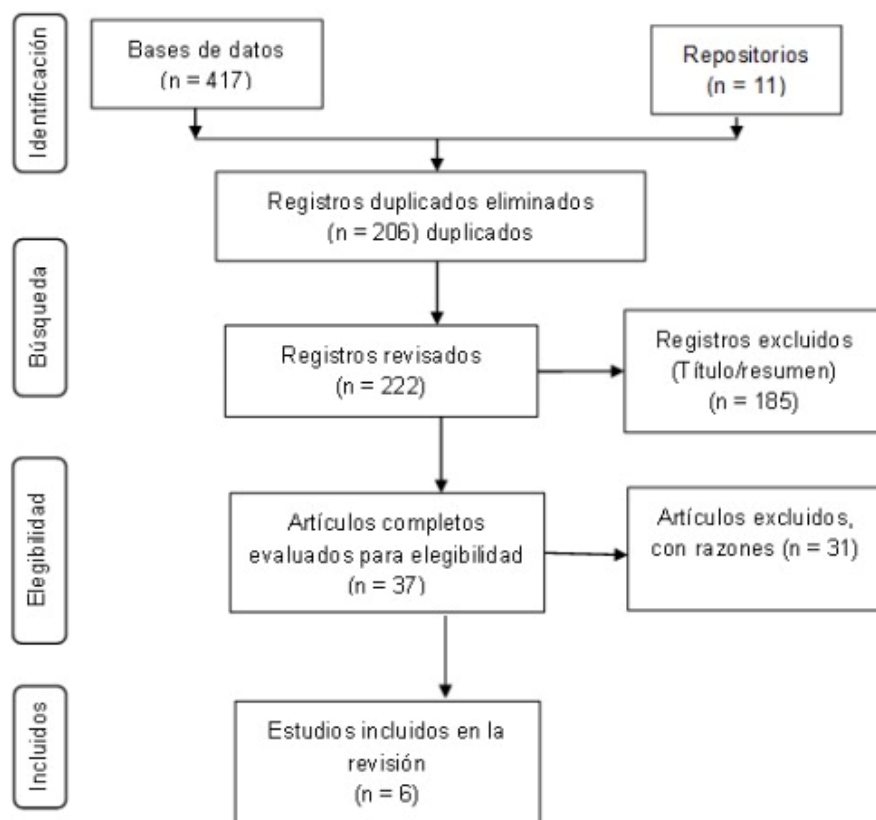
3. SELECCIÓN DE ARTÍCULO

3.1. Criterios de búsqueda

La identificación y búsqueda de los artículos científicos se realizó en las bases de datos previamente seleccionados, con diferentes criterios de inclusión y exclusión descritos en el Anexo 1. Para la selección de los artículos científicos se realizó el diagrama de flujo de cuatro fases, proceso descrito en la Figura 2.

Figura 2.

Diagrama de flujo de cuatro fases propuesto por PRISMA



Nota. Adaptado de “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement” (p. 3), de D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff y D. Altman, 2009, PLoS Med 6(7): e1000097. Doi: 10.1371/journal.pmed.1000097. © 2009 Moher et al.

Para la recolección de los artículos científicos se crearon matrices que ayudaron en cada paso del diagrama de flujo. Para la recolección de la información se identificó a través

de la búsqueda con términos MeSH y DeCS un total de 417 artículos en las bases de datos y 11 artículos en repositorios, en la fase de búsqueda se llevó un registro de duplicados de los cuales se eliminó 206 artículos, de los 222 artículos revisados se excluyó por título y resumen 185 y se quedó con 37 artículos completos evaluados para elegibilidad, de éstos se excluyó tomando en cuenta los criterios de exclusión e inclusión 31, por lo tanto 6 artículos fueron incluidos en la revisión.

3.2. Pasos de depuración de selección de la información

El primer paso para la depuración de la información se realizó mediante la eliminación de los artículos duplicados descritos en la matriz de recolección de información primaria (Anexo 2). El segundo paso fue leer el título y el resumen de cada uno de los artículos científicos para eliminar los que no se relacionan con el tema de investigación añadiendo la razón de la exclusión de cada uno de ellos (Anexo 3). Como tercer paso se leyó completamente los artículos no excluidos (Anexo 4) para finalmente obtener los artículos seleccionados (Anexo 5).

Todas las referencias bibliográficas fueron ingresadas al gestor bibliográfico Zotero, identificando cada carpeta de búsqueda y selección con el nombre adecuado de acuerdo con el proceso descrito anteriormente.

3.3. Descripción general de los artículos seleccionados para el estudio

Para la revisión bibliográfica se identificaron seis artículos referentes al diagnóstico molecular mediante RT-PCR, con los diferentes kits evaluados por su alto rendimiento, para la detección de TC en mujeres embarazadas en los últimos 10 años. Pubmed, Scopus, Science Direct, MEDES, Dialnet, EBSCO, BVS y Google Scholar fueron las bases de datos y repositorios donde se encontró los artículos científicos que pertenecían a las revistas PLoS One, BMC Infect Dis, Clin Microbiol Infect, J Clin Microbiol, An Pediatr (Barc), Ann Saudi Med, Saudi Pharmaceutical Journal, Braz J Infect Dis, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine y la Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, con un elevado índice de impacto (Q1 y Q2).

La mayoría de los artículos que fueron incluidos para la revisión son de Francia, Brasil, Arabia Saudita y España; estos estudios fueron realizados en mujeres embarazadas y en niños con TC.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La TC es un problema de salud a nivel mundial, por lo que merece atención inmediata. Con el objetivo de optimizar el diagnóstico de esta infección parasitaria, se han analizado estudios donde se han puesto a prueba varias técnicas moleculares. Estos estudios comparativos han evidenciado la superioridad de las pruebas moleculares sobre las serológicas realizadas en mujeres embarazadas y en recién nacidos, tanto como método diagnóstico único como de apoyo al diagnóstico serológico en casos de difícil interpretación. Francia es uno de los países pioneros en cuanto al protocolo de diagnóstico y recomendaciones que se deben seguir en caso de toxoplasmosis o TC; siendo los creadores del Centro Nacional de Referencia para la Toxoplasmosis (Robert-Gangneux et al., 2017).

Las investigaciones realizadas por los grupos de Baquero-Artigao (2012), Filisetti (2015) y Tomasoni (2019), basadas en la aplicación de nuevas técnicas moleculares, son capaces de brindar una elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica, permitiendo la detección temprana y eficaz de la TC (Filisetti et al., 2015) (Baquero-Artigao et al., 2012) (Tomasoni et al., 2019), dando lugar a nuevos protocolos de detección de TC más rápidos y eficaces (Brenier-Pinchart et al., 2021).

El método más utilizado en la actualidad en países europeos y que se ha convertido en la prueba de oro es la RT-PCR (Pomares et al., 2020), cuyo objetivo es la identificación de elementos blanco característicos del genoma del parásito, siendo su presencia indicativa de infección activa por *T. gondii*. Entre los blancos moleculares más comunes utilizados en el diagnóstico de toxoplasmosis se encuentran el elemento de repetición de 529 pares de bases (REP-529 GenBank accession no. AF146527), el gen repetitivo de 35 veces B1 y la región de repetición RE del genoma de *T. gondii* (Belaz et al., 2015).

4.1. Estudios de las características analíticas de ensayos clínicos de detección de TC

De los estudios realizados sobre las características analíticas de los ensayos clínicos comerciales para la detección de TC en el laboratorio clínico, fueron seleccionados aquellos cuyos estudios se basaron en la identificación de la sensibilidad y especificidad analíticas de tres kits estandarizados utilizados para el diagnóstico de *T. gondii* en los

países donde estos trabajos fueron publicados. La sensibilidad y la especificidad analíticas son características de desempeño que permiten una mejor determinación del rendimiento diagnóstico de la técnica utilizada (Tabla 4), y fueron las características analizadas en los artículos seleccionados.

Tabla 4.

Características de los artículos seleccionados.

N°	Año	Autores	Nombre del kit	Nombre de la industria farmacéutica a productora del kit	Tipos de análisis molecular del kit	Características del rendimiento analítico	
						Sensibilidad	Especificidad
1	2015	Filisetti et al.	Bio-Evolution BE-A997-AB (<i>Toxoplasma gondii</i>)	Bio-Evolution	RT-PCR dirigido al gen REP-529 Resultados cualitativos	100%	86%
2	2017	Robert-Gangneux et al.	RTST01PLD Toxoplasma g. ELITe MGB® Kit (Elitech®)	ELITechGroup, Puteaux-France	RT-PCR dirigido al gen REP-529 Resultados cualitativos	100%	100%
3	2019	Tomasoni et al.	RTST01PLD Toxoplasma g. ELITe MGB® Kit (Elitech®)	ELITechGroup, Puteaux-France	RT-PCR dirigido al gen REP-529 Resultados cualitativos	100%	99,7%
4	2019	Döşkaya et al.	LightMix ® Kit Toxoplasma gondii (EC) – TIB MolBiol <i>Toxoplasma gondii</i>	TIB Molbiol, LLC, NJ-USA	RT-PCR dirigido al gen RE (pb: 134) Resultados cualitativos	87,5%	100%
5	2021	Nourrison et al.	Bio-Evolution BE-A997-AB (<i>Toxoplasma gondii</i>)	Bio-Evolution	RT-PCR dirigido al gen REP-529 Resultados cualitativos y cuantitativos	100%	100%
6	2021	Brenier-Pinchart et al.	LightMix ® Kit Toxoplasma gondii (EC) – TIB MolBiol <i>Toxoplasma gondii</i>	TIB Molbiol, LLC, NJ-USA	RT-PCR dirigido al gen RE (pb: 134) Resultados cualitativos	98,1%	98,5%

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Filisetti y colaboradores, en el año 2015 realizaron un estudio con ocho laboratorios para realizar una comparación entre sus respectivos ensayos de PCR con el kit Bio-Evolution para *T. gondii* (Bio-Evolution, Bry-sur-Marne-France). El kit Bio-Evolution consta de una RT-PCR lista para usar, basada en una tecnología de hidrólisis que utiliza una sonda de *T. gondii* dirigida a la secuencia codificante REP-529 (Ammar et al., 2020). La amplificación de RT-PCR del kit Bio-Evolution para *T. gondii* realizaron tomando en cuenta todas las recomendaciones del fabricante en cada uno de los laboratorios participantes en el estudio. Los investigadores encontraron que el kit Bio-Evolution para *T. gondii* tiene una sensibilidad analítica del 86% y una especificidad analítica del 100% (Filisetti et al., 2015).

Robert-Gangneux y colaboradores en el año 2017, realizaron un estudio para evaluar las características analíticas del kit comercial *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, fabricado por ELITechGroup, Puteaux-France. Se realizó la comparación entre el kit comercial *Toxoplasma g.* ELITe MGB® y tres ensayos usados de manera rutinaria en tres laboratorios del centro de referencia para toxoplasmosis, con el objetivo de determinar tanto la repetibilidad como la reproducibilidad del ensayo, obteniendo buenos resultados con muestras sin interferencias como células o hemoglobina. Este kit también identifica el elemento de ADN repetido REP-529. De esta manera, utilizando muestras de líquido amniótico, el grupo de investigadores obtuvo un análisis del rendimiento del ensayo *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, en la cual la sensibilidad y especificidad analíticas fueron del 100%, con un límite de detección de 10 parásitos/mL (Robert-Gangneux et al., 2017).

Con respecto a lo mencionado, es importante resaltar que el blanco clásico hacia el cual se dirigían los estudios moleculares de TC era el gen de ADN repetido 35 veces, conocido como B1. Sin embargo, en el 2012, Morelle y colaboradores, en los estudios realizados para caracterizar el *T. gondii* en muestras de líquido amniótico, encontraron una mejor sensibilidad cuando el RT-PCR identificaba la secuencia codificante REP-529 (Morelle et al., 2012). El elemento REP-529 debe su elevada sensibilidad diagnóstica a su repetitividad por ser una secuencia que se repite de 200 a 300 veces a lo largo del genoma de *T. gondii* (Pomares et al., 2020).

Tomasoni y colaboradores en el año 2019, realizaron el estudio donde al igual que el grupo de Robert-Gangneux utilizaron el kit comercial *Toxoplasma g.* ELITe MGB® (ELITechGroup Puteaux-France). Dos centros de salud de Italia participaron en el estudio, cuyo objetivo fue identificar el riesgo de TC al momento de detectar valores del índice de avidéz medios o bajos para *T. gondii* en mujeres embarazadas, las muestras positivas

utilizaron para la detección de *T. gondii* por técnicas moleculares. En este estudio, las mujeres embarazadas que formaron parte de la muestra fueron sometidas a serología para *T. gondii*, seguido de la prueba molecular dirigida al REP-529 (*Toxoplasma g.* ELITe MGB®). El análisis de rendimiento analítico del ensayo *Toxoplasma g.* ELITe MGB® que obtuvieron fue de una sensibilidad analítica del 100% y especificidad analítica del 99,7% (Tomasoni et al., 2019), similar a aquellos valores observados por Robert-Gangneux y colaboradores en el año 2017.

El estudio de la sensibilidad y especificidad analíticas de las técnicas moleculares de diagnóstico de *T. gondii* realizado por Döşkaya y colaboradores en el año 2019, utilizó como objeto de análisis el kit LightMix® *Toxoplasma gondii* (TIB Molbiol, LLC, NJ-USA), el cual está dirigido al fragmento de 134 pares de bases del gen repetitivo RE. El estudio se centró en el análisis de varias muestras clínicas de sangre total, líquido amniótico, tejido, líquido cefalorraquídeo y líquido intraocular, dirigidas al gen antes mencionado. Compararon el kit comercial con un ensayo interno y obtuvieron valores de sensibilidad analítica de 87,5% y especificidad analítica del 100% (Döşkaya et al., 2019). Al no seguir las recomendaciones en el proceso de amplificación del kit LightMix® *Toxoplasma gondii* dirigido al gen RE, el resultado de la sensibilidad analítica obtenido por el grupo de Döşkaya, es inferior al de todos los otros estudios, que utilizaron como blanco el REP-529.

Nourrisson y colaboradores realizaron en el 2021 un estudio comparativo entre el kit comercial Bio-Evolution para *T. gondii* y *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, los cuales están dirigidos al gen REP-529, con la finalidad de obtener datos en cuanto al rendimiento analítico de estos dos ensayos. Los resultados del kit Bio-Evolution para *T. gondii* fueron cualitativos y cuantitativos, mientras que el kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® ofrece resultados de tipo exclusivamente cualitativos. El análisis de rendimiento analítico de estos dos ensayos dio como resultado una sensibilidad y especificidad analíticas del 100%. Los investigadores encontraron que los dos kits comerciales son rápidos, fáciles de usar y son especialmente útiles en muestras que contienen cargas parasitarias bajas (Nourrisson et al., 2021).

Brenier-Pinchart y colaboradores en el año 2021, realizaron un estudio comparativo con el kit LightMix® *Toxoplasma gondii*, fabricado por TIB MolBiol, como se ha visto en el estudio de Döşkaya, este kit está dirigido al gen repetitivo RE. Para este estudio participaron cuatro centros hospitalarios de Francia para evaluar el rendimiento del kit mencionado. Realizaron una comparación con el kit LightMix® *Toxoplasma gondii* y con el ensayo de rutina de los laboratorios involucrados en el estudio, determinaron la

sensibilidad de los ensayos por medio de diluciones y análisis de muestras clínicas. Los resultados cualitativos y el análisis de rendimiento analítico de este ensayo fueron de sensibilidad y especificidad menor al 98% (Brenier-Pinchart et al., 2021). A diferencia del trabajo de Döskaya, este grupo de investigación siguió un protocolo más estricto, superó el valor de sensibilidad analítica de 87.7%, llegando a valores cercanos al 100%, semejantes a los kits cuyo blanco fue el REP-529.

4.2. Características de sensibilidad y especificidad del rendimiento analítico de los ensayos comerciales para el diagnóstico de TC por RT-PCR.

Para llegar a tener una buena sensibilidad y especificidad analíticas en ensayos moleculares es fundamental que la plantilla de ADN a partir de la cual se va a realizar la amplificación para la identificación del blanco molecular específico tenga no solo, la secuencia adecuada sino la pureza necesaria para evitar falsos resultados. Por esta razón, el origen de la muestra como el método utilizado para la extracción del ADN son de gran relevancia en el análisis del rendimiento analítico de un kit comercial (Weida et al., 2017), en base a estas consideraciones se recolectó la siguiente información con relación al tratamiento de las muestras para la obtención de la plantilla a ser amplificada.

4.2.1. Características de extracción de muestras utilizadas por los estudios.

La extracción de ADN es el proceso donde se realiza la purificación de este y para obtener un ADN de calidad se debe utilizar un método de extracción eficiente. El ADN es de calidad cuando no tiene contaminación. La extracción de ADN se puede realizar de manera manual o usando kits comerciales (Gupta, 2019). Se revisaron los distintos tipos de kits de extracción de ADN que usaron en los estudios seleccionados (Tabla 5).

Tabla 5.*Características de extracción de muestras.*

N°	Año	Autores	Técnica de extracción	Tipo de muestra	Características de la muestra
1	2015	Filisetti et al.	Mini kit de ADN QIAamp, micro kit de AND QIAamp, PCR High Pure, Tween-Nonidet-NaOH	Líquido amniótico	Almacenadas a -20 o -80 °C. Siguiendo el instructivo del fabricante.
2	2017	Robert-Gangneux et al.	Minikit QIAamp ADN	Líquido amniótico, placenta, sangre total, biopsia, líquido cefalorraquídeo y humor acuoso	Almacenadas a -20 o -80 °C. Siguiendo el instructivo del fabricante.
3	2019	Tomasoni et al.	NUCLISENS® EASYMAG®	Líquido amniótico	Siguiendo el instructivo del fabricante.
4	2019	Döşkaya et al.	Qiagen Mini kit	Sangre total, líquido amniótico, tejido, líquido cefalorraquídeo, líquido intraocular	Pasos preanalíticos (dependerán de la muestra) Siguiendo el instructivo del fabricante.
5	2021	Nourrisson et al.	Cartucho para extracción de ELITe InGenius SP 200, cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 1000	Sangre total, sangre de cordón líquido amniótico, placenta	Almacenadas a -20C° Pasos preanalíticos (Reconstitución, centrifugación, eliminación del sobrenadante). Siguiendo el instructivo del fabricante.
6	2021	Brenier-Pinchart et al.	Tween-Nonidet-NaOH, Mini kit de ADN QIAamp, Roche® MagNA pure Compact	Líquido amniótico, placenta, sangre total, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido de lavado broncoalveolar, biopsia de tejido, muestra de ganglios	Almacenadas a -20. Siguiendo el instructivo del fabricante.

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Filisetti y colaboradores en el año 2015, usaron muestras obtenidas por amniocentesis. El líquido amniótico extraído fue sujeto a un estricto procesamiento utilizando kits de extracción de ADN estandarizados y ampliamente utilizados en los laboratorios de diagnóstico molecular a nivel mundial. Los investigadores usaron los kits de extracción: mini kit de ADN QIAamp, micro kit de AND QIAamp, PCR High Pure y Tween-Nonidet-NaOH, todos los laboratorios participantes en el estudio de Filisetti y colaboradores en el año 2015 siguieron escrupulosamente las instrucciones de los fabricantes para el uso de los kits de extracción. El seguir las instrucciones del fabricante de los kits de extracción da la garantía de que el ADN extraído sea de buena calidad, es decir que éste se encuentre íntegro y libre de agentes contaminantes (Gupta, 2019). El ADN que obtuvieron lo almacenaron a -20 y -80 °C hasta el momento de su utilización (Filisetti et al., 2015).

Robert-Gangneux y colaboradores en el estudio realizado en el 2017, usaron el kit de *Toxoplasma g.* ELITE MGB®. Los tres laboratorios utilizaron 128 muestras de líquido amniótico, placenta, sangre total, biopsia, líquido cefalorraquídeo y humor acuoso, estas muestras estuvieron almacenadas por algunos años ya que las recolectaron entre los años 2005 y 2015 a una temperatura de -20 o -80 °C (Robert-Gangneux et al., 2017). Los autores utilizaron estas muestras para extraer el ADN, con buenos resultados. Existen una serie de estudios entre los cuales sobresalen el de Delhaes y colaboradores en el año 2014, quienes tras analizar una serie de muestras con un almacenamiento prolongado a una temperatura de -20 o -80 °C, encontraron que la carga parasitaria presente en la muestra no sufría modificaciones significativas, permitiendo de esta manera el uso de este tipo de muestras para el análisis, incluso después de años de la extracción original (Delhaes et al., 2014).

En el estudio del grupo de Robert-Gangneux en el año 2020, el ADN de las muestras congeladas seleccionadas para el estudio fue obtenido mediante el uso del kit de extracción minikit QIAamp ADN, tomando en cuenta las recomendaciones del fabricante (Robert-Gangneux et al., 2017). Para las muestras de placenta y biopsia añaden la proteinasa K, para la eliminación de proteínas de la muestra de ADN (Frazer et al., 2020), tampones especiales para la lisis celular, etanol para lavado y precipitación del ADN, todo esto intercalado de una serie de centrifugaciones que permiten obtener un producto puro, en concentración adecuada y libre de contaminantes y residuos de etanol que inhiben la reacción de amplificación (Robert-Gangneux et al., 2017).

Tomasoni y colaboradores realizaron un estudio en el año 2019, donde usaron 525 muestras de líquido amniótico que fueron recolectadas por los dos centros hospitalarios por medio de amniocentesis. La dificultad de la obtención de este tipo de muestra es el evitar la contaminación con sangre materna (Tomasoni et al., 2019). Además las muestras que son obtenidas por el procedimiento de amniocentesis tienen una alta probabilidad de que contenga células maternas que pueden alterar los resultados (Lamb et al., 2012). Para evitar estos sesgos, los dos centros hospitalarios usaron el kit de extracción NUCLISENS® EASYMAG® siguiendo los pasos que presentaba el instructivo. El uso de este kit de extracción de ADN demostró tener un ADN limpio en la electroforesis en gel de agarosa (Tomasoni et al., 2019). Un estudio realizado por Faecher y colaboradores en el 2012 describieron que el kit de extracción NUCLISENS® EASYMAG® aumenta su rendimiento si se realiza un pretratamiento de líquido amniótico con proteinasa K (Faucher et al., 2012), procedimiento aplicado por el grupo de investigación de Tomasoni.

Döşkaya y colaboradores en el año 2019, realizaron un estudio donde usaron 38 muestras las cuales correspondían a sangre total, líquido amniótico, tejido, líquido cefalorraquídeo y líquido intraocular. Cada muestra pasó por un proceso para estar listas para la extracción del ADN por medio del kit comercial Qiagen Mini kit. Las muestras de sangre fueron tomadas en tubos con EDTA para evitar la inhibición de la reacción de amplificación. Las muestras de sangre y de líquido amniótico fueron centrifugadas por 15 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) para obtener la capa leucocitaria de las muestras de sangre y en el líquido amniótico eliminar el sobrenadante. El tejido fue triturado para añadir un tampón de lisis tisular (ATL) y durante 15 minutos incubaron a 56°C a 1400 rpm en el agitador de calor hasta que el tejido se derrita, posteriormente es incubada a una temperatura de 95°C por un periodo de 5 minutos. El líquido cefalorraquídeo y líquido intraocular no recibieron ninguna preparación, y fueron usados de manera directa en el kit de extracción de ADN (Döşkaya et al., 2019).

Nourrisson y colaboradores en el estudio realizado en el año 2021, usaron 31 muestras en total, las cuales consistieron en placenta, líquido amniótico, sangre total y sangre de cordón; almacenadas a -20°C. Todas las muestras pasaron por un proceso preanalítico diferente. La placenta fue molida para añadir 0,6 gramos de tripsina a temperatura de 37°C, por un periodo de dos horas con agitación constante y posteriormente filtraron, obtuvieron el sedimento y lavaron con solución salina dos veces y finalmente añadieron la proteinasa K. El líquido amniótico al igual que la sangre total y la sangre del cordón fueron centrifugados para, posteriormente añadir la proteinasa K. Los kits que usaron para la

extracción fueron el Cartucho para extracción de ELITE InGenius SP 200 y el cartucho de extracción ELITE InGenius SP 1000, Nourrisson y colaboradores siguieron los pasos del fabricante (Nourrisson et al., 2021).

Brenier-Pinchart y colaboradores en el año 2021, realizaron un estudio en el que usaron 133 muestras clínicas de líquido amniótico, placenta, sangre total, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido de lavado broncoalveolar, biopsia de tejido, muestra de ganglios. Estas muestras almacenaron a una temperatura de -20 °C. Los procedimientos para la extracción de ADN se acoplaron al tipo de muestra que usó cada laboratorio. Las muestras pasaron por un proceso de preparación para llegar al punto de realizar la extracción y dependió del tipo de muestras que utilizaron. Para sangre total y sangre de cordón usaron un método de precipitación de proteínas, por otro lado, para placenta y tejidos, trituraron y añadieron tripsina, luego filtraron y lavaron y posteriormente añadieron proteinasa K, aunque se debe tener en cuenta que una vez obtenida la capa leucocitaria de sangre total y de sangre de cordón, también añadieron la proteinasa K. Para realizar la extracción de ADN usaron los kits Tween-Nonidet-NaOH, Mini kit de ADN QIAamp y Roche® MagNA pure Compact, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Brenier-Pinchart et al., 2021).

4.2.2. Características de los kits comerciales utilizados en los estudios seleccionados.

Cada uno de los autores presentó las características de los kits utilizados para realizar sus estudios. La importancia de estos kits radica en que son ensayos estandarizados, ampliamente utilizados en laboratorios de diagnóstico molecular. Además los investigadores, se preocuparon por realizar su control de calidad interno para asegurarse de limitar al máximo los errores al momento de analizar el rendimiento analítico de los kits estudiados. Los mismos que se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6.*Características de los kits comerciales.*

N°	Año	Autores	Nombre del kit	Reactivos	Procedimiento
1	2015	Filisetti et al.	Bio-Evolution BE-A997-AB (<i>Toxoplasma gondii</i>)		Siguieron el instructivo del fabricante.
2	2017	Robert-Gangneux et al.	RTST01PLD Toxoplasma g. ELITe MGB® Kit (Elitech®)	Mezcla	Siguieron el instructivo del fabricante
3	2019	Tomasoni et al.	RTST01PLD Toxoplasma g. ELITe MGB® Kit (Elitech®)		Siguieron el instructivo del fabricante.
4	2019	Döşkaya et al.	LightMix ® Kit Toxoplasma gondii (EC) – TIB MolBiol <i>Toxoplasma gondii</i>	Mezcla LightCycler Fast Start DNA Master HybProbe con MgCl ₂ Cebadores sondas de hibridación Control positivo Control negative	Pequeñas modificaciones.
5	2021	Nourrisson et al.	Bio-Evolution BE-A997-AB (<i>Toxoplasma gondii</i>)	Mezcla	Siguieron el instructivo del fabricante.
6	2021	Brenier-Pinchart et al.	LightMix ® Kit Toxoplasma gondii (EC) – TIB MolBiol <i>Toxoplasma gondii</i>	Control negativo Control interno Control de extracción objetivo Fila estándar de seis ADN diana	Siguieron el instructivo del fabricante.

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Filisetti y colaboradores en el 2015 y Nourrisson y colaboradores en el año 2021 usaron el kit Bio-Evolution para *T. gondii* y para preparar la solución de amplificación siguieron las instrucciones del fabricante (Nourrisson et al., 2021) (Filisetti et al., 2015), mencionan que se debe añadir 19uL de la mezcla, 5uL del control interno y 1uL del ADN extraído. Los investigadores hacen mención en que el instructivo se encuentra bien detallado con facilidad de entendimiento por lo cual lo denominan como un kit de fácil manejo, pero a pesar de eso mencionan que el kit no contiene N-uracil glicosidasa termolábil (UNG) (Filisetti et al., 2015). La UNG termolábil se utiliza en RT-PCR para evitar la contaminación por arrastre de ADN, impidiendo su amplificación. Esta enzima se considera como un factor

de control extra para asegurar la obtención de resultados verdaderos (Aeschbach y Dion, 2017).

Robert-Gangneux y colaboradores 2017 y Tomasoni y colaboradores en el año 2019, usaron el kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® y para realizar la solución para la amplificación añadieron 20uL de la mezcla proporcionada por el kit, esta mezcla contiene UNG y 10uL del ADN extraído (Robert-Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019), pero hay que tener presente que si no se añade el control interno durante la extracción de ADN de la muestra se debe realizar un paso extra en el que se añade 2uL de éste a los 10uL de la muestra (líquido amniótico, placenta, sangre total, biopsia, líquido cefalorraquídeo y humor acuoso) para posteriormente tomar 10uL de esta preparación (Robert-Gangneux et al., 2017). La contaminación provocada por arrastre es una problemática en los diagnósticos moleculares y por esa razón se usa la UNG la cual ayuda a degradar ADN que son contaminantes, lo que permite tener una amplificación eficaz (Aeschbach y Dion, 2017). El contener esta enzima en la mezcla que usaron en los estudios para realizar la amplificación, ayudó al kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® a eliminar la contaminación por arrastre (Robert-Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019).

Brenier-Pinchart y colaboradores en el año 2021, usaron el kit LightMix ® Kit *Toxoplasma gondii*, para la amplificación siguiendo con las instrucciones del fabricante (Brenier-Pinchart et al., 2021), por otro lado Döşkaya y colaboradores en el año 2019, utilizaron el mismo kit, pero mencionan que realizaron ciertos cambios sin antes ser validado en el procedimiento de reacción de amplificación siguiendo con su propio protocolo en cuanto a tiempo, temperatura y número de ciclos; esto repercutió en la característica de rendimiento analítica (sensibilidad analítica baja) (Döşkaya et al., 2019).

Es importante señalar que el control interno es un elemento fundamental para el control de falsos negativos por los productos de la reacción de amplificación (inespecíficos o de arrastre), este sistema de control que viene incluido en el kit de detección molecular sirve para la detección de falsos negativos o positivos resultantes de la amplificación de productos inespecíficos, o producidos por problemas durante la extracción del ADN o su omisión en la mezcla de amplificación. El control interno consiste en una secuencia de ADN o ARN que no se encuentra en el patógeno y su secuencia complementaria (sonda) que permiten su detección. Si la muestra no posee el ADN del agente infeccioso, el control interno consume el exceso de reactivo, minimizando la amplificación de secuencias no deseadas y evitando la generación de falsos positivos (Aralar et al., 2020).

Este es un sistema de control extremadamente útil y ampliamente utilizado en el control de calidad de las técnicas basadas en RT-PCR. Por esta razón por la cual todos los kits estudiados presentaron su propio control interno, el cual se podía añadir ya sea durante la purificación del ADN o durante la preparación de la Master Mix y es también la razón por la cual no todos los kits tenían UNG, cuya adición es un elemento extra del control de calidad de la muestra para la obtención de un resultado basado en sensibilidad y especificidad analíticas elevadas (Aralar et al., 2020).

4.2.3. Termocicladores y efecto sobre los resultados de la amplificación de los genes diana de *T. gondii*.

A pesar de que la PCR es muy versátil, se debe tener en cuenta realizar una validación adecuada cuando sea necesario, ya que de esto dependerán los resultados. Por eso es importante tener en cuenta algunos factores, uno de los principales es el rendimiento de los equipos para que no llegue a afectar la reproducibilidad de los resultados (Ho Kim et al., 2018). En cada estudio, los laboratorios utilizaron diferentes equipos de RT-PCR para el procesamiento de las muestras. Los nombres de los equipos utilizados están detallados en la Tabla 7.

Tabla 7.

Equipos de RT-PCR utilizados.

N°	Año	Autor	Equipo
1	2015	Filisetti et al.	Light Cyclers 1.0, Light Cyclers 2.0, Light Cyclers 480, ABI Prism 7000, ABI 7500
2	2017	Robert-Gangneux et al.	StepOnePlus o ABI Prism 7000
3	2019	Tomasoni et al.	
4	2019	Döşkaya et al.	Light Cyclers 1.5
5	2021	Nourrisson et al.	ELITE InGenius
6	2021	Brenier-Pinchart et al.	Light Cyclers 480 (Roche)

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Filisetti y colaboradores en el año 2015, mencionan que para realizar la amplificación usaron cinco equipos de los cuales tres son recomendados por el fabricante. En todos los casos en los que se emplean equipos que no sean estandarizados por el fabricante del kit,

es fundamental que el equipo de laboratorio que se haya adquirido realice sus propios procesos de control y estandarización para asegurarse que no existen falsos positivos o negativos y que no se puedan producir errores de interpretación. A pesar de que dos equipos no son recomendados por el fabricante, el kit Bio-Evolution para *T. gondii* se pudo adaptar bien a las condiciones del laboratorio (Filisetti et al., 2015). El uso de equipos no recomendados para el kit puede alterar el ensayo dando lugar a resultados poco fiables (Smith, 2021a). Los investigadores no mencionan el proceso de validación de los equipos utilizados.

Robert-Gangneux y colaboradores en el año 2017 usaron para la amplificación los equipos StepOnePlus o ABI Prism 7000, pero estos equipos no son los recomendados por el kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, a pesar de eso las muestras que no tienen *T. gondii* dieron negativo y algunas muestras que si tenían *T. gondii* también dieron negativo, dando resultados falsos negativos. Por lo mencionado anteriormente, uno de los motivos de estos resultados puede ser la utilización de amplificadores de una marca diferente de la recomendada por el fabricante del kit. Sin embargo, después de realizar los respectivos controles estadísticos, y considerando que estos falsos negativos se dieron en muy pocas muestras que no tuvieron un procesamiento adecuado, concluyeron que el kit podía ser utilizado incluso con otros tipos de equipos, diferente de los recomendados por el fabricante, teniendo en cuenta que estos fueron validados, con resultados correctos y con elevados porcentajes de sensibilidad y especificidad analíticas (Robert-Gangneux et al., 2017). El proceso de validación no fue mencionado por los investigadores.

Tomasoni y colaboradores en el año 2019 no mencionan que equipo utilizaron para realizar la amplificación, pero siguieron las recomendaciones del kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, por lo cual se puede llegar a pensar que usaron un equipo recomendado por el fabricante. En este estudio obtuvieron valores de sensibilidad analítica del 100% y especificidad analítica del 99.7% (Tomasoni et al., 2019).

Döşkaya y colaboradores 2019, mencionaron que para realizar la amplificación usaron el equipo Light Cyler 1.5 (Döşkaya et al., 2019), este equipo es recomendado por el fabricante lo cual da confiabilidad en los resultados obtenidos, evitando al grupo de estudio la realización de pasos extras para estandarizar el termociclador.

Nourrisson y colaboradores en el año 2021, utilizaron el equipo ELITe InGenius para realizar la amplificación, pero este termociclador no está recomendado por el kit Bio-

Evolution para *T. gondii*. Al no ser un equipo mencionado por el fabricante ellos procedieron a realizar una validación del mismo, utilizaron muestras tomadas manualmente y otros equipos. Este equipo validado lo adaptaron de manera adecuada al kit de Bio-Evolution para *T. gondii* ya que la sensibilidad y la especificidad obtenida fue alta (Nourrison et al., 2021). Los investigadores no mencionan el procedimiento que siguieron para la respectiva validación de los equipos.

Brenier-Pinchart y colaboradores en el 2021, usaron el equipo Light Cyclor 480 el cual está recomendado por el fabricante del kit LightMix® *Toxoplasma gondii*, teniendo así resultados fiables (Brenier-Pinchart et al., 2021). Este equipo no necesitó ser validado en este estudio, ya que el fabricante garantiza buenos resultados.

En este punto es importante especificar que cada vez que se realiza la incorporación de un nuevo sistema o kit de diagnóstico en el Laboratorio Clínico, es necesario realizar la estandarización de dicho equipo o kit diagnóstico. En el caso del Laboratorio de Biología Molecular, la estandarización hace referencia tanto al lugar y método de obtención de la muestra como a las técnicas de obtención de ADN, que en la actualidad se basan en kits de extracción de ácidos nucleicos, por ser los que ofrecen mejor rendimiento y pureza, comprobados en cada laboratorio a través del nanodrop, mediante la determinación de las relaciones 260/280 (contaminación proteica) y 260/220 (contaminación por componentes orgánicos), y a la observación de la integridad de las bandas de ADN en el gel de agarosa (Smith, 2021b)

Con respecto a los termocicladores, como indicado anteriormente, a pesar de que todos los estudios realizaron la estandarización de los equipos de amplificación y análisis post-PCR, independientemente de si éstos fueron los recomendados por los kits; los investigadores de los estudios seleccionados no detallaron los procedimientos de validación, que son los mismos para los Laboratorios de Diagnóstico Molecular basado en técnicas de RT-PCR. Ho Kim y colaboradores en el año 2018, en su estudio evaluaron el rendimiento de equipos de amplificación y describieron los parámetros necesarios para una validación correcta. Aquí encontramos la determinación de la temperatura de hibridación a través del PCR de gradiente de temperatura; el número de ciclos necesarios para la detección del amplicón, a través del establecimiento del umbral de ciclos (Ct) y la curva estándar adecuada en aquellos kits donde el resultado es de tipo cualitativo absoluto, como es el caso del kit Bio-Evolution para *T. gondii*. El grupo de Ho Kim señala que para una buena validación se debe usar cebadores y sondas que sean específicas para los

genes que se desea identificar (Ho Kim et al., 2018), requisito que se cumple en todos los kits en los que se basa este trabajo.

Es fundamental recalcar que la sensibilidad y especificidad analíticas, obtenidas en los estudios en los diferentes laboratorios parten de los parámetros anteriormente especificados. Smith en el año 2021 realizó un protocolo de validación en el que utilizó dos equipos de amplificación para comparar sus variaciones, tomando en cuenta el número y tipo de muestras, el proceso de extracción de ADN y la monitorización permanente de los controles, para determinar la sensibilidad y especificidad analíticas (Smith, 2021a). A este respecto, estudios previos como el de Sterkers y colaboradores ya habían analizado la integridad de los resultados de los test de PCR en muestras de ADN almacenadas teniendo en cuenta la temperatura y tiempos de conservación y las características de los termocicladores; llegando a la conclusión de que estos parámetros son indispensables tanto para obtener y mantener un ADN en condiciones óptimas como para obtener amplicones útiles para el diagnóstico molecular en parasitología (Sterkers et al., 2010).

En resumen, la mayoría de los estudios seleccionados utilizaron los equipos recomendados por el fabricante, lo cual proporciona resultados bastante fiables, ya que el fabricante ha estandarizado sus kits con los termocicladores indicados. Otros estudios seleccionados, no siguieron las instrucciones del fabricante en cuanto al kit de extracción de DNA y equipos de amplificación, por lo que realizaron una validación extra de los kits y/o termocicladores utilizados, sin que se vean afectados los resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad analíticas de los kits escogidos.

4.3. Semejanzas y diferencias del rendimiento analítico de los kits de RT-PCR.

Los autores Robert-Gangneux y colaboradores en el año 2017 y Tomasoni y colaboradores en el año 2019, usaron el kit *Toxoplasma g.* ELITE MGB®, mientras que los autores Nourrisson y colaboradores en el año 2021 y Filisetti y colaboradores en el año 2015 utilizaron el kit Bio-Evolution para *T. gondii*, estos dos kits están dirigidos al gen REP-529 y estos autores encontraron que, utilizar esta secuencia codificante como blanco proporciona una alta sensibilidad a las reacciones de RT-PCR debido a que este gen se repite de 200 a 300 veces, aumentando sensiblemente la capacidad de detección de esta secuencia en la amplificación, convirtiéndose en un fragmento diana muy usado para los

kits comerciales (Robert-Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019) (Filisetti et al., 2015) (Nourrisson et al., 2021). Pomares y colaboradores en el año 2020, realizaron un estudio para comparar el gen B1 con la secuencia codificante REP-529 llegando a la conclusión que esta última aumenta la sensibilidad de manera considerable (Pomares et al., 2020). Esto se comprobó en el presente trabajo, puesto que los grupos de investigadores que han trabajado con el REP-529 han obtenido, independientemente del laboratorio, del número de muestras y del tiempo de almacenamiento de las muestras utilizadas en cada estudio.

Las muestras usadas en los tres kits fueron de líquido amniótico. Se mencionó que estas muestras fueron tomadas por amniocentesis y tenían que pasar por pasos previos a la extracción, utilizando el kit de extracción específico, como es centrifugar la muestra para posteriormente eliminar el sobrenadante (Robert-Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019) (Nourrisson et al., 2021) (Filisetti et al., 2015) (Brenier-Pinchart et al., 2021) (Döşkaya et al., 2019).

Filisetti y colaboradores en el año 2015 y Nourrisson y colaboradores en el año 2021, utilizaron el mismo kit Bio-Evolution para *T. gondii*, en la preparación de amplificación del ADN de *T. gondii*, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Filisetti et al., 2015) (Nourrisson et al., 2021), como se indica en la Tabla 8.

Robert-Gangneux y colaboradores en el año 2017 y Tomasoni y colaboradores en el año 2019, utilizaron el kit *Toxoplasma g.* ELITE MGB® según la recomendación del fabricante para preparar la solución de amplificación (Robert-Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019), como se indica en la Tabla 8. Este kit tiene la particularidad de que contiene un solo reactivo (Máster Mix) listo para su uso, lo cual disminuye el tiempo del proceso y limita al máximo los errores de pipeteo.

Döşkaya y colaboradores en el año 2019 utilizaron el equipo Light Cycler 1.5, mientras Brenier-Pinchart y colaboradores en el año 2021 utilizaron los equipos Light Cycler 480 y 2.5, para realizar la amplificación del kit LightMix® *Toxoplasma gondii* (Döşkaya et al., 2019) (Brenier-Pinchart et al., 2021).

Existen algunas semejanzas entre estudios seleccionados e insertos que ayudaron a tener resultados de sensibilidad y especificidad analíticas elevadas, ya que realizaron la preparación de amplificación como recomienda el fabricante (Filisetti et al., 2015) (Robert-

Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019) (Nourrison et al., 2021), como también en el uso de los equipos de amplificación recomendados para los kits (Döşkaya et al., 2019) (Brenier-Pinchart et al., 2021), especialmente cuando se empleó muestras de líquido amniótico, favoreciendo al ahorro de tiempo ya que los procedimientos y equipos utilizados se encontraban ya validados y esto aseguró la obtención de resultados confiables.

Los estudios seleccionados al no seguir las instrucciones de los fabricantes las cuales están descritas en la Tabla 9, dieron lugar a obtener diferencias entre sensibilidad y especificidad analíticas, por lo que se identificó los parámetros que afectaron este cambio, uno de estos es que usaron distintos tipos de muestras y dependiendo del tipo realizaron el procedimiento adecuado para preparar cada una de ellas con diferentes kits de extracción y equipos de amplificación.

El kit Bio-Evolution para *T. gondii*, fue utilizado por Filisetti y colaboradores en el año 2015 y Nourrison y colaboradores en el año 2021, los cuales utilizaron en su estudio 157 y 31 muestras respectivamente, con kits de extracción de ADN y equipos de amplificación distintos (Filisetti et al., 2015) (Nourrison et al., 2021). Filisetti y colaboradores en el año 2015 realizaron su estudio y obtuvieron una especificidad analítica más baja, a la que atribuyeron el uso de equipos de amplificación y kits de extracción no recomendados por el fabricante, en comparación con Nourrison y colaboradores que en el año 2021 realizaron un estudio comparativo con un tamaño de muestras muy pequeño, pese a esto no se vieron afectados los valores de sensibilidad y especificidad analíticas

El kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, fue utilizado por Robert-Gangneux y sus colaboradores en el año 2017 y por Tomasoni y colaboradores en el año 2021, realizaron su estudio con 128 y 525 muestras, con kits de extracción de ADN diferentes (Robert-Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019). En estos dos estudios los investigadores concluyeron que no se vio afectada la sensibilidad y especificidad analíticas ya que obtuvieron valores cercanos al 100%, pese a usar kits de extracción no recomendados por el fabricante, por lo que este kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, pudo ser adaptado a las condiciones de cada laboratorio.

El kit LightMix ® *Toxoplasma gondii* fue utilizado por Döşkaya y colaboradores en el año 2019 y Brenier-Pinchart y colaboradores en el año 2021, los investigadores realizaron sus estudios con 38 y 133 muestras respectivamente y además utilizaron kits de extracción diferentes (Brenier-Pinchart et al., 2021), además en el estudio de Döşkaya y

colaboradores en el año 2019, se realizaron ciertas modificaciones en el procedimiento de reacción de amplificación (Döşkaya et al., 2019). Si comparamos estos dos grupos, el de Döşkaya realizó su estudio con un tamaño de muestra pequeña, siendo ésta una de las razones por la que la sensibilidad analítica fue del 87,5%, así como que el proceso de amplificación también registró ciertas modificaciones (Döşkaya et al., 2019). Mientras tanto, el estudio de Brenier-Pinchart, que registró una sensibilidad y especificidad analíticas del kit LightMix® *Toxoplasma gondii*, del 98,1%, se caracterizó por utilizar un número de muestras mucho mayor (133 muestras) y la amplificación siguió las recomendaciones del fabricante (Brenier-Pinchart et al., 2021).

En resumen, estos estudios de RT-PCR realizados por los investigadores para la detección de TC donde se evaluaron la sensibilidad y especificidad analíticas de los kits, (Filisetti et al., 2015) (Robert-Gangneux et al., 2017) (Tomasoni et al., 2019) (Döşkaya et al., 2019) (Nourrison et al., 2021) (Brenier-Pinchart et al., 2021), han demostrado que estos parámetros de rendimiento son dependientes de la calidad de la muestra, del tamaño de la muestra, puesto que es conocido que para evaluar una prueba diagnóstica se requiere un tamaño de muestra mínima calculada manualmente o mediante un software estadístico, que dependerá también del tipo de estudio. Recordemos que mientras mayor sea el número de muestras será más eficiente la valoración de la sensibilidad y especificidad analíticas (Bujang y Adnan, 2016).

Tabla 8.

Semejanzas y diferencias del rendimiento analítico de los kits de RT-PCR.

Autores	Semejanzas	Autores	Diferencias
Filisetti et al., 2015 y Nourrison et al., 2021	Kit Bio-Evolution para <i>T. gondii</i> . Gen REP-529 Muestra de líquido amniótico Preparación de amplificación	Filisetti et al., 2015	157 muestras kit de extracción de ADN (Mini kit de ADN QIAamp, micro kit de AND QIAamp, PCR High Pure, Tween-Nonidet-NaOH) Equipo de amplificación (Light Cycler 1.0, Light Cycler 2.0, Light Cycler 480, ABI Prism 7000, ABI 7500)
		Nourrison et al., 2021	31 muestras Sangre total, sangre de cordón, placenta. Kit de extracción de ADN (Cartucho para extracción de ELITE InGenius SP 200, cartuchos de extracción ELITE InGenius SP 1000). Equipo de amplificación (ELITE InGenius)

Autores	Semejanzas	Autores	Diferencias
Robert-Gangneux et al., 2017 y Tomasoni et al., 2019	Kit <i>Toxoplasma g.</i> ELITe MGB® Gen REP-529 Muestra de líquido amniótico Preparación de amplificación	Robert-Gangneux et al., 2017 Tomasoni et al., 2019	128 muestras. Muestras de placenta, sangre total, biopsia, líquido cefalorraquídeo. kit de extracción de ADN (Minikit QIAamp ADN) 525 muestras kit de extracción de ADN NUCLISENS® EASYMAG®
Döşkaya et al., 2019 y Brenier-Pinchart et al., 2021	kit LightMix® <i>Toxoplasma gondii</i> Gen RE Muestra de líquido amniótico Equipo de amplificación Light Cyclar	Döşkaya et al., 2019 Brenier-Pinchart et al., 2021	38 muestras Preparación de amplificación Sangre total, tejido, líquido cefalorraquídeo, líquido intraocular. kit de extracción de ADN Qiagen Mini kit Preparación de amplificación modificada por los investigadores. 133 muestras Placenta, sangre total, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido de lavado broncoalveolar, biopsia de tejido, muestra de ganglios. kit de extracción de ADN Tween-Nonidet-NaOH, Mini kit de ADN QIAamp, Roche® MagNA pure Compact Preparación de amplificación como recomienda el fabricante.

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Tabla 9.

Características de los kits utilizados.

#	Nombre del kit	Blanco dirigido	Resultado	Tipos de muestra	Kit de extracción de ADN	Reactivos proporcionados por el fabricante	Equipo de amplificación	Características del rendimiento analítico	
								Sensibilidad	Especificidad
1	RTST01P LD Toxoplasma g. ELITE MGB® Kit (Elitech®)	REP-529	Cualitativo	Líquido amniótico, sangre completa, líquido cefalorraquídeo	EXTRAblood, NucliSENS easyMAG Reagents	TOXO Q-PCR Mix	ELITE InGenius, NucliSENS easyMAG	98 %	100 %
2	Bio-Evolution BE-A997-AB (<i>Toxoplasma gondii</i>)	REP-529	Cualitativo y cuantitativo	Líquido amniótico, sangre completa, lavado bronco-alveolar, líquido cefalorraquídeo, muestras de biopsia (placenta)	Mini kit QIAamp DAN, NucliSENS easyMag, MagNA Pure, QIAcube, BioRobot EZ1	MIX MG WATER Control + Control interno	ABI7500 (Applied Biosystems) o un LightCycler 480 II (Roche)	99 %	99 %
3	LightMix® Kit Toxoplasma gondii (EC) – TIB MolBiol	Gen repetitivo de 134 pares de bases	Cualitativo	Líquido amniótico, sangre completa, tejido, líquido cefalorraquídeo, líquido intraocular	MagNA Pure Compact	Viales con tapa verde Viales tapa blanca 6 estándares liofilizados Lamina sellada para fila estándar Vial tapa blanca Vial tapa negra	LightCycler® 480 Instrument	100 %	96,8 %

Fuente: Investigación.

Autores: S. Molina y M.I. Vaca

Los estudios que utilizaron los kits *Toxoplasma g.* ELITe MGB® y Bio-Evolution BE-A997-AB (*Toxoplasma gondii*), a pesar de las diferencias de metodología de y las características de rendimiento de cada kit, han demostrado que estos kits son eficientes y proporcionan una detección adecuada del parásito. Consideramos que, entre ellos, el mejor para Ecuador es el kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, gracias a la enzima UNG que es un elemento importante para evitar la contaminación característica de la amplificación, permitiendo que la prueba alcance una sensibilidad y especificidad analíticas cercanas al 100%, además de ser un kit bastante accesible.

4.4. Ventajas y limitaciones del uso de los kits de RT-PCR.

Las buenas prácticas del manejo de estos tres kits permiten que los resultados sean más seguro y confiables, ya que estos presentan protocolos que ayudan a ahorrar tiempo y se acreditan con mayor facilidad que los ensayos que se desarrollan en los laboratorios (Morelle et al., 2012).

El kit Bio-Evolution BE-A997-AB (*Toxoplasma gondii*) tiene algunas ventajas como es emitir resultados cualitativos y cuantitativos, este kit proporciona reactivos listos para su uso, se puede utilizar una variedad de muestras y posee amplia gama de kits de extracción de ADN (Nourrison et al., 2021) (Filisetti et al., 2015). Los distribuidores del kit Bio-Evolution BE-A997-AB (*Toxoplasma gondii*) se encuentran específicamente en Francia, por lo que no se puede adquirir con facilidad en otros países, a esto se suma la falta de medios de comunicación con los mismos.

El kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® proporciona un solo reactivo listo para su uso y contiene una mezcla completa que posee la enzima UNG (Robert-Gangneux et al., 2017), que descarta cualquier tipo de contaminación por los arrastres de productos de PCR previamente amplificados (Aeschbach y Dion, 2017).

Robert-Gangneux et al. en el año 2017 menciona que puede haber resultados falsos negativos con el kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, cuando existen sustancias interferentes como son al utilizar muestras con alta celularidad o con hemoglobina (Robert-Gangneux et al., 2017); esto lo menciona también Döşkaya et al., en el año 2019 con respecto a las interferencias que pueden ser causantes de resultados falsos negativos con el uso del LightMix® *Toxoplasma gondii* añadiendo también que una elevada concentración de

proteínas pueden hacer que la sensibilidad del ensayo disminuya, así como también los resultados sean inexactos (Döşkaya et al., 2019). Por otro lado, concuerda con lo dicho el fabricante del kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB®, ya que recomienda que se debe evitar que el ADN que procede de la muestra contenga heparina, hemoglobina o etanol para no tener problemas de inhibición en el ensayo o que se pueda obtener resultados poco fiables.

CONCLUSIONES

- La prueba RT-PCR se considera en la actualidad una de las más eficaces para el diagnóstico de TC, tanto por su facilidad de manejo como por las técnicas que se pueden utilizar para llegar a obtener resultados fiables y a corto tiempo, lo cual permite al médico dar un diagnóstico precoz y eficiente de la TC.
- Gracias a las características de rendimiento analítico se pudo determinar el kit más efectivo que es el *Toxoplasma g.* ELITe MGB® el cual está dirigido al REP-529, ya que éste presenta una sensibilidad del 100 % y especificidad analíticas entre el 99,7 y 100%, estas características de rendimiento están verificadas tanto en el inserto descrito por el fabricante, como en los estudios mencionados en los artículos de revisión.
- El kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® fue el más eficiente comparado con el kit Bio-Evolution para *T. gondii* y el LightMix® *Toxoplasma gondii*, ya que posee componentes extra como es la enzima N-uracil glicosidasa que elimina la contaminación que se puede dar en el proceso de amplificación.
- El kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® emite confianza y fiabilidad en los resultados, ya que tiene una sensibilidad analítica del 100 % y especificidad analítica entre el 99,7 y 100%, lo que hizo que esta técnica sea más sensible y específica con muestras, procedimientos y equipos de amplificación recomendado por el fabricante, además este kit *Toxoplasma g.* ELITe MGB® tiene más accesibilidad para su adquisición en el Ecuador.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios epidemiológicos de la TC en Ecuador para obtener datos actualizados que ayuden identificar la incidencia de esta parasitosis.
- Tomando como base los estudios anteriores, se recomienda realizar investigaciones clínicas comparativas donde se establezcan las ventajas y desventajas de la aplicación de los métodos serológicos vs métodos moleculares para el diagnóstico de TC en el Ecuador.
- Se recomienda el uso de pruebas serológicas y moleculares especialmente en pacientes donde el diagnóstico serológico no se haya establecido de manera clara o donde permanezca la duda diagnóstica.
- Es importante tener en cuenta las ventajas y limitaciones de cada kit de RT-PCR, para adquirir el kit más apropiado para el diagnóstico de TC en el Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Aeschbach, L., & Dion, V. (2017). Minimizing carry-over PCR contamination in expanded CAG/CTG repeat instability applications. *Scientific Reports*, 7(1), 18026. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18168-2>
- Amendoeira, M. R. R., & Millar, P. R. (2021). Congenital toxoplasmosis: The importance of implementing clinical practice guidelines. *The Lancet Regional Health - Americas*, 3(12), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100023>
- Ammar, N. A., Yera, H., Bigot, J., Botterel, F., Hennequin, C., & Guitard, J. (2020). Multicentric Evaluation of the Bio-Evolution Toxoplasma gondii Assay for the Detection of Toxoplasma DNA in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(2), e01231-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01231-19>
- Andréu, L. M. (s. f.). *TOXOPLASMOSIS: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO EN LAS GESTANTES*.
- Aralar, A., Yuan, Y., Chen, K., Geng, Y., Ortiz Velez, D., Sinha, M., Lawrence, S. M., & Fraley, S. I. (2020). Improving Quantitative Power in Digital PCR through Digital High-Resolution Melting. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6), e00325-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00325-20>
- Baquero-Artigao, F., del Castillo Martín, F., Fuentes Corripio, I., Goncé Mellgren, A., Fortuny Guasch, C., de la Calle Fernández-Miranda, M., González-Tomé, M. I., Couceiro Gianzo, J. A., Neth, O., & Ramos Amador, J. T. (2012). Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita. *Anales de Pediatría*, 79(2), 116.e1-116.e16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.12.001>
- Belaz, S., Gangneux, J.-P., Dupretz, P., Guiguen, C., & Robert-Gangneux, F. (2015). A 10-Year Retrospective Comparison of Two Target Sequences, REP-529 and B1, for Toxoplasma gondii Detection by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1294-1300. <https://doi.org/10.1128/JCM.02900-14>
- Bin, D. S. M., & Almushait, M. A. (2012). Detection of Toxoplasma gondii DNA by PCR in blood samples collected from pregnant Saudi women from the Aseer region, Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*, 32(5), 507-512. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2012.14.7.1200>
- Brenier-Pinchart, M., Robert-Gangneux, F., Accoceberry, I., Pichard, S., Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H., Lévêque, M. F., Hoarau, G., Pelloux, H., Bastien, P., Sterkers, Y., & Varlet-Marie, E. (2021). Multicenter Comparative Assessment of the TIB MolBiol Toxoplasma gondii Detection Kit and Four Laboratory-Developed PCR Assays for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(8), 1000-1006. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.010>
- Brenier-Pinchart, M.-P., Varlet-Marie, E., Robert-Gangneux, F., Filisetti, D., Guitard, J., Sterkers, Y., Yera, H., Pelloux, H., & Bastien, P. (2021). Impact of pre-analytic step duration

on molecular diagnosis of toxoplasmosis for five types of biological samples. *PLOS ONE*, 16(2), e0246802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246802>

Bujang, M. A., & Adnan, T. H. (2016). Requirements for Minimum Sample Size for Sensitivity and Specificity Analysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(10), YE01-YE06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18129.8744>

Carral, L., Kaufer, F., Pardini, L., Durlach, R., Moré, G., Venturini, M. C., Freuler, C., Carral, L., Kaufer, F., Pardini, L., Durlach, R., Moré, G., Venturini, M. C., & Freuler, C. (2018). Toxoplasmosis congénita: Diagnóstico serológico, RPC, aislamiento y caracterización molecular de *Toxoplasma gondii*. *Revista chilena de infectología*, 35(1), 36-40. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100036>

Cassaing, S., BESSIERES, M., Berry, A., Berrebi, A., Fabre, R., & Magnaval, J. (2006). Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 720-724. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.720-724.2006>

CDC. (2020, noviembre 10). *Toxoplasmosis*. <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>

Chegeni, T., Sharif, M., Sarvi, S., Moosazadeh, M., Montazeri, M., Aghayan, S., Balalami, N., Gholami, S., Hosseini, Z., Saberi, R., Anvari, D., Gohardehi, S., & Daryani, A. (2019). Is there any association between *Toxoplasma gondii* infection and depression? A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 14(6), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218524>

Cofre, F., Delpiano, L., Labraña, Y., Reyes, A., Sandoval, A., & Izquierdo, G. (2016). TORCH syndrome: Rational approach of pre and post natal diagnosis and treatment. Recommendations of the Advisory Committee on Neonatal Infections Sociedad Chilena de Infectología, 2016. *Revista chilena de infectología*, 33(2), 191-216. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200010>

Delhaes, L., Filisetti, D., Brenier-Pinchart, M.-P., Pelloux, H., Yéra, H., Dalle, F., Sterkers, Y., Varlet-Marie, E., Touafek, F., Cassaing, S., & Bastien, P. (2014). Freezing and storage at -20 °C provides adequate preservation of *Toxoplasma gondii* DNA for retrospective molecular analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(3), 197-199. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.08.007>

Döşkaya, M., Pullukçu, H., Karakavuk, M., Şahar, E. A., Taşbakan, M. S., Taşbakan, M. I., Yılmaz, M., Can, H., Döşkaya, A. D., & Gürüz, A. Y. (2019). Comparison of an in house and a commercial real-time polymerase chain reaction targeting *Toxoplasma gondii* RE gene using various samples collected from patients in Turkey. *BMC Infectious Diseases*, 19(1042), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4666-z>

Edvinsson, B., Lappalainen, M., & Evengård, B. (2006). Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(2), 131-136. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01332.x>

- El Bissati, K., Levigne, P., Lykins, J., Adlaoui, E. B., Barkat, A., Berraho, A., Laboudi, M., El Mansouri, B., Ibrahimi, A., Rhajaoui, M., Quinn, F., Murugesan, M., Seghrouchni, F., Gómez-Marín, J. E., Peyron, F., & McLeod, R. (2018). Global initiative for congenital toxoplasmosis: An observational and international comparative clinical analysis. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0164-4>
- Faucher, B., Miermont, F., Ranque, S., Franck, J., & Piarroux, R. (2012). Optimization of *Toxoplasma gondii* DNA extraction from amniotic fluid using NucliSENS easyMAG and comparison with QIAamp DNA minikit. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(6), 1035-1039. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1402-z>
- Filisetti, D., Sterkers, Y., Brenier-Pinchart, M.-P., Cassaing, S., Dalle, F., Delhaes, L., Pelloux, H., Touafek, F., Varlet-Marie, E., Yera, H., Candolfi, E., & Bastien, P. (2015). Multicentric Comparative Assessment of the Bio-Evolution *Toxoplasma gondii* Detection Kit with Eight Laboratory-Developed PCR Assays for Molecular Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 29-34. <https://doi.org/10.1128/JCM.01913-14>
- Frazer, Z., Yoo, C., Sroya, M., Bellora, C., DeWitt, B. L., Sanchez, I., Thomas, G. A., & Mathieson, W. (2020). Effect of Different Proteinase K Digest Protocols and Deparaffinization Methods on Yield and Integrity of DNA Extracted From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 68(3), 171-184. <https://doi.org/10.1369/0022155420906234>
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116-117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Ho Kim, Y., Yang, I., Bae, Y.-S., & Park, S.-R. (2018). Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition. *BioTechniques*, 44(4), 495-505. <https://doi.org/10.2144/000112705>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Lamb, A. N., Rosenfeld, J. A., Coppinger, J., Dodge, E. T., Dabell, M. P., Torchia, B. S., Ravnan, J. B., Shaffer, L. G., & Ballif, B. C. (2012). Defining the impact of maternal cell contamination on the interpretation of prenatal microarray analysis. *Genetics in Medicine*, 14(11), 914-921. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.77>
- Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M. S., Namasivayam, S., Swapna, L. S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B. P., Ajioka, J. W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J. C., Boyle, J. P., Dardé, M. L., Diaz-Miranda, M. A., Dubey, J. P., Fritz, H. M., Gennari, S. M., Gregory, B. D., ... Sibley, L. D. (2016). Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nature Communications*, 7(1), 10147. <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>

- Macedo-da-Silva, J., Marinho, C. R. F., Palmisano, G., & Rosa-Fernandes, L. (2020). Lights and Shadows of TORCH Infection Proteomics. *Genes*, *11*(8), 894. <https://doi.org/10.3390/genes11080894>
- Méndez, J. O., Plúas, G. R., Castillo, H. R., & Morán, Y. O. (2021). Abordaje de diagnóstico y terapéutico de la toxoplasmosis congénita. *Journal of American Health*. <https://doi.org/10.37958/jah.v0i0.74>
- Morelle, C., Varlet-Marie, E., Brenier-Pinchart, M.-P., Cassaing, S., Pelloux, H., Bastien, P., & Sterkers, Y. (2012). Comparative Assessment of a Commercial Kit and Two Laboratory-Developed PCR Assays for Molecular Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(12), 3977-3982. <https://doi.org/10.1128/JCM.01959-12>
- Nourrison, C., Moniot, M., Poirier, P., & Sterkers, Y. (2021). Evaluation of Two Commercial Kits on the Automated ELITe InGenius PCR Platform for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis—The Journal of Molecular Diagnostics. *The Journal of Molecular diagnostics*, *23*(7), 865-871. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.004>
- Pérez, A. C. (2015). Perinatología y Reproducción Humana. *Perinatología y Reproducción Humana*, *29*(1), 1. <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2015.06.001>
- Pomares, C., Estran, R., Press, C. J., Bera, A., Ramirez, R., Montoya, J. G., & Robert Gangneux, F. (2020). Is Real-Time PCR Targeting Rep 529 Suitable for Diagnosis of Toxoplasmosis in Patients Infected with Non-Type II Strains in North America? *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(2), e01223-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01223-19>
- Pomares, C., & Montoya, J. G. (2016). Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(10), 2448-2454. <https://doi.org/10.1128/JCM.00487-16>
- Rahimi Esboei, B., Fallahi, S., Zarei, M., Kazemi, B., Mohebali, M., Shojaee, S., Mousavi, P., Teimouri, A., Mahmoudzadeh, R., Salabati, M., & Keshavarz Valian, H. (2022). Utility of blood as the clinical specimen for the diagnosis of ocular toxoplasmosis using uracil DNA glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification and real-time polymerase chain reaction assays based on REP-529 sequence and B1 gene. *BMC Infectious Diseases*, *22*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07073-3>
- Robert-Gangneux, F., Brenier-Pinchart, M.-P., Yera, H., Belaz, S., Varlet-Marie, E., Bastien, P., & Grupo de Estudio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia de Francia para la Toxoplasmosis. (2017). Evaluation of Toxoplasma ELITe MGB Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(5), 1369-1376. <https://doi.org/10.1128/JCM.02379-16>
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *25*(2), 264-296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

- Sánchez, R. S., Barba, M. A. B., Ramos, Y. C. R., & Peña, E. B. (2020). *Algunas variables epidemiológicas relacionadas con la toxoplasmosis en mujeres en edad fértil en Riobamba*. 39(1), 1-16.
- Smith, M. (2021a). Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. *Encyclopedia of Virology*, 35-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00053-9>
- Smith, M. (2021b). Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. En D. H. Bamford & M. Zuckerman (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)* (pp. 35-44). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00053-9>
- Sterkers, Y., Varlet-Marie, E., Cassaing, S., Brenier-Pinchart, M.-P., Brun, S., Dalle, F., Delhaes, L., Filisetti, D., Pelloux, H., Yera, H., & Bastien, P. (2010). Multicentric Comparative Analytical Performance Study for Molecular Detection of Low Amounts of *Toxoplasma gondii* from Simulated Specimens | Journal of Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3216-3222. <https://doi.org/10.1128/JCM.02500-09>
- Thalib, L., Gras, L., Romand, S., Prusa, A., Bessieres, M.-H., Petersen, E., & Gilbert, R. E. (2005). Prediction of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112(5), 567-574. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00486.x>
- Tomasoni, L. R., Messina, G., Genco, F., Scudeller, L., Prestia, M., Spinoni, V., Bonfanti, C., Prefumo, F., Castelli, F., & Meroni, V. (2019). Risk of congenital toxoplasmosis in women with low or indeterminate anti-*Toxoplasma* IgG avidity index in the first trimester of pregnancy: An observational retrospective study. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(6), 761.e9-761.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.09.024>
- von Elm, E., Altman, D., Egger, M., Pocock, S., Gøtzsche, P., & Vandenbroucke, J. (2007). *The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies*. <https://www.equator-network.org/reporting-guidelines/strobe/>
- Weida, J., Patil, A. S., Schubert, F. P., Vance, G., Drendel, H., Reese, A., Dlouhy, S., Bai, S., & Lee, M.-J. (2017). Prevalence of maternal cell contamination in amniotic fluid samples. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 30(17), 2133-2137. <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1240162>
- Xia, J., Venkat, A., Bainbridge, R. E., Reese, M. L., Roch, K. G. L., Ay, F., & Boyle, J. P. (2021). Third-generation sequencing revises the molecular karyotype for *Toxoplasma gondii* and identifies emerging copy number variants in sexual recombinants. *Genome Research*, 31(5), 834-851. <https://doi.org/10.1101/gr.262816.120>

ANEXOS

Anexo 1.

Matriz de estrategia de búsqueda.

Base de datos	Estrategia de búsqueda	Número de artículos	Fecha de búsqueda
Pubmed	("Toxoplasma gondii infection" OR "Toxoplasmosis" OR "T. gondii") AND ("Real time PCR" OR "qPCR" OR "Quantitative PCR")	216	12.10.2021
Scopus	TITLE-ABS-KEY (("Toxoplasma gondii infection" OR "Toxoplasmosis" OR "T. gondii") AND ("Real time PCR" OR "qPCR" OR "Quantitative PCR")) AND (LIMIT-TO (OA , "all")) AND (LIMIT-TO (PUBYEAR , 2021) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2020) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2019) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2018) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2017) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2016) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2015) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2013) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2012) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2011)) AND (EXCLUDE (EXACTKEYWORD , "Nonhuman")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Human"))	34	12.10.2021
Science Direct	("Toxoplasma gondii infection" OR "Toxoplasmosis" OR "T. gondii") AND ("Real time PCR" OR "qPCR" OR "Quantitative PCR")	66	12.10.2021
MEDES	(toxoplasmosis[título] OR toxoplasmosis[resumen] OR toxoplasmosis[palabras_clave]) AND (congénita[título] OR congénita[resumen] OR congénita[palabras_clave]) AND (pcr[título] OR pcr[resumen] OR pcr[palabras_clave])	3	12.10.2021
Dialnet	("Toxoplasmosis congenita") AND ("pcr")	2	12.10.2021
EBSCO	("toxoplasmosis congénita" AND ("diagnóstico molecular" OR "PCR en tiempo real"))	67	12.10.2021

Base de datos	Estrategia de búsqueda	Número de artículos	Fecha de búsqueda
BVS	("Toxoplasma gondii infection" OR "congenital Toxoplasmosis" OR "T. gondii") AND ("Real time PCR" OR "qPCR" OR "Quantitative PCR") AND (mj:("Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa" OR "Toxoplasmosis Congénita") AND limit:("humans") AND la:("en" OR "es") AND year_cluster:("2019" OR "2017" OR "2020" OR "2021" OR "2016" OR "2013" OR "2018" OR "2014" OR "2015" OR "2012"))	29	12.10.2021
Google Scholar	("Toxoplasma gondii infection" OR "Toxoplasmosis" OR "T. gondii") AND ("Real time PCR" OR "qPCR" OR "Quantitative PCR")	11	12.10.2021

Anexo 2.

Matriz de recolección de información primaria.

Base de datos	Número de artículos por identificar	Número de artículos duplicados	Número de artículos sin duplicados
Pubmed	216	92	124
Scopus	34	24	10
Science Direct	66	36	30
MEDES	3	3	0
Dialnet	2	2	0
EBSCO	67	32	35
BVS	29	7	22
Google Scholar	11	10	1

Anexo 3.

Lista de verificación de información de STROBE (von Elm et al., 2007)

	Número	Recomendación	N° de página
Título y resumen	1	(a) Indique el diseño del estudio con un término de uso común en el título o resumen. (b) Proporcionar en resumen un resumen informativo y equilibrado de lo que se hizo y lo que se encontró.	
Introducción			
Antecedentes/justificación	2	Explicar los antecedentes científicos y la justificación de la investigación que se informa.	
Objetivos	3	Enunciar los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada.	
Métodos			
Diseño de estudio	4	Presentar los elementos clave del diseño del estudio al principio del artículo.	
Lugar	5	Describir el entorno, las ubicaciones y las fechas relevantes, incluidos los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recopilación de datos.	
Participantes	6	(a) Estudio de cohorte: indique los criterios de elegibilidad y las Fuentes y métodos de selección de los participantes. Describir los métodos de seguimiento. Estudios de casos y controles: Proporcione los criterios de elegibilidad y las Fuentes y métodos de determinación de casos y selección de controles. Explicar el fundamento de la elección de casos y controles. Estudio transversal: proporcione los criterios de elegibilidad y las Fuentes y métodos de selección de los participantes. (b) Estudio de cohorte: para estudios emparejados, proporcione los criterios de emparejamiento y el número de personas expuestas y no expuestas. Estudio de casos y controles: para estudios emparejados, proporcione los criterios de emparejamiento y el número de controles por caso.	
Variables	7	Defina claramente todos los resultados, exposiciones, predictores, posibles factores de confusión y modificadores de efectos. Dar los criterios de diagnóstico, si corresponde.	

	Número	Recomendación	N° de página
Fuentes de datos/ medición	8*	Para cada variable de interés, proporcione fuentes de datos y detalles de los métodos de evaluación (medición). Describir la comparabilidad de los métodos de evaluación si hay más de un grupo.	
Parcialidad	9	Describa cualquier esfuerzo para abordar las posibles Fuentes de sesgo.	
Tamaño del estudio	10	Explique cómo se llegó al tamaño del estudio.	
VARIABLES CUANTITATIVAS	11	Explique cómo se manejaron las variables cuantitativas en los análisis. Si corresponde, describa qué agrupaciones se eligieron y por qué.	
Métodos de estadística	12	(a) Describa todos los métodos estadísticos, incluidos los utilizados para controlar los factores de confusión.	
		(b) Describa cualquier método utilizado para examinar subgrupos e interacciones.	
		(c) Explique cómo se abordaron los datos faltantes.	
		(d) Estudio de cohorte: si corresponde, explique cómo se abordó la pérdida durante el seguimiento. <i>Estudio de casos y controles:</i> si corresponde, explique cómo se abordó la combinación de casos y controles. <i>Estudio transversal:</i> si corresponde, describa los métodos analíticos teniendo en cuenta la estrategia de muestreo.	
		(e) Describa cualquier análisis de sensibilidad.	
Resultados			
Participantes	13*	(a) Informar el número de personas en cada etapa del estudio, por ejemplo, números potencialmente elegibles, examinados para determinar su elegibilidad, confirmados como elegibles, incluidos en el estudio, completando el seguimiento y analizados.	
		(b) Explica las razones de la no participación en cada etapa.	
		(c) Considere el uso de un diagrama de flujo.	
Datos descriptivos	14*	(a) Proporcione las características de los participantes del estudio (por ejemplo, demográficas, clínicas, sociales) e información sobre exposiciones y posibles factores de confusión.	
		(b) Indique el número de participantes con datos faltantes para cada variable de interés.	

	Número	Recomendación	N° de página
		Resultados	
		(c) <i>Estudio de cohorte</i> : Resuma el tiempo de seguimiento (p. ej., cantidad promedio y total)	
Datos de resultado	15*	<i>Estudio de cohorte</i> : Informe el número de eventos de resultado o medidas de resumen a lo largo del tiempo.	
		<i>Estudio de casos y controles</i> : Informe de números en cada categoría de exposición o medidas resumidas de exposición.	
		<i>Estudio transversal</i> : Informe el número de eventos de resultado o medidas de resumen.	
Resultados principales	16	(a) Proporcione estimaciones no ajustadas y si corresponde, estimaciones ajustadas por factores de confusión y su precisión (por ejemplo, intervalo de confianza del 95%).Aclare qué factores de confusión se ajustaron y porqué se incluyeron	
		(b) Informe de los límites de las categorías cuando se categorizaron las variables continuas.	
		(c) Si es relevante considere traducir las estimaciones de riesgo relativo en riesgo absoluto para un período de tiempo significativo.	
Otros análisis	17	Informar otros análisis realizados, por ejemplo, análisis de subgrupos e interacciones y análisis de sensibilidad.	
Discusión			
Resultados clave	18	Resumir los resultados clave con referencia a los objetivos del estudio.	
Limitaciones	19	Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta las fuentes de posibles sesgos o imprecisiones. Discutir la dirección y la magnitud de cualquier sesgo potencial.	
Interpretación	20	Dar una interpretación general cautelosa de los resultados teniendo en cuenta los objetivos, las limitaciones, la multiplicidad de análisis, los resultados de estudios similares y otras pruebas relevantes.	
Generalidades	21	Discutir la generalizabilidad (validez externa) de los resultados del estudio.	
Otra información			
Fondos	22	Indique la fuente de financiación y el papel de los financiadores del presente estudio y en su caso del estudio original en el que se basa el presente artículo.	

Anexo 4.

Matriz de información de artículos excluidos.

Autor (es)	Año de publicación	Título del artículo	URL o DOI	Razón de exclusión
Diego Fernando Aranda Lozano	2010	VII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas	https://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/445	No se relacionada con los kits de PCR en tiempo real para el diagnóstico de <i>T. gondii</i> durante el embarazo
Linder Díaz, Belkys Zambrano, Germán Chacón, Brs. Ana Rocha, Santiago Díaz	2010	Toxoplasmosis y embarazo	http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322010000300006	Se excluye el artículo ya que es una revisión de PCR y de los genes que se pueden llegar a amplificar con la técnica mencionada
Sterkers Y, Pratloug F, Albaba S, Loubersac J, Picot MC, Pretet V, Issert E, Boulot P, Bastien P.	2012	Novel interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at the time of maternal infection.	10.1128 / JCM.00918-12	Se excluye el artículo ya que se habla se manera superficial de la PCR sin especificar el tipo que es.
Morelle C, Varlet-Marie E, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Pelloux H, Bastien P, Sterkers Y.	2012	Comparative assessment of a commercial kit and two laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis.	10.1128 / JCM.01959-12	Se excluye el artículo ya que en ningún momento mencionan de manera específica los dos kits comerciales que se han usado
Bin Dajem SM, Almushait MA	2012	Detection of Toxoplasma gondii DNA by PCR in blood samples collected from pregnant Saudi women from the Aseer region, Saudi Arabia.	10.5144 / 0256-4947.2012.14.7.1200	Se excluye el articulo porque no menciona el nombre del kit comercial a pesar de que analizan tres genes diferentes de <i>T. gondii</i>
Fricker-Hidalgo H, Cimon B, Chemla C, Darde ML, Delhaes L, L'ollivier C, Godineau N, Houze S, Paris L, Quinio D, Robert-Gangneux F, Villard O, Villena I, Candolfi E, Pelloux H.	2013	Toxoplasma seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicenter retrospective study.	10.1128 / JCM.00169-13	Se excluye el artículo ya que se usa métodos serológicos el diagnóstico de toxoplasmosis congénita y no PCR en tiempo real.

Autor (es)	Año de publicación	Título del artículo	URL o DOI	Razón de exclusión
Zhao M, Zhang R, Xu X, Liu Y, Zhang H, Zhai X, Hu X.	2013	IL-10 reduces levels of apoptosis in <i>Toxoplasma gondii</i> -infected trophoblasts.	10.1371 / journal.pone.0056455	Se excluye el artículo ya que se usa RT-PCR medir la expresión de HLA-G en infectados por <i>T. gondii</i> pero no habla de un diagnóstico de toxoplasmosis congénita.
Costa J.G.L., Carneiro A.C.A.V., Tavares A.T., Andrade G.M.Q., Vasconcelos-Santos D.V., Januário J.N., Menezes-Souza D., Fujiwara R.T., Vitor R.W.A.	2013	Real-time PCR as a prognostic tool for human congenital toxoplasmosis	10.1128 / JCM.00982-13	Se excluye este artículo porque realiza un análisis centrado en lesiones oculares junto con toxoplasmosis congénita.
Baquero-Artigao F, del Castillo Martín F, Fuentes Corripio I, Goncé Mellgren A, Fortuny Guasch C, de la Calle Fernández-Miranda M, González-Tomé MI, Couceiro Gianzo JA, Neth O, Ramos Amador	2013	Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita	10.1016/j.anpedi.2012.12.001	Se excluye el artículo ya que es una revisión bibliográfica de se centra en las inmunoglobulinas como forma de diagnosticar la Toxoplasmosis congénita.
Costa JM, Alanio A, Moukoury S, Clairet V, Debruyne M, Poveda JD, Bretagne S.	2013	Direct genotyping of <i>Toxoplasma gondii</i> from amniotic fluids based on B1 gene polymorphism using minisequencing analysis.	10.1186 / 1471-2334-13-552	Se excluye este artículo porque solo se centra en los genes que son usados por los kits comerciales, pero no habla de ningún kit comercial en concreto
Teixeira, Leandro Emidio; Kanunfre, Kelly Aparecida; Shimokawa, Paulo Tadashi; Targa, Lilia Spaleta; Rodrigues, Jonatas Cristian; Domingues, Wilson; Yamamoto, Lidia; Okay, Thelma Suely.	2013	The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples.	https://pesquisa.bvsalud.org/bvsecuador/resource/es/lil-691427	Se excluye el artículo porque se centran en los tipos de PCR

Autor (es)	Año de publicación	Título del artículo	URL o DOI	Razón de exclusión
Baquero-Artigao F, del Castillo Martín F, Fuentes Corripio I, Goncé Mellgren A, Fortuny Guasch C, de la Calle Fernández-Miranda M, González-Tomé MI, Couceiro Gianzo JA, Neth O, Ramos Amador JT; Grupo de Trabajo de Infección Congénita y Perinatal de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP).	2013	The Spanish Society of Pediatric Infectious Diseases Guidelines for the diagnosis and treatment of congenital toxoplasmosis.	10.1016 / j.anpedi.2012.12.001	Se excluye este artículo porque se centra más en lo que es la obtención de la muestra; procedimiento, profesional, semanas, recomendaciones, etc.
Abdel Aal A.A., Attia S.S., Hanafy N.A., Al-Antably A.S., Hassan M.A., El-Sherbiny W., Nasr A.S.	2014	Molecular diagnosis of toxoplasmosis in non-immune pregnant females	10.4149 / bli_2012_071	Se excluye el artículo ya que se usa PCR anidada para investigar toxoplasmosis en mujeres embarazadas.
Marangoni A., Capretti M.G., De Angelis M., Nardini P., Compri M., Foschi C., Orlandi A., Marsico C., Righetti F., Faldella G., Cevenini R.	2014	Evaluation of a new protocol for retrospective diagnosis of congenital toxoplasmosis by use of Guthrie cards.	10.1128 / JCM.00106-14	Se excluye el artículo por el tipo de muestra ya que esta fue toma en una tarjeta de Guthrie
Prusa AR, Kasper DC, Pollak A, Olischar M, Gleiss A, Hayde M.	2015	Amniocentesis for the detection of congenital toxoplasmosis: results from the nationwide Austrian prenatal screening program.	https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.09.018	Se excluye el artículo ya que se centra en el protocolo que se sigue en Australia para las mujeres embarazadas sin especificar qué tipo de PCR usan, centrándose más en las pruebas serológicas y en su algoritmo diagnóstico. .
De Oliveira Azevedo CT, do Brasil PE, Guida L, Lopes Moreira ME.	2016	Performance of Polymerase Chain Reaction Analysis of the Amniotic Fluid of Pregnant Women for Diagnosis of Congenital	10.1371 / journal.pone.0149938	Se excluye el artículo ya que no habla de kits comerciales de forma específica sino de forma general mencionando que no hay kits comerciales fiables y disponibles.

Autor (es)	Año de publicación	Título del artículo	URL o DOI	Razón de exclusión
		Toxoplasmosis: A Systematic Review and Meta-Analysis.		
Costa ME, Oliveira CB, Andrade JM, Medeiros TA, Neto VF, Lanza DC.	2016	An alternative nested-PCR assay for the detection of <i>Toxoplasma gondii</i> strains based on GRA7 gene sequences.	https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.035	Se excluye el artículo ya que se usa PCR anidada para el diagnóstico de <i>toxoplasma gondii</i> y no PCR en tiempo real para detectar toxoplasmosis congénita.
Berredjem H, Aouras H, Benlaifa M, Bechecker I, Djebbar MR.	2017	Contribution of IgG avidity and PCR for the early diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women from the North-Eastern region of Algeria.	10.4314 / ahs.v17i3.7	Se excluye el artículo ya que se usa PCR anidada y convencional para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita y no PCR e tiempo real, de igual manera este artículo se centra mucho en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita por medio de la técnica de ELISA.
Arce-Estrada G.E., Gómez-Toscano V., Cedillo-Peláez C., Sesman-Bernal A.L., Bosch-Canto V., Mayorga-Butrón J.L., Vargas-Villavicencio J.A., Correa D.	2017	Report of an unusual case of anophthalmia and craniofacial cleft in a newborn with <i>Toxoplasma gondii</i> congenital infection	https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2565-8	Se excluye el artículo ya que se usa qPCR para investigar toxoplasmosis, pero o se explica un procedimiento y se basa el artículo más en la explicación de la enoftalmia.
Yera H, Ménégaut L, Brenier-Pinchart MP, Touafek F, Bastien P, Dalle F;	2018	Evaluation of five automated and one manual method for <i>Toxoplasma</i> and human DNA extraction from artificially spiked amniotic fluid.	https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.014	Se excluye el artículo ya que este se centra exclusivamente en los kits que se encuentran en el mercado para realizar la extracción de AND.

Autor (es)	Año de publicación	Título del artículo	URL o DOI	Razón de exclusión
Carvalho F.R., Medeiros T., Vianna R.A.D.O., Douglass-Jaimes G., Nunes P.C.G., Quintans M.D.S., Fernandes C., Cavalcanti S.M.B., dos Santos F.B., Oliveira S.A.D., Cardoso C.A.A., Silva A.A.	2019	Simultaneous circulation of arboviruses and other congenital infections in pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil	10.1016 / j.actatropica.2019.01.020	Se excluye el artículo ya que se usa RT-qPCR para investigar la circulación de arbovirus que la toxoplasmosis congénita.
Ahmadpour E., Zargami E., Mahami-Oskouei M., Spotin A., Shahbazi A., Kafil H.S., Rajabi S., Alizadeh P., Azadi Y., Bahaj R., Shahrivar F., Barac A.	2019	Diagnosis of Toxoplasma gondii infection in pregnant women using automated chemiluminescence and quantitative real time PCR	https://www.apjtm.org/text.asp?2019/12/1/26/250341	Se excluye el artículo ya que a pesar de que menciona la técnica de PCR en tiempo real no menciona los nombres de los kits comerciales que han usado
Daniela Liempi, Ines Zulantay, Werner Apt, Mauricio Canals, Fernando Fredes	2020	Diagnóstico serológico y molecular aplicado a las parasitosis prevalentes y emergentes en Chile: Puesta al día	https://www.researchgate.net/publication/355478956_Serological_and_molecular_diagnosis_applied_to_the_prevalents_and_emerging_parasitosis_in_Chile_Update	No se relacionada con los kits de PCR en tiempo real para el diagnóstico de <i>T. gondii</i> durante el embarazo
Ammar NA, Yera H, Bigot J, Botterel F, Hennequin C, Guitard J.	2020	Multicentric Evaluation of the Bio-Evolution Toxoplasma gondii Assay for the Detection of Toxoplasma DNA in Immunocompromised Patients.	https://doi.org/10.1128/JCM.01231-19	Se excluye el artículo ya que habla de kits de PCR en tiempo real pero solo para diagnóstico de toxoplasmosis en pacientes inmunodeprimidos y no para diagnóstico de toxoplasmosis congénita.
Pomares, Christelle; Estran, Remy; Press, Cynthia J; Bera, Aaron; Ramirez, Raymund; Montoya, Jose G;	2020	Is Real-Time PCR Targeting Rep 529 Suitable for Diagnosis of Toxoplasmosis in Patients Infected with Non-Type II Strains in North America?	https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01223-19	Se excluye el artículo porque se centra más en los tipos de PCR, pero no mencionan los nombres de los kits

Autor (es)	Año de publicación	Título del artículo	URL o DOI	Razón de exclusión
Robert Gangneux, Florence.				
Castañeda Sandoval, Jaddy Vanessa	2020	Evaluación comparativa de la sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos de toxoplasmosis en el Hospital Roberto Gilbert Elizalde, período 2016 – 2019.	http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/16821	Se excluye el artículo porque no menciona el nombre de los kits comerciales que usaron
De La Fuente Villar B., Neves E., Louro V., Lessa J., Rocha D., Gomes L., Junior S., Pereira J., Jr., Moreira M., Guida L.	2020	Toxoplasmosis in pregnancy: a clinical, diagnostic, and epidemiological study in a referral hospital in Rio de Janeiro, Brazil	10.1016 / j.bjid.2020.10.001	Se excluye el artículo porque a pesar de que mencionan que usan la PCR en tiempo real, no mencionan los kits que usaron para realizar el diagnóstico Se excluye el artículo porque a pesar de que mencionan que usan la PCR en tiempo real, no mencionan los kits que usaron para realizar el diagnóstico
Soltani Tehrani, Bahram; Mirzajani, Ebrahim; Fallahi, Shirzad; Manouchehri Naeini, Kourosh; Mahmoudi, Mohammad Reza; Safari Kavishahi, Mansureh; Eskandari, Vajihah; Zebardast, Nozhat.	2020	Challenging TaqMan probe-based real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the two sensitive molecular techniques for the detection of toxoplasmosis, a potentially dangerous opportunistic infection in immunocompromised patients.	https://pesquisa.bvsalud.org/bvsecuador/resource/es/m dl-32448961	Se excluye este artículo ya que el diagnóstico de toxoplasmosis por PCR en tiempo real es para pacientes inmunocomprometidos y no en mujeres embarazadas
Guegan H., Stajner T., Bobic B., Press C., Olariu R.T., Olson K., Srbljanovic J., Montoya J.G., Djurković-Djaković O., Robert-Gangneux F.	2021	Maternal anti-toxoplasma treatment during pregnancy is associated with reduced sensitivity of diagnostic tests for congenital infection in the neonate	10.1128 / JCM.01368-20	Se excluye el artículo ya que se centra en las pruebas de ELISA mientras que no se concentra ni se habla de un kit de qPCR.
Brenier-Pinchart MP, Varlet-Marie E, Robert- Gangneux F, Filisetti D,	2021	Impact of pre-analytic step duration on molecular diagnosis of	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246802	Se excluye este artículo ya que no se centra en ningún kit el particular, solo se centra en dar recomendación para los kits comerciales

Autor (es)	Año de publicación	Título del artículo	URL o DOI	Razón de exclusión
Guitard J, Sterkers Y, Yera H, Pelloux H, Bastien P.		toxoplasmosis for five types of biological samples.		
Al-Yami F., Dar F., Yousef A., Al-Qurouni B., Al-Jamea L., Rabaan A., Quiambao J.V., Arulanantham Z.J., Woodman A.	2021	A pilot study on screening for gestational/congenital toxoplasmosis of pregnant women at delivery in the Eastern Province of Saudi Arabia	10.1016 / j.jsps.2021.03.009	Se excluye el articulo porque no solo menciona los mejores genes para realizar el diagnóstico de T. gondii

Anexo 5.

Matriz de almacenamiento de artículos seleccionados.

Base de datos	Título del artículo	Autor (es)	Año de publicación	URL o DOI	Fecha de búsqueda	
1	Pubmed	Comparison of an in house and a commercial real-time polymerase chain reaction targeting <i>Toxoplasma gondii</i> RE gene using various samples collected from patients in Turkey.	Döşkaya M, Pullukçu H, Karakavuk M, Şahar EA, Taşbakan MS, Taşbakan MI, Yılmaz M, Can H, Döşkaya AD, Gürüz AY.	2019	https://doi.org/10.1186/s12879-019-4666-z	19/11/2021
2	Pubmed	Multicentric comparative assessment of the bio-evolution <i>Toxoplasma gondii</i> detection kit with eight laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis.	Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, Pelloux H, Touafek F, Varlet-Marie E, Yera H, Candolfi E, Bastien P.	2015	https://doi.org/10.1128/JCM.01913-14	20/11/2021
3	Scopus	Risk of congenital toxoplasmosis in women with low or indeterminate anti- <i>Toxoplasma</i> IgG avidity index in the first trimester of pregnancy: an observational retrospective study	Tomasoni L.R., Messina G., Genco F., Scudeller L., Prestia M., Spinoni V., Bonfanti C., Prefumo F., Castelli F., Meroni V.	2019	10.1016 / j.cmi.2018.09.024	21/11/2021
4	Scopus	Evaluation of <i>Toxoplasma</i> ELITe MGB real-time PCR assay for diagnosis of toxoplasmosis	Robert-Gangneux F., Brenier-Pinchart M.-P., Yera H., Belaz S., Varlet-Marie E., Bastien P., Cassaing S., Dalle F., Delhaes L., Filisetti D., Ménotti J., Pelloux H., Sterkers Y., Touafek F., Molecular Biology Study Group of the French National Reference Center for Toxoplasmosis	2017	10.1128 / JCM.02379-16	21/11/2021

Base de datos	Título del artículo	Autor (es)	Año de publicación	URL o DOI	Fecha de búsqueda
5 Pubmed	Multicenter Comparative Assessment of the TIB MolBiol Toxoplasma gondii Detection Kit and Four Laboratory-Developed PCR Assays for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis	Brenier-Pinchart MP, Robert-Gangneux F, Accoceberry I, Pichard S, Garnaud C, Fricker-Hidalgo H, Lévêque MF, Hoarau G, Pelloux H, Bastien P, Sterkers Y, Varlet-Marie E.	2021	https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.010	21/11/2021
6 Pubmed	Evaluation of Two Commercial Kits on the Automated ELITE InGenius PCR Platform for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis	Nourrisson C, Moniot M, Poirier P, Sterkers Y.	2021	https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.004	21/11/2021

Anexo 6.

Matriz de recolección de información final.

Diseño de estudio	Información
Nº de artículo seleccionado Título del artículo	1 Comparison of an in house and a commercial real-time polymerasechain reaction targeting <i>Toxoplasma gondii</i> RE gene using various samplescollected from patients in Turkey.
Población	Muestras de pacientes en Turquía
Metodología	Muestras de líquido amniótico que fueron utilizadas para detectar el gen RE y el gen B1.
Diagnóstico molecular	Kit comercial RT-PCR con sensibilidad de 87,5 y 100% y especificidad del 96,8% Para la extracción de AND se usó Qiagen Mini kit
Resumen	Estudios demuestran que el gen RE llega a hacer más sensible y específico en comparación con el gen B1. Gran cantidad de proteínas son interferencias en las pruebas. El kit de TIBMOLBIOL que detecta del gen RE en este estudio fue usado como el estándar de oro por tener una sensibilidad del 100%y especificidad del 96,8% La sensibilidad analítica que se tomó en encuentra para esta técnica fue de 10 copias.
Nº de artículo seleccionado Título del artículo	2 Multicentric comparative assessment of the bio- evolution <i>Toxoplasma gondii</i> detection kit with eight laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis.
Población	Mujeres embarazadas
Metodología	Técnica molecular
Diagnóstico molecular	Kit PCR en tiempo real Bio-Evolution dirigido al gen REP529.
Resumen	El líquido amniótico es una muestra de importancia para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita por medio de PCR en tiempo real. En este estudio se realizó una comparación de ensayos PCR que fueron desarrollados por laboratorios con el kit comercial de bio evolution. Se analizaron 157 muestras obteniendo una concordancia de 99 al 100%. El kit comercial usado iba dirigido al gen rep529.

Diseño de estudio	Información
Nº de artículo seleccionado Título del artículo	3 Risk of congenital toxoplasmosis in women with low or indeterminate anti-Toxoplasma IgG avidity index in the first trimester of pregnancy: an observational retrospective study
Población	Mujeres embarazadas
Metodología	Estudio observacional retrospectivo
Diagnóstico molecular	PCR en tiempo real Toxoplasma gondii ELITE MGB dirigido al gene rep529
Resumen	Este tipo de kit qPCR presenta una <i>Sensibilidad 100% y una especificidad 99,7%</i> , por lo cual se recomienda el uso de esta técnica con este kit en particular para el diagnóstico de toxoplasmosis congénito especial porque se encuentra dirigido al gen rep529 que es una secuencia que más se usó para los kits comerciales.
Nº de artículo seleccionado Título del artículo	4 Evaluation of Toxoplasma ELITE MGB real-time PCR assay for diagnosis of toxoplasmosis
Población	Mujeres embarazadas
Metodología	Técnica molecular
Diagnóstico molecular	PCR en tiempo real Toxoplasma gondii ELITE MGB dirigido al gene rep529
Resumen	El kit comercial ELITE MGB (Elitech) se considera en este estudio un ensayo muy adecuado para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita ya que llegó a presentar una sensibilidad del 89% y una especificidad del 100%. Este puede llegar a detectar el parásito, aunque se encuentre en bajas concentraciones en las muestras que se están analizando. Se ha visto una tendencia en la creación de kits comerciales, pero son caros, aunque se puede ver la facilidad de uso y sus otras ventajas de dar resultados precisos. Se debe tener en cuenta el uso de muestras que se va a usar ya que de eso va a variar la sensibilidad o el método que se use para la extracción del ADN. Se realizó una comparación entre kits de extracción EXTRAblood el cual fue recomendación del fabricante o el QIAamp DNA minikit. Se crearon muchos kits, pero pocos se han evaluado por lo cual es importante dirigir las investigaciones a este tipo de campo.

Diseño de estudio	Información
Nº de artículo seleccionado Título del artículo	5 Evaluation of Two Commercial Kits on the Automated ELITe InGenius PCR Platform for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis
Población	
Metodología	Técnica molecular
Diagnóstico molecular	PCR en tiempo real con el kit ELITe y Bio-evolution
Resumen	Se realiza una comparación entre el kit comercial ELITe y Bio-evolution, ya que estos dos kits están dirigidos a detectar el Rep529 de <i>T. gondii</i> . Todos los pasos que se realizaron fueron los mismos que mencionaban los fabricantes. Las muestras que se usaron muestras de líquido amniótico y plasma que fueron liofilizadas. Evaluaron el rendimiento en cuanto a la secuencia que se detectaba, los tipos de sondas, los volúmenes de reactivos y de muestras, al igual que los ciclos y si el reactivo proporcionado contiene N-uracil glicosidasa.
Nº de artículo seleccionado Título del artículo	6 Multicenter comparative assessment of the TIBMoIBiol® Toxoplasma gondii detection kit and four laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of toxoplasmosis
Población	Mujeres embarazadas
Metodología	Técnica molecular
Diagnóstico molecular	PCR en tiempo real con el kit comercial TIBMoIBiol
Resumen	Se realiza una comparación del kit comercial TIBMoIBiol con 4 ensayos que han sido desarrollados por laboratorios que procesan muestras de toxoplasmosis congénita, así como toxoplasmosis. Se analizaron las características de los ensayos como los kits de extracción que uso cada uno, así como los equipos de PCR. A pesar de que se llegó a detectar una sensibilidad y especificidad de 98% para los ensayos que fueron desarrollados en los laboratorios el kit comercial aumento este valor al usar las muestras por multiplicado.