



ARTÍCULO ORIGINAL

Estudio retrospectivo de la aplicación de la amplificación génica cualitativa en muestras biológicas para el seguimiento de la toxoplasmosis en pacientes pediátricos receptores de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Mónica G. Nigro^a, Carlos Figueroa^b y Bibiana A. Ledesma^{a,*}

^a Departamento de Parasitología, Laboratorio de Toxoplasmosis, *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán"*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Servicio de Trasplante de Médula Ósea, *Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Profesor Dr. Juan P. Garrahan"*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 11 de noviembre de 2013; aceptado el 16 de enero de 2014.

PALABRAS CLAVE

Toxoplasma gondii;
PCR;
Trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas

Resumen

La toxoplasmosis es una infección oportunista causada por el parásito *Toxoplasma gondii*; su infección es grave y de difícil diagnóstico en pacientes que reciben un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH). En el Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Profesor Dr. Juan P. Garrahan" se realizó la vigilancia posttrasplante de 12 pacientes receptores de TCPH mediante la técnica de PCR cualitativa. La necesidad de seguimiento de estos pacientes fue definida por el antecedente de serología positiva para toxoplasmosis en el donante o receptor y ante la imposibilidad de iniciar el uso profiláctico de trimetoprima-sulfametoxazol a causa de la condición hematológica. Dos pacientes presentaron signos de enfermedad por *T. gondii* con resultado de PCR positivo y recibieron tratamiento con pirimetamina-clindamicina. En otros dos, la toxoplasmosis fue causa de muerte y hallazgo de autopsia, con resultado de PCR negativo. Cuatro pacientes recibieron tratamiento contra toxoplasmosis por la detección de una PCR positiva, sin manifestaciones clínicas. En los cuatro pacientes restantes no se detectaron signos de enfermedad por toxoplasmosis, con resultados de PCR negativos durante el seguimiento. La técnica de PCR cualitativa demostró ser útil para detectar la reactivación de la toxoplasmosis en receptores de TCPH, pero tiene limitaciones para el seguimiento y la toma de decisiones clínicas en pacientes con PCR positiva que persiste en el tiempo y manifestaciones de toxicidad por el tratamiento.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: bibilede@anlis.gov.ar (B.A. Ledesma).

KEYWORDS

Toxoplasma gondii;
PCR;
Hematopoietic stem
cell transplant

Retrospective study of the implementation of the qualitative PCR technique in biological samples for monitoring toxoplasmosis in pediatric patients receiving hematopoietic stem cell transplantation

Abstract

Toxoplasmosis is an opportunistic infection caused by the parasite *Toxoplasma gondii*. The infection is severe and difficult to diagnose in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Twelve patients receiving HSCT were monitored post-transplant, by qualitative PCR at the Children's Hospital S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". The monitoring of these patients was defined by a history of positive serology for toxoplasmosis in the donor or recipient and because their hematologic condition did not allow the use of trimethoprim-sulfamethoxazole for prophylaxis. During the patients' monitoring, two of them with positive PCR results showed signs of illness by *T. gondii* and were treated with pyrimethamine-clindamycin. In two other patients, toxoplasmosis was the cause of death and an autopsy finding, showing negative PCR results. Four patients without clinical manifestations received treatment for toxoplasmosis because of positive PCR detection. In four patients there were no signs of toxoplasmosis disease and negative PCR results during follow-up. The qualitative PCR technique proved useful for the detection of toxoplasmosis reactivation in HSCT recipients, but has limitations in monitoring and making clinical decisions due to the persistence of positive PCR over time and manifestations of toxicity caused by the treatment.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado que infecta una amplia variedad de aves y mamíferos, incluyendo seres humanos. La transmisión al huésped humano puede ocurrir por vía transplacentaria, por la ingestión de carne cruda o poco cocida, que contenga quistes tisulares, o por la exposición a los ooquistes en los suelos contaminados con heces de gato, el cual es huésped definitivo del parásito⁶.

La infección adquirida rara vez es sintomática en individuos sanos y su detección generalmente se realiza mediante técnicas serológicas. La probabilidad de haber sido infectado aumenta con la edad y varía entre las zonas geográficas, desde un 5 % hasta el 90 % de los adultos sanos².

La infección clínicamente sintomática puede presentarse de diferentes maneras. La más común es la forma linfática leve, semejante a la mononucleosis infecciosa. También puede presentarse como toxoplasmosis crónica, en forma de coriorretinitis; como una infección diseminada, que puede ser fulminante; o bien como una reactivación localizada que ocurre frecuentemente en cerebro y causa encefalitis. Las dos últimas formas por lo general se observan en los individuos altamente inmunocomprometidos, en los que la mayoría de estas infecciones suele ser el resultado de la reactivación de parásitos tisulares latentes en individuos seropositivos¹³.

Toxoplasma se ha descrito como un importante patógeno infeccioso oportunista que afecta a los receptores de trasplante de órganos sólidos, trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas y a pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)^{1,5}.

En el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT), la toxoplasmosis sigue siendo una causa de

infección grave que se asocia con una alta tasa de mortalidad¹³. Diversos estudios han estimado el riesgo de toxoplasmosis en valores de 0,3 % a 5,0 % después de HSCT alogénicos, en función de la prevalencia de *T. gondii* en la población^{7,12,17}. Estudios multicéntricos retrospectivos recientes y de un solo centro¹² han sugerido que la enfermedad invasiva puede ser más común de lo que se conocía anteriormente, con una incidencia entre receptores de trasplante alogénico *T. gondii* seropositivos de hasta un 4 % y una tasa de mortalidad estimada de 60-90 %¹².

Las presentaciones clínicas son inespecíficas y las manifestaciones pleomórficas de la toxoplasmosis hacen difícil obtener un diagnóstico definido antes de la muerte⁹. Los diferentes trabajos reflejan la necesidad de contar con pruebas diagnósticas rápidas, más sensibles y eficaces, para mejorar los resultados obtenidos en las infecciones oportunistas¹⁷.

La asociación de trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), utilizada habitualmente en el HSCT para la prevención de la infección por *Pneumocystis jirovecii*, previene también parcialmente la reactivación de *T. gondii* y es mejor tolerada que drogas más eficaces, pero con mayor mielotoxicidad^{4,15}. Sin embargo, es frecuente que en algunos pacientes, por intolerancia o mielotoxicidad, el TMS sea reemplazado por la pentamidina, droga que carece de efecto sobre *T. gondii*. Por este motivo, actualmente se recomienda que aquellos pacientes seropositivos que no reciben profilaxis con TMS o que tienen alto riesgo de reactivación de *T. gondii*, que son receptores de sangre de cordón umbilical (SCU) o que se encuentran en tratamiento de enfermedad de injerto contra huésped (EICH), realicen en forma periódica pruebas de PCR cuantitativa para *T. gondii* en sangre, de forma de poder detectar precozmente la reactivación del parásito e iniciar una terapia temprana que evite la progresión de la

enfermedad⁸. Al no contar en nuestro medio con una técnica cuantitativa para este fin, se decidió utilizar como alternativa una técnica de amplificación génica (PCR) cualitativa. Esta técnica se utilizó también para otras muestras biológicas en los casos de sospecha de enfermedad. El objetivo del estudio fue describir las ventajas y limitaciones de la técnica de PCR.

Materiales y métodos

Población en estudio

En el Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Profesor Dr. Juan P. Garrahan" se realizan un promedio anual de 40 TCPH, en niños y adolescentes provenientes de distintos lugares de Argentina. De ellos, entre un 20 y 25 % tienen resultados de serología positivos para toxoplasmosis antes del trasplante. Entre junio de 2011 y mayo de 2013 se remitieron al Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán" muestras de 12 pacientes seropositivos, los que se consideraron en situación de alto riesgo a causa de alguna de las siguientes condiciones: probabilidad de reactivación de *T. gondii* (por intensificación del tratamiento inmunosupresor para tratamiento de EICH); por presentar manifestaciones clínicas sospechosas de toxoplasmosis; por imposibilidad de recibir profilaxis con TMS.

Todos los pacientes evaluados recibieron antes del trasplante regímenes de acondicionamiento mieloablativos. Las profilaxis antimicrobianas incluyeron aciclovir los primeros 30 días postrasplante, ciprofloxacina y fluconazol hasta la recuperación de la neutropenia, y TMS antes del trasplante y desde el día 21 hasta los 6 meses posteriores. En caso de intolerancia a la TMS o mielotoxicidad, esta fue reemplazada por pentamidina inhalatoria. Los pacientes afectados por EICH crónica recibieron amoxicilina profiláctica y TMS o pentamidina hasta 6 meses después de suspendida la inmunosupresión.

Dentro del período de 100 días postrasplante se recibieron muestras biológicas de cada paciente, que fueron codificadas para preservar la identidad de los pacientes y garantizar su trazabilidad en todo momento desde su ingreso hasta su procesamiento.

Las muestras de sangre se enviaron semanalmente durante el tiempo en que se consideró al paciente en riesgo de reactivación de toxoplasmosis (por ejemplo, mientras su situación hematológica contraindicaba la administración de TMS). La mediana del número de muestras enviadas por paciente fue 12 (rango: 3-39). Se enviaron también muestras de lavado broncoalveolar (BAL) de 3 pacientes, a los que se les efectuó una endoscopia respiratoria por presentar enfermedad pulmonar.

Técnica serológica

Las muestras de suero del receptor y del donante fueron procesadas en el Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Profesor Dr. Juan P. Garrahan" mediante la técnica de MEIA (Abbott) y ELFA (bioMérieux), según las recomendaciones de los fabricantes (datos no publicados). Estos son sistemas

automatizados para la realización de inmunoensayos en el laboratorio, que permiten la cuantificación de las IgG anti-*Toxoplasma* en suero o plasma humano. La técnica de ELFA asocia el método inmunoenzimático sándwich en dos etapas a una detección final por fluorescencia. La técnica de MEIA se basa en el enzimoanálisis de micropartículas.

Purificación de taquizoítos

Los taquizoítos fueron recolectados del exudado peritoneal de ratones de la cepa CF1, previamente infectados con *T. gondii* cepa RH, para su posterior purificación. Los taquizoítos fueron contados directamente en una cámara de Neubauer. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$N.^{\circ} \text{ de taquizoítos} = \text{Número de taquizoítos contados} \times 10^4 \times \text{dilución/ml}$$

De los taquizoítos se extrajo ADN genómico para poder contar con controles positivos para las PCR cualitativas.

Extracción de ADN de *T. gondii* y de muestras de sangre

El ADN de las muestras de sangre entera fue obtenido utilizando el kit FlexiGene DNA (Qiagen). Para las muestras de BAL y para contar con el ADN de los taquizoítos totales se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen).

Técnica de PCR cualitativa

La detección de ADN de *T. gondii* en las muestras biológicas se basó en la amplificación del gen B1, que está repetido 35 veces en el genoma del parásito, lo cual confiere mayor sensibilidad a la técnica. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron B1 N1: 5' GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG 3'; B1 C1: 5' TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC 3', en una concentración final de 1 μmol /50 μl . La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 μl con 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), con 1X del buffer, 2 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de cada dNTP y 0,1 μl de cada oligonucleótido. Las muestras fueron amplificadas por 40 ciclos de 60 s a 94 °C; 45 s a 56 °C y 45 s a 72 °C, con un paso inicial de 4 min a 94 °C y un paso final de 10 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio. El tamaño del fragmento amplificado para el gen B1 fue de 190 pb.

Ensayo de inhibición

Se amplificó el gen de la β -actina en todas las muestras de ADN de sangre y BAL con el fin de validar la precisión del test, lo que permitiría distinguir resultados negativos verdaderos de falsos resultados negativos causados por un mal funcionamiento de la PCR debido a inhibidores o deterioro de los reactivos. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fueron β -actina F: 5' CGG AAC CGC TCA TTG CC 3'; β -actina R: 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC 3', en una concentración final de 1 μmol en un volumen final de 50 μl , con 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) 1X del buffer; 2,5 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de cada dNTP y 0,1 μl de

cada oligonucleotido. Las muestras fueron amplificadas por 35 ciclos de 60 s a 94 °C; 45 s a 54 °C y 90 s a 72 °C, con un paso inicial de 4 min a 94 °C y uno final de 10 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio. El tamaño del fragmento amplificado para el gen de la β -actina fue de 289 pb.

Resultados

En la tabla 1 se resumen las características y evolución de los pacientes evaluados. Los pacientes 1, 2, 5 y 8 presentaron enfermedad por *T. gondii*, y en los dos últimos fue causa de muerte y hallazgo de autopsia. En el caso del paciente n.º 5, se trataba de un adolescente que recibió un segundo trasplante luego de sufrir la pérdida del injerto del primer TCPH. Tuvo estudios de PCR en sangre negativos hasta 15 días antes de su muerte, la que se produjo en terapia intensiva, en donde ingresó por EICH aguda refractaria a corticoides y neumonía por *Cytomegalovirus* (CMV). Se produce el deceso de este paciente por falla hemodinámica refractaria a inotrópicos, y su autopsia mostró toxoplasmosis diseminada con un severo compromiso miocárdico. El paciente n.º 8 presentó una insuficiencia multiorgánica asociada a un cuadro séptico, sin documentación de germen en el contexto de una EICH aguda refractaria. Cinco días antes de su muerte se realizó el último estudio de PCR en sangre, cuyo resultado fue negativo. El estudio de la misma muestra por una técnica cuantitativa aún en fase de desarrollo mostró la presencia de 4 taquizoítos (datos no mostrados).

Los pacientes 1 y 2 presentaron enfermedad respiratoria aguda, con resultados positivos para *T. gondii* en los estudios de PCR en sangre y BAL. Estos pacientes mejoraron luego de recibir tratamiento con pirimetamina-clindamicina. En el primer caso se aisló también *Fusarium* en los hemocultivos, lo que también pudo haber sido causa de las imágenes nodulares observadas. Estos dos pacientes presentaron luego, mientras continuaban con el tratamiento inmunosupresor de su EICH, resultados positivos de PCR en sangre, por lo cual repitieron nuevos ciclos de tratamientos de cuatro semanas con pirimetamina-clindamicina o pirimetamina-sulfadiazina. En algunos episodios la PCR persistió positiva, a pesar de lo cual se suspendió el tratamiento por mielotoxicidad sin observarse manifestaciones de enfermedad.

En los pacientes 3, 4, 6 y 10 se detectó durante su seguimiento PCR positiva en sangre, y esta resultó negativa luego de haber recibido tratamiento, mientras que en los pacientes número 7, 9, 11 y 12 los estudios de PCR realizados fueron siempre negativos.

Discusión

La serie de pacientes estudiada reafirma la importancia de *T. gondii* como causa de enfermedad severa en los receptores de TCPH seropositivos. La inclusión de algunos pacientes con características especiales, como el haber reci-

bido un segundo TCPH, o presentar EICH refractaria o coinfecciones severas, sumado a la falta de profilaxis con TMS, pudo haber incidido en la frecuencia de 33 % de enfermedad, registrada en el grupo estudiado. Otro aspecto que cabe destacar es la importancia de realizar autopsia en los pacientes fallecidos luego de un TCPH, a fin de conocer la prevalencia real de una enfermedad cuyo diagnóstico *premortem* es difícil.

Debido a la dificultad de detectar la sensibilidad diagnóstica de la técnica dado que un resultado negativo no descarta la presencia de *T. gondii*, la variabilidad de la prevalencia de toxoplasmosis en las distintas regiones y la falta de drogas que combinen eficacia y seguridad, hacen que no haya en cuanto a su manejo un consenso similar al de la prevención de otras infecciones.

Sin embargo, las recomendaciones de expertos coinciden en que los pacientes seropositivos que no reciben TMS y aquellos con mayor riesgo, como quienes reciben sangre de cordón umbilical como fuente de su TCPH, al igual que los pacientes en los que se intensifica el tratamiento inmunosupresor, deberían ser seguidos con estudios de biología molecular, a fin de permitir un diagnóstico temprano de la reactivación de la infección.

La amplificación de ácidos nucleicos de *T. gondii* se ha convertido en una herramienta fundamental para el diagnóstico de la toxoplasmosis. El ensayo de PCR es una técnica molecular que se ha utilizado en diferentes tipos de muestras biológicas, como líquido amniótico, humor acuoso, medula ósea, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar, biopsia y sangre^{1,3,5,10,12,14,16,19}. Diferentes laboratorios utilizan la técnica de PCR *in house* debido a la falta de kits comerciales disponibles que detecten ácidos nucleicos de *T. gondii* mediante la técnica PCR¹¹.

La técnica cualitativa utilizada en este trabajo facilitó el diagnóstico de toxoplasmosis en algunos de los pacientes en estudio y la terapia temprana de otros enfermos con reactivación, pero sin signos de enfermedad. Sin embargo, tanto los resultados negativos obtenidos en otros casos en individuos con enfermedad, así como la persistencia de resultados positivos en pacientes con tratamiento prolongado, señalan sus limitaciones y la necesidad de contar con métodos de biología molecular cuantitativos para una mejor atención de los receptores de TCPH seropositivos.

En consecuencia, varios centros que realizan HSCT vigilan rigurosamente a los pacientes durante varios meses usando la técnica de PCR cuantitativa para la detección de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre, ya que es crucial la pronta iniciación de la terapia para pacientes con inmunodeficiencia profunda¹⁸. Debido a esta necesidad, el laboratorio de toxoplasmosis del Instituto Malbrán ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real *in house*, que se encuentra en proceso de validación.

Nota

Este trabajo ha sido realizado bajo las condiciones académicas y éticas determinadas en el marco regulatorio (resolución CA 630/07) para el desarrollo de investigaciones clínicas del Hospital Garrahan.

Tabla 1 Características y evolución de los pacientes estudiados (1 al 6)

Paciente	1	2	3	4	5	6
Sexo	Masculino	Masculino	Femenino	Femenino	Masculino	Femenino
Edad	15 años	14 años	18 años	14 años	13 años	3 años
Motivo del trasplante	Mielodisplasia	Leucemia mieloide crónica	Mielodisplasia	Leucemia linfoblástica aguda	Aplasia medular	Schwachman-Diamond
Tipo de donante	No familiar	Familiar	No familiar	Familiar	Familiar	Familiar
Fuente de CPH	Sangre periférica	Sangre periférica	Médula ósea	Sangre periférica	Médula ósea	Médula ósea
Serología Receptor/Donante	+ / +	+ / -	+ / -	+ / +	+ / +	+ / -
Tiempo de TCPH	45 días	9 meses	9 meses	1 año	1 mes	23 días
Motivo del estudio	EICH, nódulos pulmonares	EICH + neuropatía	Suspensión TMS	EICH refractaria	EICH refractaria	Suspensión TMS
Tipo de muestra	Sangre/ BAL	Sangre/ BAL	Sangre	Sangre/ BAL	Sangre	Sangre
Resultados	+ / +	+ / +	+	+ / -	-	+
Tratamiento	Primetamina + clindamicina	Primetamina + clindamicina	Primetamina + clindamicina	Primetamina + sulfadiazina	-	Primetamina + clindamicina
Evolución	Favorable ^a	Favorable	Favorable	Favorable	Toxoplasmosis diseminada ²	Favorable

Tabla 1 (continuación) Características y evolución de los pacientes estudiados (7 al 12)

Paciente	7	8	9	10	11	12
Sexo	Femenino	Femenino	Masculino	Masculino	Masculino	Femenino
Edad	4 años	13 años	12 años	10 años	3 años	21 años
Motivo del trasplante	Eritroblastopenia	Mielodisplasia	Adrenoleucodistrofia	Mielodisplasia	LMMJ	Leucemia linfoblástica
Tipo de donante	Familiar	Familiar	No familiar	No familiar	Familiar	Familiar
Fuente de CPH	Médula ósea	Médula ósea	Médula ósea	Sangre periférica	Médula ósea	Sangre periférica
Serología Receptor/Donante	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	- / +	
Tiempo de TCPH	7-100 días	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	13 meses
Motivo del estudio	IgM y PCR + pretrasplante (sangre)	EICH refractaria	EICH	Suspensión TMS	Suspensión TMS	Suspensión TMS
Tipo de muestra	Sangre	Sangre	Sangre	Sangre	Sangre	Sangre
Resultados	-	-	-	+	-	-
Tratamiento	-	-	-	Primetamina + clindamicina	-	-
Evolución	Favorable	Toxoplasmosis diseminada ^b	Fallecido ^c	Favorable	Favorable	Favorable

LMMJ: leucemia mielomonocítica juvenil.

^a Fallece al año de TCPH por sepsis por *Pseudomonas*.

^b Hallazgo de autopsia.

^c Sepsis sin documentación de germen, no se autorizó autopsia.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Tec. Jorge Barreiro, por proveer el antígeno de *Toxoplasma gondii*.

Lic. Nadia Bueno, por su colaboración en la redacción del Abstract.

Bibliografía

- Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C, Jiménez N, Fñillos T, Dorta-Contreras AJ, Cox R, Capó V, Pomier O, Bandera F, Ginorio D. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2009;6:2.
- Beaman MH, McCabe RE, Wong SY, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. *Principles and practice of infectious diseases*. New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 2455-5.
- Cassaing S, Bessieres MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2006;44:720-4.
- Carr A, Tindall B, Brew BJ, Marriott DJ, Harkness JL, Penny R, Cooper DA. Low-dose trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Ann Intern Med.* 1992;117:106-11.
- Derouin F and Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:1089-101.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970;167:893-6.
- Fricker-Hidalgo H, Bulabois CE, Brenier-Finchart MP, Hamidfar R, Garban F, Brion JP, Timsit JF, Cahn JY, Pelloux H. Diagnosis of toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation: results of DNA detection and serological techniques. *Clin Infect Dis.* 2009;48:e9-e15.
- Gea-Banacloche J, Masur H, Arns da Cunha C, Chiller T, Kirchoff L, Shaw P, Tomblyn M, Cordonnier C. Regionally limited or rare infections: prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44:489-94.
- Goebel WS, Conway JH, Faught P, Vakili ST, Haut PR. Disseminated toxoplasmosis resulting in graft failure in a cord blood stem cell transplant recipient. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;48:222-6.
- Kompalic-Cristo A, Frotta C, Mutis M, Suárez, Fernández O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res.* 2007;101:619-25.
- Lewis Jr JS, Khoury H, Storchand GA, Di Persio J. PCR for the diagnosis of toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002;2:616-24.
- Lim Z, Baker B, Zuckermann M, Wade JJ, Ceesay M, Ho AY, Devereux S, Mufti GJ, Pagliuca A. Toxoplasmosis following alemtuzumab-based allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J. Infect.* 2007;54:e83-6.
- Martino R, Maertens J, Bretagne S, Rovira M, Deconinck E, Ullmann AJ, Held T, Cordonnier C. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2000;31:1188-94.
- Martino R, Bretagne S, Ensele H, Maertens J, Ullmann AJ, Parody R, Schumacher U, Pautas C, Theunissen K, Schindel C, Muñoz C, Margall N. Early detection of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2005;40:67-78.
- Payá E, Noemí I, Tassara R, Catalán P, Avilés CL. Profilaxis de toxoplasmosis en niños y adultos sometidos a trasplante de órganos sólidos y precursores hematopoyéticos. *Rev Chilena Infectol.* 2012;29(Supl 1):S37-9.
- Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis.* 2003;3:7.
- Small TN, Leung L, Stiles J, Kiehn TE, Malak SA, O'Reilly RJ, Sepkowitz K. Disseminated toxoplasmosis following T cell-depleted related and unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:969-73.
- Patrat-Delon S, Gangneux JP, Lavoue S, Lelong B, Guiguen C, Le Tulzo Y, Robert-Gangneux F. Correlation of parasite load determined by quantitative PCR to clinical outcome in a heart transplant patient with disseminated toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2541-5.
- Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4765-8.