UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para obtener el título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Título del trabajo:

**ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA INFECCIÓN
POR *TOXOPLASMA GONDII* EN CERDOS**

Autor: **LAIS LUJÁN PARDINI**

Directora: Dra. María Cecilia VENTURINI

Codirector: Dr. Walter Ubaldo BASSO

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Eduardo Carlos MÓRTOLA

Dr. Diego Manuel POSIK

Dra. Miriam Mabel RIBICICH

Año 2012

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todos los que de diversas maneras me ayudaron cada día en éste trabajo de tesis.

A todos los que forman parte del Laboratorio de Inmunoparasitología por colaborar conmigo en la rutina de todos los días. Especialmente a los que conozco desde que empecé a trabajar allí, Diana, Isidoro, Gastón y Juan; porque desde el comienzo me enseñaron sin esperar nada a cambio. Gastón y familia, gracias por ayudarme en la aventura que significaron los muestreos a campo. A los más nuevos Selva, Magda, Lucía, Lorena, Andrea, Mariana, Pablo y Lauri.

A Cecilia por aconsejarme con paciencia y dedicación en el transcurso de éste trabajo de investigación. A Walter por ayudarme vía web, aunque como todos sabemos “él siempre está”. A los dos por ayudarme en el análisis de los resultados y en la redacción del manuscrito.

A los integrantes del laboratorio de Parasitología del Instituto Friedrich Loeffler, Alemania, especialmente al Dr. Gereon Shares, Pablo Maksimov y Daland Herrmann por su generosidad y constante colaboración durante mi estadía en Wusterhausen y aún en La Plata.

A la gente de la cátedra de Patología Especial de ésta Facultad por alentarme a incorporarme a éste grupo de investigación del que hoy soy una más; al Dr. Carlos Perfumo, Mariana y Javier por ayudarme con las muestras.

Y por último, pero muy importantes a mi familia por su apoyo incondicional, a vos Emi por acompañarme como nadie cada vez que lo necesité, a mi hermana Clari por sus palabras de aliento y cariño. A todos por estar siempre al lado mío sin esperar retribución alguna.

Muchas gracias a todos por ayudarme a recorrer este camino de aprendizaje tanto profesional como personal.

L.L.P.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

- **Pardini L.**, Bacigalupe D., Larsen A., Moré G., Piñeyro P., Unzaga J.M., Basso W., Venturini L., Venturini M.C.. SEROPREVALENCIA PARA *TOXOPLASMA GONDII* EN CERDOS: CONFIRMACIÓN POR DOS PRUEBAS SEROLÓGICAS. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis. VI Congreso Argentino de Zoonosis. Asociación Argentina de Zoonosis (AAZ). 18 al 20 de junio de 2008. Abstracts pág.38. Buenos Aires, Argentina.

- **Pardini L.**, Bacigalupe D., Larsen A., Moré G., Piñeyro P., Basso W., Venturini L., Venturini M.C.. CONCORDANCIA ENTRE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA Y WESTERN BLOT PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TOXOPLASMOSIS EN CERDOS. XVII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVDL). 29 al 31 de octubre de 2008. 110. Libro de Resúmenes. Santa Fé, Argentina.

- **Pardini L.**, Bacigalupe D., Cóceres V., Machuca M., Angel S., Basso W., Venturini L., Venturini M.C. EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA ELABORADA CON UN ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *TOXOPLASMA GONDII* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN EN CERDOS DE CONSUMO. V Congreso Argentino de Parasitología. Marzo de 2009. La Plata, Argentina. Resumen. **Publicado en Acta bioquímica clínica latinoamericana. Supl. 1, pág 143. (ISSN 1851-7064).**

- **Pardini L.**, Bacigalupe D., Cóceres V., Machuca M., Angel S., Basso W., Rambeaud M., Venturini L., Venturini M.C. ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY USING T *GONDII* RGRA7 ANTIGEN FOR ANTIBODY DETECTION IN PIGS. The 22nd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP 2009). Del 8 al 13 de agosto de 2009. Abstracts pág 122. Calgary, Canada.

- **Pardini L.**, Bacigalupe D., Moré G., Venturini L., Basso W., Venturini M.C. ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA INFECCIÓN POR *TOXOPLASMA GONDII* EN CERDOS. II Jornada de Actualización en Inmunología Veterinaria. **Publicado en Revista de Medicina Veterinaria (ISSN 1852-771X) 91, pág.40.** Rosario, 10 y 11 de diciembre de 2009.

- **Pardini L**; Maksimov P., Herrmann D, Bacigalupe D, Rambeaud M., Machuca M., Moré G., Basso W., Schares G., Venturini M.C. CONCORDANCIA ENTRE TRES PRUEBAS INMUNOSEROLÓGICAS Y VALIDACIÓN DEL USO DE LA PRUEBA DE ELISA-P30 PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA *TOXOPLASMA GONDII* EN CERDOS NATURALMENTE INFECTADOS. X° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (X°ALVEC) X° Congreso Nacional de Producción Porcina (X° CNPP) y las XVI° Jornadas de Actualización Porcina (XVI° JAP). Agosto de 2010. Poster. Argentina. **Primera mención por la presentación de trabajos científicos en el Área Sanidad.**
- **Pardini L.**, Bacigalupe D., Moré G., Rambeaud M., Basso W. , Perfumo C.J., Herrmann, D.C., Schares G., Venturini M.C ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *TOXOPLASMA GONDII* STRAINS IN SLAUGHTERED PIGS FROM ARGENTINA. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP 2011). Del 21 al 25 de agosto de 2011. Abstracts pág.336 (Poster). Buenos Aires, Argentina.
- **Pardini, L**, Maksimov, P, Herrmann, D.C., Bacigalupe, D., Rambeaud, M.,Machuca, M., Moré, G., Basso, W., Schares, G., Venturini, M.C. Evaluation of an in-house TgSAG1 (P30) IgG ELISA for diagnosis of naturally acquired *Toxoplasma gondii* infection in pigs . Enviado Veterinary Parasitology. En corrección de acuerdo a las sugerencias de los revisores.

Abreviaturas y símbolos

ADN: ácido desoxirribonucleico
AUC: *area under curve* (área bajo la curva)
c.s.p.: cantidad suficiente para
col. : colaboradores
dATP: deoxinucleótidos adenosina trifosfato
dCTP: deoxinucleótido citosina trifosfato
dd: bidestilada
dGTP: deoxinucleótido guanina trifosfato
DO: densidades ópticas
dpi: días post infección
dTTP: deoxinucleótido timina trifosfato
E: especificidad
EDTA: ácido etilén-diamino-tetraacético
EE.UU.: Estados Unidos
ELISA: enzimo inmuno ensayo ligado a enzima
F.C.V.: Facultad de Ciencias Veterinarias
fig.: figura
FNT α : factor de necrosis tumoral alfa
G.K.O. IFN gamma: knockout, cepa de ratón carente del gen que codifica para el interferón gamma.
g: gramo
GPI: glucosifosfatidilinositoles
gr.: griego
h: hora
HD: hospedador definitivo
HI: hospedador intermediario
hs.: horas
IB: *immunoblotting*
IFAT: indirect fluorescent antibody test
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IFN γ : interferón gamma
Ig: inmunoglobulina
IL: interleuquina
IM: intramuscular
kDa: kilo Dalton
L: litro
M: molar
MAT: técnica de aglutinación modificada
mg/kg: miligramos por kilogramo de peso
min.: minuto
ml: mililitro
mm: milímetro
N: normal
ng: nanogramo
NK: célula *natural killer*
nm: nanómetro
p.i.: post inoculación
PBS: solución buffer salina de fosfatos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pg: picogramo
PM: peso molecular

ROC: *receiver operating characteristic*
RON: proteínas de las roptrias de la región del cuello
ROP: proteínas de las roptrias de la región del bulbo
rpm: revoluciones por minuto
RSC: standard relativo de comparación
S: sensibilidad
SC: subcutáneo
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC: sistema nervioso central
Th: linfocito T colaborador
TLR: *toll like receptor*
U.N.L.P.: Universidad Nacional de La Plata
VP: vacuola parasitófora
µg: microgramo
µl: microlitro
µm: micrómetro

ÍNDICE

TÍTULO: “ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA INFECCIÓN POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EN CERDOS.”	1 -
PALABRAS CLAVES	1 -
RESUMEN	1 -
TITLE: “IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES OF <i>TOXOPLASMA GONDII</i> IN INFECTED PIGS”	4 -
KEYWORDS	4 -
ABSTRACT	4 -
OBJETIVOS GENERALES	7 -
OBJETIVOS PARTICULARES	7 -
A- ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS.....	7 -
B - AISLAMIENTO DE <i>T. GONDII</i> Y ESTUDIOS MOLECULARES	8 -
HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES	9 -
INTRODUCCIÓN.....	10-
UBICACIÓN TAXONÓMICA	11 -
MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	12 -
CICLO BIOLÓGICO DE <i>T. GONDII</i>	13 -
PROTEÍNAS DE LAS ORGANELAS RELACIONADAS CON LA FISIOLÓGÍA Y FUNCIÓN DE <i>T. GONDII</i> ..	16 -
RELACIÓN HOSPEDADOR / PARÁSITO	18 -
LA INFECCIÓN EN EL HOMBRE Y LOS ANIMALES.....	21 -
CONTROL Y PROFILAXIS	22 -
DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS	24 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30 -
A.ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS:	31 -
DISEÑO EXPERIMENTAL:	31 -
1º ETAPA: ELISA-RGRA7.....	31 -
2º ETAPA: ELISA-RGRA7 Y ELISA-TGSAG1.....	31 -
1.ELISA-RGRA7. EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA CON ANTÍGENO RECOMBINANTE RGRA7.	32 -
2. ELISA-TGSAG1. EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA CON ANTÍGENO PURIFICADO TGSAG1 (P30) DE ORIGEN NATIVO.....	34 -
3. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y LA ESPECIFICIDAD DE AMBAS PRUEBAS.	35 -
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO GENERAL.....	36 -
B.AISLAMIENTO DE <i>T. GONDII</i> Y ESTUDIOS MOLECULARES.	37 -
5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CERDOS DE FRIGORÍFICO.....	37 -

6. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA <i>T. GONDII</i> EN SUEROS Y/O JUGOS DE CARNE DE LOS ANIMALES MUESTREADOS.	38 -
7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CERDOS DE EXPLOTACIONES EXTENSIVAS PARA CONSUMO FAMILIAR.	39 -
8. INOCULACIÓN DE RATONES.	39 -
DISEÑO EXPERIMENTAL.	39 -
9. IDENTIFICACIÓN DE ADN PARA <i>T. GONDII</i>	41 -
10. GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE <i>T. GONDII</i>	43 -
RESULTADOS.....	45 -
A.ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS	46 -
EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA- RGRA7. CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS DE REFERENCIA:	46 -
EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA CON ANTÍGENO PURIFICADO TGSAG1 (P30) DE ORIGEN NATIVO: CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS DE REFERENCIA:	47 -
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD RELATIVAS DE LAS PRUEBAS DE ELISA:	47 -
ELISA-RGRA7:	47 -
ELISA-TGSAG1 (P30):	48 -
B.ESTUDIOS MOLECULARES.	48 -
INOCULACIÓN DE RATONES CON LOS TEJIDOS DE CERDOS SEROPOSITIVOS.	48 -
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CERDOS DE GRANJAS FAMILIARES C Y N.....	48 -
GENOTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>T. GONDII</i> AISLADAS DE CERDOS.	49 -
DISCUSIÓN	51 -
A.ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EN CERDOS.	51 -
B.ESTUDIOS MOLECULARES DE LA INFECCIÓN POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EN CERDOS.	54 -
TABLAS.....	58 -
FIGURAS.....	63 -
BIBLIOGRAFÍA	67 -
ANEXOS	74 -
ANEXO 1: TÉCNICAS UTILIZADAS EN LOS MÉTODOS SEROLÓGICOS.....	75 -
ANEXO 2: TÉCNICAS UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS MOLECULARES	94 -
ANEXO 3: TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL AISLAMIENTO	99 -

Título: “ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA INFECCIÓN POR *TOXOPLASMA GONDII* EN CERDOS.”

Palabras claves: *Toxoplasma gondii*, cerdos, ELISA-rGra7, ELISA-TgSAG1, aislamiento, genotipificación.

Resumen

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar dos pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos en cerdos naturalmente infectados con *Toxoplasma gondii*, así como también aislar y genotipificar cepas obtenidas a partir de cerdos de Argentina. Una de las pruebas de ELISA fue elaborada con un antígeno nativo TgSAG1 y otra con un antígeno recombinante rGra7. Para la evaluación de ambas pruebas se obtuvieron 602 sueros de cerdos para consumo y para realizar el ELISA-TgSAG1, de ese total se sortearon 300 al azar. Los sueros se analizaron por inmunofluorescencia indirecta (IFI) e *immunoblotting* (IB) para la detección de anticuerpos para *T. gondii*. Aquellos que resultaron serológicamente positivos y/o negativos para ambas pruebas, se utilizaron como estándar relativo de comparación (RSC) y se analizaron por los 2 ELISAs. Se determinó la concordancia y se evaluó la sensibilidad (S) y especificidad (E) utilizando la curva de “*receiver operator characteristic curve*” (ROC).

Se detectaron anticuerpos específicos para *T. gondii* en 160 de 300 sueros (53,3%) por IB, en 133 de 300 (44.3%) por IFI, y en 123 de 300 sueros (41%) por ELISA-TgSAG1 (P30).

Ciento once sueros de los 229 usados como RSC fueron seropositivos, y de ellos 103 resultaron positivos por ELISA-TgSAG1. De los 118 negativos para RSC, 116 fueron negativos por ELISA-TgSAG1. La concordancia entre los resultados obtenidos por RSC y ELISA-TgSAG1 fue excelente ($\kappa = 0,9124$; $p \geq 0,05$). El análisis ROC mostró un área bajo la curva (AUC) altamente precisa de 0,983 relativa a las RSC, se obtuvo una S de 92,8% y una E de 98,3%.

En una primera etapa al analizarse por ELISA-rGra7 160 sueros (IFI $\geq 1:25$) concordantes por RSC se obtuvo un valor κ de 0,2941 para RSC/ELISA-rGra7 y una S de 87,5% y una E de 55%. En una segunda etapa (IFI $\geq 1:50$) se analizaron los 229/300 sueros concordantes y se detectaron anticuerpos en 135/229 por ELISA-rGra7. Sin embargo 28/111 sueros positivos de los RSC no fueron detectados por esta prueba y por el contrario 52/118 sueros negativos del grupo RSC se identificaron como positivos. El valor de κ entre RSC y ELISA-rGra7 fue de 0,3051, siendo la S de 74,7% y la E de 55,9 %.

Se tomaron muestras de tejidos, suero y jugo de carne de cerdos ($n=122$) de frigorífico, y se analizaron por IFI. Se realizó la digestión péptica de los tejidos de los animales seropositivos seleccionados (33/48) y el producto de la digestión se inoculó en ratones por vía subcutánea. Si bien se detectaron anticuerpos específicos para *T. gondii* en 5/95 de los ratones inoculados, no se detectaron taquizoítos en el lavado peritoneal ni ADN específico por PCR. Dos aislamientos previos conservados en el laboratorio de Inmunoparasitología denominados PIG10 y PIG15 se

analizaron por PCR-RFLP para determinar su genotipo en relación a los marcadores 5'SAG2, 3'SAG2, BTUB, GRA6, SAG3, c22-8, L358, PK1, c29-2 y Apico. El aislamiento denominado PIG10 correspondió al genotipo II para todos los marcadores, mientras que el aislamiento PIG15 presentó alelos tipo II en todos los marcadores con excepción del marcador Apico, para el que correspondió al tipo I.

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible concluir que la prueba de ELISA-TgSAG1 es muy adecuada para la detección sensible y específica de anticuerpos en cerdos naturalmente infectados.

Luego de observar la baja concordancia obtenida para IFI/ ELISA-rGra7, IB /ELISA-rGra7 y con los RSC, se considera que la proteína recombinante rGra7 bajo las condiciones en que fue utilizada en este estudio, no permitiría detectar correctamente animales seropositivos y/o seronegativos. Esto podría relacionarse con la estructura de la proteína recombinante empleada, derivada del modelo de expresión procarionte o a la metodología utilizada para la purificación de la misma.

La imposibilidad de aislar *T. gondii* de los animales muestreados en este estudio, probablemente se deba a que la carga parasitaria presente en los tejidos no fue suficiente para infectar a los ratones inoculados, sin embargo, fue capaz de inducir respuesta inmune. De acuerdo a nuestro conocimiento esta es la primera vez que se realiza la tipificación por PCR-RFLP de cepas aisladas de cerdos en nuestro medio.

**Title: “IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES OF
TOXOPLASMA GONDII IN INFECTED PIGS”**

Keywords: *Toxoplasma gondii*, pigs, rGra7-ELISA, TgSAG1- ELISA, isolation, genotyping.

Abstract

The aims of this study were to evaluate two ELISA assays to detect antibodies against *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs and to isolate and to genotype pig strains from Argentina. One of the ELISAs was performed using the native surface antigen TgSAG1 and the other one was performed with the recombinant antigen rGra7. For the evaluation of both ELISAs, 602 pig sera were obtained from slaughtered swines and for TgSAG1-ELISA 300 sera were randomly selected. Serum samples were analyzed by indirect fluorescent antibody test (IFAT) and by immunoblotting (IB) for antibody detection. Those sera which were serologically positive and / or negative to both tests, were used as relative standard of comparison (RSC) and evaluated by the 2 ELISAs. Agreement was determined for all tests performed and ELISA's sensitivity (S) and specificity (E) was evaluated with “receiver operator characteristic curve” (ROC). Antibodies were detected in 160/300 sera (53.3%) by IB, in 133/300 (44.3%) by IFAT, and in 123/300 (41%) by TgSAG1-ELISA.

One hundred and eleven sera tested positive for RSC and 118 sera tested negative by both IFAT and IB (RSC); 103 of 111 positive RSC sera tested

positive by TgSAG1-ELISA, and 116 of 118 negative RSC tested negative. Agreement observed between RSC and TgSAG1-ELISA was almost perfect ($\kappa = 0.9124$, $p \geq 0.05$) and between IFAT and IB was moderate ($\kappa = 0.53$, $p \geq 0.05$). Relative sensitivity and specificity of the TgSAG1-ELISA using a cut-off index of 0.204 were of 92.8 % and 98.3 %, respectively. ROC analysis revealed a highly accurate area under curve (AUC) of 0.983 relative to the RSC.

As a first stage (RSC IB and IFI 1:25), antibodies to *T. gondii* were detected in 90/160 pig sera, κ value was 0.2941 for RSC/rGra7-ELISA with a **S** of 87.5% and an **E** of 55%. At a second stage 229 concordant sera from 300 randomly selected (RSC IB and IFI 1:50) were analyzed. Antibodies to *T. gondii* were detected in 135/229 by rGra7-ELISA. From 111 sera tested positive by RSC, 28 were not recognized by rGra7-ELISA, whereas, from 118 sera tested negative by RSC, 52 were identified as positive by rGra-ELISA. Agreement among RSC and rGra7-ELISA was low, $\kappa = 0.3051$, with a **S** of 74.7% and a **E** of 55.9%.

Tissues from slaughtered pigs ($n=122$) were sampled and antibodies were screened in sera and meat juice by IFAT. Positive samples were treated with pepsin digestion solution and inoculated subcutaneously in mice. Even though, antibodies were detected in 5/95 inoculated mice, *T. gondii* tachyzoites or specific DNA were not detected by peritoneal washings and PCR, respectively.

PIG 10 isolate was genotyped as type II for all selected markers (5'SAG2, 3'SAG2, BTUB, GRA6, SAG3, c22-8, L358, PK1, c29-2 y Apico), while

PIG 15 isolate was type I for Apico and type II for the rest of the allele markers.

According to the results, TgSAG1-ELISA was useful for detecting antibodies with high sensitivity and specificity to *T. gondii* in naturally infected pigs.

Due to the poor agreement observed between IFAT/rGra-ELISA, IB/rGra7-ELISA and the RSC, it is considered that the recombinant protein (rGra7) under the conditions used in this study could not be able to detect properly seropositive and/or seronegative animals. This fact could be related with the structure of the recombinant protein used, derived from a prokaryote *E. coli* expression system or to the methodology used for the purification.

It was not possible to isolate *T. gondii* from the pigs sampled in this study, probably because the parasite load in tissues was not enough to infect mice or to be detected by PCR, although humoral immune response was induced. According to our knowledge, this is the first report on *T. gondii* genotyping in domestic pigs from Argentina.

Objetivos generales

- Evaluar una prueba de ELISA elaborada con un antígeno recombinante rGra7 de *T. gondii* para el diagnóstico de la infección en cerdos para consumo.
- Evaluar una prueba de ELISA elaborada con un antígeno nativo TgSAG1 (P30) de *T. gondii* para el diagnóstico de la infección en cerdos para consumo.
- Aislar cepas de *T. gondii* de cerdos de la República Argentina y caracterizar las cepas aisladas previamente (PIG10 y PIG15) mediante técnicas moleculares.

Objetivos particulares

A- Estudios inmunológicos

- Obtener sueros de cerdos provenientes de granjas intensivas y extensivas.
- Detectar anticuerpos para *T. gondii* en sueros de cerdos naturalmente infectados mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por *immunoblotting* (IB).
- Identificar y seleccionar sueros serológicamente positivos y negativos a *T. gondii* por IFI e IB.
- Analizar los sueros seleccionados por ELISA-rGra7.
- Analizar los sueros seleccionados por ELISA-TgSAG1.

- Evaluar la sensibilidad y la especificidad de ambas pruebas de ELISA y la concordancia de estas con las pruebas de referencia.

B - Aislamiento de *T. gondii* y estudios moleculares

- Aislar *T. gondii* de muestras de lengua y diafragma cerdos de frigorífico.
- Detectar la presencia de ADN de *T. gondii* en las muestras de tejidos.
- Realizar la genotipificación de las cepas de *T. gondii* aisladas previamente de cerdos (PIG10 y PIG15) por la técnica de PCR-RFLP.

Hipótesis más relevantes

- La prueba de ELISA con antígeno rGra7 permite la detección de anticuerpos específicos para *T. gondii* en sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente.
- La prueba de ELISA con proteína nativa TgSAG1 (P30) permite la detección de anticuerpos específicos para *T. gondii* en sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente.
- Los cerdos en nuestro país están infectados por diferentes cepas de *T. gondii* que pueden ser caracterizadas por técnicas moleculares.

Introducción

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una zoonosis producida por *Toxoplasma gondii*, un protozoo del Phylum Apicomplexa de localización intracelular. Éste protozoo fue descrito por primera vez en el año 1908 por Charles Nicolle y Louis Manceaux en un roedor del norte de África, denominado gundi (*Ctenodactylus gundi*), y simultáneamente por Splendore, en Brasil, en conejos (Ferguson, 2009; Morrisette and Ajioka, 2009); ambos grupos de trabajo lo documentaron como una infección letal en conejos y gundis. El nombre *Toxoplasma gondii* fue propuesto por Nicolle y Manceaux (1909), basado en características morfológicas del parásito: *toxon* (*lat.*)=*arco*, *plasma*=*vida* y en el nombre del hospedador en que fuera descrito por primera vez (*gondii* por *C. gundi*).

Ubicación taxonómica (Beck et al., 2009)

Reino Protista

Subreino Protozoa

Phylum Apicomplexa (Levine 1970)

Clase Sporozoea (Leukart, 1879)

Orden Eucoccida (Leger, 1911)

Familia Sarcocystidae

Especie: *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909)

Morfología y biología de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii pertenece al Pylum Apicomplexa (Levine 1970) que incluye a todos aquellos protozoos que poseen un **Complejo Apical**. Éste consiste en un grupo de organelas ubicadas en el extremo anterior del parásito, que facilita la adhesión y/o penetración a la célula hospedadora a través de receptores de superficie y la liberación de proteínas (Dubey, 2010). Éste complejo está constituido por uno o más anillos polares electrodensos, un **conoide** formado por microtúbulos enrollados en espiral dentro del anillo polar, **roptrias** de forma tubular o sacular que se extienden hacia la región posterior por dentro del conoide, **micronemas** (250 x 50nm), **gránulos densos** (0,3µ de diámetro) y **microtúbulos subpeliculares**.

T. gondii posee un ciclo indirecto facultativo; los félidos domésticos (*Felis catus*) y silvestres (leopardo, chita, jaguar, ocelote, manul, etc.) son los únicos hospedadores definitivos, mientras que como hospedadores intermediarios pueden actuar los mamíferos, entre ellos el hombre, e incluso mamíferos marinos y las aves (Dubey, 2010). Algunos animales silvestres como los suricatas, marsupiales australianos y monos del Nuevo Mundo son altamente susceptibles a la infección debido a que evolucionaron alejados del hospedador definitivo (Basso et al., 2009; Moré et al., 2010; Quiroga et al., 2004) y son frecuentes los casos fatales.

Ciclo biológico de *T. gondii* (Fig. 1I)

Se conocen tres estadios del parásito: taquizoíto, bradizoíto y esporozoíto, que aparecen en diferentes etapas del ciclo biológico. Los **taquizoítos** (*tachos* (gr.) = rápido) con típica forma de medialuna son los estadios de multiplicación intracelular rápida (endodiogenia), miden aproximadamente $2 \times 6 \mu\text{m}$ y poseen un núcleo de posición central. Los **bradizoítos** (*brady* (gr.) = lento) desarrollan en el interior de un **quiste tisular**, miden aproximadamente $7 \times 1,5 \mu\text{m}$ y a diferencia de los taquizoítos, la posición del núcleo es terminal, las roptrias son más electrodensas y posee un mayor número de gránulos PAS positivos (Dubey et al., 1998). Los quistes tisulares pueden medir entre 10 y 100 μm , y pueden contener en su interior varios miles de bradizoítos. Los quistes tisulares poseen una pared delgada argirófila de $0,5\mu\text{m}$, se localizan preferentemente en órganos del sistema nervioso central y el ojo, donde son de forma esferoidal y en los músculos esquelético y cardíaco donde tienden a ser más elongados (Tenter et al., 2000). La formación de quistes tisulares coincide en general con el desarrollo de la respuesta inmune a partir de los 14 días pos infección. Los bradizoítos son resistentes a la acción de las enzimas digestivas, lo que permite la transmisión horizontal por carnivorismo.

Las principales formas de transmisión son la **vertical o transplacentaria** en la cual los taquizoítos atraviesan la placenta infectando al feto y la **horizontal** a través de la ingesta de tejidos infectados conteniendo

quistes tisulares o menos frecuentemente taquizoítos, o a través de la ingestión de ooquistes esporulados que contaminen el agua o el alimento. En los hospedadores definitivos, el ciclo biológico de *T. gondii* es intestinal y extraintestinal (**Fig 1I**). Luego de la ingestión de quistes tisulares se inicia el ciclo intestinal que consiste en la multiplicación asexual (5 tipos distintos A-E desarrollan antes de iniciar la gametogonia) y sexual (gametogonia) del parásito en los enterocitos. Éste ciclo concluye con la formación de los **ooquistes** inmaduros que bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad maduran en el medio ambiente transformándose en ooquistes maduros o esporulados (11x13µm) conteniendo en su interior dos **esporocistos** con cuatro **esporozoítos** cada uno de 2 x 8µm, infectantes para hospedadores intermediarios y definitivos.

Los **ooquistes esporulados** pueden permanecer viables en el medio por períodos de hasta 18 meses contaminando el suelo y las fuentes de agua (de Moura et al., 2006). El período prepatente en el gato es de 3-10 días y se prolonga aproximadamente por 7-20 días si la infección ocurre por la ingesta de quistes tisulares, y de 19 días o más si se produce por la ingesta de ooquistes (Dubey, 2010). Durante la fase extraintestinal los parásitos penetran en distintas células del organismo y se multiplican activamente como taquizoítos dentro de las vacuolas parasitóforas, en cuya formación intervienen las roptrias, los gránulos densos y la propia célula hospedadora, destruyendo a las células parasitadas y diseminándose dentro del hospedador. Pasado un período corto se

2011

transforman en bradizoítos, que se multiplican lentamente dentro de los quistes tisulares.

Fig. 1I: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

Proteínas de las organelas relacionadas con la fisiología y función de *T. gondii* (Fig.2I).

Las **roptrias** contienen proteínas que son secretadas por el parásito cuando éste se encuentra adherido a la célula hospedadora, que colaboran en la penetración celular y la formación de la vacuola parasitófora (VP). El contenido de las roptrias permite modificar la estructura proteica y lipídica de la membrana de la VP. Se diferencian en proteínas ROP (región del bulbo) y RON (región del cuello). La proteína Rop2 de 44kD anclaría la mitocondria del hospedador a la membrana de la VP (Mercier et al., 2005)

Las proteínas contenidas en los **micronemas**, se encuentran localizadas en el área más apical del parásito y actúan como adhesinas reconociendo receptores en el hospedador durante la invasión celular (Mercier et al., 2005)

Las proteínas de los **gránulos densos** pueden identificarse en taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos. Son secretadas dentro de la **VP** y colaboran con la creación de un medio ambiente favorable para la multiplicación del parásito en su interior. Estas proteínas acoplan la membrana del parásito a la VP permitiendo el intercambio con la célula hospedadora; se conservan durante la replicación y al momento del cambio de estadio de taquizoíto a bradizoíto participando en la formación del quiste tisular. Se conocen 10 proteínas presentes en los estadios de taquizoíto y bradizoíto, Gra1 a Gra8, dos isoformas de la nucleósido trifosfato hidrolasa y la ciclofilina 18 (Karsten et al., 1998) (Neudeck et al.,

2002). Se han caracterizado de acuerdo a su peso molecular y función en: Gra1 (taquizoíto) con un peso de 24 kDa que juega un rol importante en la regulación de los depósitos de calcio, Gra2 de 28,5 kDa que participaría junto con Gra5 de 21 kDa (Jenkins, 2001), Gra4 de 40 kDa (Mevelec et al., 1992) y Gra6 de 32kDa (Mercier et al., 2005) en la formación de la red tubulovesicular de gran importancia para la multiplicación intracelular del parásito (Weiss and Kim, 2007) y Gra7 de 29 kDa involucrada en la polimerización de los túbulos de la **VP**. Está comprobada la circulación de Gra7 a través de la pared del quiste tisular (Weiss and Kim, 2007), detectándose además en el estadio de merozoíto en el intestino del gato. Ha sido utilizada en estudios preliminares para el diagnóstico de toxoplasmosis en humanos y ratones (Gatkowska et al., 2006; Nigro et al., 2003). Gra7 genera un estímulo inmunológico constante en ratones con infección crónica (Neudeck et al., 2002). Las proteínas Gra1, Gra2, y Gra4 poseen epitopes que inducen una respuesta inmune celular (por linfocitos T) y humoral (por linfocitos B) y por lo tanto han sido utilizadas en estudios como antígenos diagnósticos.

Entre las proteínas de superficie se encuentran: SAG1 (P30) de 30 kDa que es considerada un antígeno inmunodominante de los taquizoítos, SAG2 de 22 kDa, SAG3 de 43 kDa (presente en taquizoítos y bradizoítos) y SRS3 de 35 kDa (Lekutis et al., 2001). Éstas proteínas serían las primeras en ponerse en contacto con las células y productos de la respuesta inmune del hospedador ya que son fundamentales en la invasión celular (Grimwood and Smith, 1995). La proteína SAG1 se

encuentra anclada a la membrana del parásito por los glucosifosfatidilinositoles (GPI); se ha considerado de importancia en la virulencia de las cepas de *T. gondii* ya que se expresa en altos niveles en cepas virulentas como la RH (Windeck and Gross, 1996). Ha sido utilizada en el diagnóstico serológico en ovinos (Sager et al., 2003) y caninos (Hosseininejad et al., 2009).

Fig. 2I: Ultraestructura de un taquizoíta de *T. gondii*.

Relación hospedador / parásito (Fig.3I)

En los parásitos protozoos la inmunidad celular tiene gran importancia debido a que, por su localización endocelular, la inmunidad humoral es poco efectiva. *T. gondii* puede sobrevivir dentro de las células dendríticas y macrófagos e incluso utilizar las propiedades migratorias de estas células para distribuirse dentro del hospedador (Tait and Hunter, 2009).

Cuando la infección ocurre por vía oral ingresa activamente en los enterocitos y éstos secretan óxido nítrico (ON) y otras citoquinas (MCP-1, MIP-1^a, MIP-1B) que atraen neutrófilos, macrófagos y células dendríticas al sitio de infección (Mennechet et al., 2004).

La respuesta inmune innata se inicia con el contacto de proteínas estructurales del parásito, como son las profilinas con los TLR 11 (*Toll like receptors* 11) de las células dendríticas o macrófagos del hospedador. También los GPI mencionados (Pollard et al., 2008), asociados a proteínas de la superficie del parásito como SAG1 o SAG2 y HSP70 (proteína del shock térmico) se unen a los TLR2 y TLR4. Estas proteínas pueden variar en sus niveles de expresión de acuerdo a la virulencia de las cepas. Por este mecanismo se induce la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) y la producción de citoquinas inflamatorias como la IL-12, el TNF α y el IFN γ (Blader and Saeij, 2009; Gazzinelli and Denkers, 2006). Las células dendríticas son las más eficientes productoras de IL-12 en la infección por este protozoo que estimula además la secreción de IFN γ por las células Th1 y NK, fundamentales para una respuesta inmune protectora (Miller et al., 2009). Sin embargo *T. gondii*, posee mecanismos capaces de bloquear la translocación del NF κ B lo que es importante en las cepas virulentas ya que de esta manera estaría favorecida su multiplicación (Lang et al., 2007). Los diferentes niveles de expresión de las proteínas ROP16 y ROP18, entre cepas, influye en la patogenicidad de las mismas. Por ejemplo las cepas del genotipo I producen mayores niveles de ROP 18 (Saeij et al., 2006).

El equilibrio entre la respuesta inmune del hospedador y los mecanismos de evasión de *T. gondii* le ha permitido a este protozoo desarrollar una infección crónica, que desde el punto de vista evolutivo benefició la supervivencia de éste parásito en una gran diversidad de hospedadores distribuidos mundialmente (Melo et al., 2011).

Fig. 3I: Respuesta inmune del hospedador frente a la infección de *T. gondii* por vía oral (Miller et al., 2009).

Referencias: CD (célula dendrítica inmadura), CDmadura (célula dendrítica madura), LTCD8+ (linfocito citotóxico), LTCD4+ (linfocito colaborador tipo 1), LIE (linfocitos intraepiteliales), ROI (reactivo tóxicos derivados del oxígeno), RNI (reactivos tóxicos derivados del nitrógeno).

La infección en el hombre y los animales

El hombre puede infectarse por el consumo de carne cruda o mal cocida principalmente de cerdo, ovino y cabra (Tenter et al., 2000) y de alimentos o agua de bebida contaminados con ooquistes. La infección puede cursar en forma subclínica, pero si ésta se produce durante el embarazo puede causar graves lesiones en los fetos como microftalmia e hidrocefalia; también es frecuente el desarrollo de encefalitis en pacientes inmunosuprimidos y la aparición de lesiones oculares (Weiss and Dubey, 2009). Estudios realizados en Argentina demostraron que el 47,3% de las mujeres embarazadas fueron seropositivas para *T.gondii*, siendo la seroprevalencia del 51,7% en la provincia de Buenos Aires, 42,2% en Santa Fe, 28,5% en Resistencia y 23,8% en la provincia de Chaco. La seroprevalencia general en hemodonantes del Hospital Alemán de la ciudad de Buenos Aires fue 67,4% en 1967, 42,5% en 1992, 39,4% en 1997 y 35% en 2002 (Durlach, 2008).

En los animales domésticos, según la especie, *T. gondii*, tiene grados variables de patogenicidad, causando abortos en ovejas y cabras (Unzaga et al., 1996).

Toxoplasmosis en cerdos

En el **cerdo** la enfermedad en general cursa en forma subclínica, pudiendo relacionarse con la presencia de natimortos y nacidos débiles (Dubey, 2010), (Venturini et al., 1999), (Venturini and Venturini, 2004). En Argentina Venturini y col (1999) detectaron un 1,35% y un 2,03% de transmisión prenatal de *T. gondii*, evaluada a través de la detección de

anticuerpos en los líquidos pleurales de los fetos abortados por IFI y MAT respectivamente (Venturini et al., 1999). En los casos en que se presentan signos clínicos, puede observarse tos, estornudos, fiebre, diarrea, incoordinación, temblores, aumento de tamaño de ganglios linfáticos incluso muerte cuando se encuentra asociado a circovirus porcino (Dubey, 2010; Klein et al., 2010; Wingstrand et al., 1997) . En infecciones experimentales se ha descrito la aparición de signos clínicos y excepcionalmente abortos (Jungersen et al., 1999). Existen reportes de abortos en cerdos naturalmente infectados en Taiwan (Dubey, 2010), Korea (Kim et al., 2009) y Brasil (Dubey, 2010).

Control y profilaxis

Sistemas de manejo y prevención

Las medidas de manejo implementadas en las explotaciones intensivas, incluyendo el control del acceso de felinos y roedores a las fuentes de alimento y agua, así como a las instalaciones, determinaron que en los últimos años disminuyera la prevalencia de la toxoplasmosis en cerdos (Dubey, 2010). Sin embargo, recientemente debido a las nuevas reglamentaciones sobre bienestar animal que se implementaron en países de Europa (Kijlstra et al., 2004; Kijlstra and Jongert, 2008) , se incorporaron sistemas de manejo en los que los cerdos se empezaron a criar en condiciones extensivas, permitiendo el mayor contacto de los animales con el suelo, que podría estar contaminado con ooquistes. En éstos sistemas, además se estaría favoreciendo un mayor contacto con

roedores que podrían estar infectados, posibilitando la infección de los cerdos y en consecuencia del hombre (Kijlstra et al., 2008).

En Estados Unidos la seroprevalencia para *T. gondii* observada en el período 1983-1984 fue de 23,9% en cerdos en terminación y del 42% en reproductores. En el año 1992 rondaba el 3,1% y el 20,8% en las respectivas categorías (Dubey et al., 1995). En los Países Bajos se realizó un estudio de seroprevalencia comparando sistemas de explotación porcina demostrando la existencia de un 4,7% de animales positivos en el sistema “friendly”. En éste último sistema de cría, llamado orgánico, los cerdos tienen acceso a espacios abiertos y por lo tanto se incrementan las posibilidades de contacto con posibles fuentes de infección. En ese mismo estudio no se detectaron seropositivos en los animales criados bajo condiciones tradicionales de sistema intensivo en confinamiento (Kijlstra et al., 2004). En Serbia durante el año 2007 la seroprevalencia fue del 8,3% en cerdos de terminación y de 30% en reproductoras (Klun et al., 2011). En Perú, se detectaron anticuerpos en 27,7% de los animales de frigorífico (IB) (Saavedra and Ortega, 2004). En Brasil existen numerosos reportes en diferentes regiones del país donde las prevalencias oscilan entre el 1,32% y el 37,5% (Azevedo et al., 2010).

Estudios realizados en cinco provincias argentinas demostraron anticuerpos para *T. gondii* del 37,8 % en hembras porcinas enviadas a faena (Venturini and Venturini, 2004). De acuerdo a lo expresado anteriormente, teniendo en cuenta esta información, sería importante implementar el control serológico rutinario de los cerdos de consumo, para

lo que es necesario desarrollar pruebas de diagnóstico serológico de mayor sensibilidad y especificidad que las disponibles, de menor costo y de mayor sencillez para su realización y lectura.

Diagnóstico de toxoplasmosis

El diagnóstico de la infección por *T. gondii* puede realizarse por métodos indirectos y directos. Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos para *T. gondii*, siendo una de las pruebas más difundidas la aglutinación directa con antígeno modificado (MAT) (Desmonts and Remington, 1980), que se ha utilizado para evaluar y comparar otras técnicas diagnósticas en desarrollo (Gamble et al., 2005; Hill et al., 2006) . La inmunofluorescencia indirecta (IFI) en la que se exponen antígenos de superficie, ha sido utilizada en numerosos estudios debido a su sensibilidad (Dubey, 2010); pruebas de aglutinación indirecta que utilizan fracciones de los taquizoítos adsorbidos en partículas de látex o glóbulos rojos, y pruebas de enzimoimmunoensayo (ELISA). En éstas últimas la preparación del antígeno puede tener diferentes características, utilizando taquizoítos enteros que exponen los epitopes de superficie (Dubey et al., 1995; Gamble et al., 2005; Hill et al., 2006) o bien destruídos por diferentes métodos, para exponer principalmente epitopes citoplasmáticos combinados en algunos casos con antígenos de membrana. La prueba de ELISA tiene sensibilidad variable, de acuerdo al tratamiento del antígeno, y ha tomado relevancia en los últimos años debido a su objetividad en la lectura y a la cantidad de muestras que es posible procesar

simultáneamente. Se han evaluado una gran variedad de antígenos recombinantes de *T. gondii* para su uso en las especies domésticas. En cerdos infectados experimentalmente se han probado las proteínas H11 (GRA4) y la H4, relacionándoselas con la detección de anticuerpos en infecciones recientes (Andrews et al., 1997). Esta proteína (rGra7) también se utilizó en animales de laboratorio (Gatkowska et al., 2006; Nigro et al., 2003).

Para producir proteínas recombinantes, se han clonado en *Escherichia coli* los genes que codifican proteínas de los gránulos densos, de las roptrias y proteínas de superficie (PI, SAG) (Gatkowska et al., 2006; Jenkins, 2001; Nigro et al., 2003). En el Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP se han llevado a cabo estudios preliminares de factibilidad con las proteínas recombinantes rGra4, rGra7, rPI y rROP2 que, en forma individual o asociadas se han utilizado para la detección de anticuerpos de animales infectados (Bacigalupe et al., 2005). Estudios realizados por Hosseinijad, M. y col 2009 utilizaron la proteína nativa TgSAG1 de *T. gondii* para la detección de anticuerpos en perros y Maksimov, P. y col. 2011 en patos y gansos. Esta proteína de PM 30 Kda, ha demostrado en perros una sensibilidad del 94.5% y especificidad del 93.6% (Hosseinijad et al., 2009; Maksimov et al., 2011). La unión europea recomendó recientemente en un documento referido a las enfermedades transmitidas por carne porcina el uso del antígeno TgSAG1 (P30) de origen nativo o recombinante en el diagnóstico en cerdos (Anon., 2011.).

El *Immunoblotting* (IB, inmunotransferencia) es una prueba empleada principalmente como prueba confirmatoria debido a su excelente especificidad y sensibilidad (Johnstone and Thorpe, 1987). Los antígenos pueden utilizarse en condiciones de reducción o de no reducción, es decir tratando o no con 2-mercaptoetanol, respectivamente. Éstos antígenos se corren en geles de poliacrilamida obteniendo un patrón de bandas de diferente peso molecular correspondientes a proteínas específicas del parásito. Se identifican como sueros de animales positivos, aquellos que reaccionan con proteínas específicas de *T. gondii* de peso molecular conocido, siendo las bandas más características las correspondientes a 13kDa, 22kDa, 30kDa (P30) y 42 kDa (Chávez-Velásquez et al., 2005; García et al., 2008; Silva et al., 2007; Wolf et al., 2005). Se ha reportado el uso de esta prueba diagnóstica en diferentes especies de animales domésticos y de laboratorio (Habib et al., 2011; Saavedra and Ortega, 2004; Sager et al., 2003; Silva et al., 2002).

Los métodos directos de diagnóstico pueden detectar directamente la presencia del parásito o de su ADN e incluyen las técnicas parasitológicas, histopatológicas y moleculares. Es posible identificar formas infectantes (quistes tisulares, taquizoítos) mediante observación microscópica en fresco de tejidos de animales infectados o de materia fecal (ooquistes) de felinos. La histopatología permite la observación de quistes tisulares y taquizoítos asociados o no a lesiones en sistema nervioso, músculo, hígado, pulmón y otros tejidos (Klein et al., 2010). La inmunohistoquímica permite la detección de diferentes estadios del

parásito en tejidos de animales infectados mediante la utilización de anticuerpos específicos (Dubey, 2010) y el diagnóstico diferencial con otros protozoos de morfología similar.

El aislamiento del parásito se puede realizar inoculando material proveniente de animales infectados en diferentes cepas de ratones de laboratorio o bien alimentando gatos para determinar la posible eliminación de ooquistes en la materia fecal (Dubey, 1998). También es posible realizar aislamientos en cultivos celulares (Dubey, 2010; Weiss and Kim, 2007). En nuestro grupo de trabajo se aisló *T.gondii* de cerdos para consumo con infección subclínica (Omata et al., 1994) y de cuadros clínicos de abortos en cabras y ovejas (Unzaga et al., 1996; Venturini et al., 2000), de conejos con signos nerviosos (Bacigalupe et al., 2011) y de infecciones agudas y letales en monos saimirí, suricatas y canguros de zoológico (Bacigalupe et al., 2008; Moré et al., 2010).

Los métodos moleculares utilizados en la identificación de ADN del parásito en tejidos de animales sospechosos se basan en la amplificación de segmentos de ADN mediante la técnica de PCR utilizando *primers* específicos, por ejemplo: B22-B23 (Bretagne et al., 1993), TOX4-TOX5, TOX5-TOX8 (Howe et al., 1997; Howe and Sibley, 1995). Mediante análisis genético por PCR-RFLP se determinó que la mayoría de las cepas aisladas en Europa y EE.UU. pertenecen a uno de 3 genotipos distintos: I, II y III (Lehmann et al., 2000). Éstos genotipos difieren en la patogenicidad observada en el modelo ratón siendo las tipo I 100% letales y las tipo II y III avirulentas. La mayoría de las cepas aisladas patógenas

para el ratón fueron del tipo I (Howe and Sibley, 1995), pero se desconoce si las diferencias en patogenicidad observadas en una especie animal se manifiestan en otras. En humanos se observó que el tipo II de *T. gondii* predomina en enfermos de SIDA y en infecciones congénitas (Howe et al., 1997), mientras que en infecciones oculares severas predomina el genotipo I, patógeno para ratón, o recombinantes de tipo I y III (Grigg et al., 2001),(Howe et al., 1997). En infecciones asintomáticas nunca se reportó el tipo I. Los datos acerca de la genotipificación y diferencias de patogenicidad en distintas especies animales son escasos, así como los aislamientos de cepas en América Latina. Nuestro grupo de investigación ha informado sobre la infección por *T. gondii* tipos I, II y III y genotipos recombinantes en diferentes especies domésticas y silvestres (Bacigalupe et al., 2008; Bacigalupe et al., 2011; Basso et al., 2009; Basso et al., 2007; Moré et al., 2011; Moré et al., 2010) (**Tabla 1I**).

Tabla 1I: Genotipos descritos en animales domésticos y silvestres de Argentina.

Cepa	Marcadores								
	SAG2	BTUB	GRA6	SAG3	PK1	L358	C22-8	C29-2	Apico
Canguro wallaby 1 (<i>Macropus rufrogriseus</i>)	III	III	III	III	III	III	III	I	III
Canguro wallaby 2 (<i>Macropus rufrogriseus</i>)	III	III	III	III	III	III	III	I	III
Suricata1 (<i>Suricata suricatta</i>)	III	III	III	III	III	III	III	III	III
Suricata 2 (<i>Suricata suricatta</i>)	III	III	III	III	III	III	III	III	III
Mono saimiri (<i>Saimiri boliviensis</i>)	III	III	III	III	III	III	III	III	III
Canguro 08/2 (<i>Macropus rufus</i>)	III	III	III	III	III	III	III	III	III
Canguro 08/3 (<i>Macropus giganteus</i>)	II	II	II	II	II	II	II	II	II
Conejo 10/1 (<i>Ornitolagus cuniculus</i>)	III	III	III	III	III	III	III	III	III
Gallina N21 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	III	III	III	III	III	III	II	III	III
Gallina C24 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	III	III	III	III	III	III	I	III	III
Gallina C25 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	III	III	III	III	III	III	I	III	III
Gallo colorado P (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	III	III	III	III	III	III	III	III	III
Gallina 11/9 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	III	III	III	III	I	I	I	I	I
Gallina 11/12 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	III	III	III	III	I	I	I	I	I
Cabra 4 (<i>Capra hircus</i>)	III	II	III	III	III	I	III	III	III

Aislamientos de *T. gondii* de animales domésticos y silvestres de Argentina conservados y genotipificados en el laboratorio de Inmunoparasitología (Bacigalupe et al., 2008; Bacigalupe et al., 2011; Basso et al., 2009; Basso et al., 2007; Moré et al., 2011; Moré et al., 2010).

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Estudios inmunológicos:

Diseño experimental:

1ª etapa: ELISA-rGra7

2ª etapa: ELISA-rGra7 y ELISA-TgSAG1

1.ELISA-rGra7. Evaluación de la prueba de ELISA con antígeno recombinante rGra7.

Con el fin de obtener un panel de sueros control para evaluar un ELISA utilizando el antígeno recombinante rGra7 (cedido por el Dr. Sergio Angel, INTECH, Chascomús, Argentina) se realizó la detección de anticuerpos para *T. gondii* en 602 sueros porcinos, 330 provenientes de reproductores y 272 de cerdos en terminación mediante las pruebas de **IFI** e **IB**. Se consideraron positivos a aquellos sueros con título **IFI** ≥ 25 y a aquellos que por **IB** (ver anexo 1, protocolo laboratorio de Inmunoparasitología) demostraron reactividad frente a la banda de PM 30 kDa (P30, TgSAG1). En una primera etapa se seleccionaron 160 sueros concordantes por IFI e IB en una proporción de 1 positivo cada 3 negativos (Anon., 2005). Estos sueros fueron utilizados como estándares relativos de comparación (**RSC**) (Anon., 2009) y fueron evaluados mediante el ELISA-rGra7. Se utilizaron además como control, sueros de cerdos naturalmente infectados.

En una segunda etapa se analizaron por ELISA-rGra7 300 sueros seleccionados al azar del total de 602 considerándolos positivos por **IFI** con un título ≥ 50 y se tomaron los mismos criterios considerados previamente para el análisis por **IB**. Se tomaron los 229 sueros concordantes para ambas pruebas (RSC) y se analizaron por ELISA-rGra7.

Prueba de ELISA con antígeno recombinante rGra7

Se procedió brevemente, como se indica a continuación:

Antígeno rGra7: Fue elaborado y cedido por el Dr. Sergio Ángel, INTECH, Chascomus, Argentina proveniente de proteínas (rGra7) de *T. gondii* clonadas en vectores de expresión procariontes (*Escherichia coli*).

Se sensibilizaron microplacas de 96 pocillos (Nunc ImmunoPlate- Maxi Sorp) con 100µl/ pocillo de antígeno rGra7 diluido en buffer de bicarbonato pH 9,6 en una concentración de 5µg/ml, se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon con leche descremada al 3% en *buffer* de fosfatos (PBS) más Tween 20 0,2% (PBS-T). Las muestras y los controles se diluyeron 1:25 en PBS y se incubaron a 37°C durante 1h. Todas las muestras y los controles se hicieron por duplicado. Luego de 5 lavados con PBS-T se agregaron 100µl/pocillo de conjugado anti-pig IgG con peroxidasa diluido 1:1000. Se incubó a 37°C/1h. Luego de 5 lavados con PBS-T se agregaron 100µl/pocillo de la solución buffer del sustrato + sustrato + cromógeno (ácido cítrico 0,1M + fosfato ácido disódico 12H₂O 0,2M, pH 5; H₂O₂: (30%) 0,01% y ABTS (2,2'-azino- bis (3-ethylbenzthiazoline 6sulphonic acid) 0,03% en solución de *buffer* del sustrato). Se incubó 7 min. en oscuridad y se midieron las densidades ópticas en un lector de ELISA (Labssystem Multiscan MS) con un filtro de 405nm. Las densidades ópticas (OD) obtenidas se normalizaron de acuerdo a la siguiente fórmula: (Promedio OD muestra – Promedio OD control negativo)/ (Promedio OD control positivo – Promedio OD control negativo).

2. ELISA-TgSAG1. Evaluación de la prueba de ELISA con antígeno purificado TgSAG1 (P30) de origen nativo.

Se seleccionaron al azar 300 sueros de un total de 602 correspondientes a porcinos reproductores y de terminación (**ver punto 1**) mediante el programa Microsoft Excel. Los sueros se evaluaron por IFI, IB, y ELISA con el antígeno nativo TgSAG1 (P30) (**ELISA-TgSAG1**). Los sueros evaluados por la prueba de IFI se consideraron positivos a una dilución ≥ 50 . Se formó el panel de sueros RSC con el criterio mencionado anteriormente y se comparó con el ELISA.

El protocolo y el antígeno para la prueba de IB fueron provistos por el Dr. Gereon Schares (ver anexo 1, protocolo FLI). Los sueros se consideraron positivos cuando se detectaron la proteína P30 (30kDa, TgSAG1) y al menos una de las bandas de un peso molecular de 22 y/o 42 kDa basado en la reactividad observada en los controles positivos de animales experimentalmente infectados (Figura 1). Para la prueba de ELISA-TgSAG1 se utilizaron controles positivos y negativos por IFI e IB provenientes de cerdos experimentalmente infectados.

Prueba de ELISA con antígeno TgSAG1

La prueba de ELISA-TgSAG1 (P30) fue desarrollada durante la pasantía realizada en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigación en Salud Animal Friedrich-Loeffler (FLI) en Wusterhausen, Alemania.

Se procedió brevemente como se indica a continuación:

Antígeno nativo TgSAG1 (P30):

El antígeno TgSAG1 (P30) fue elaborado y cedido por el Dr. Gereon Schares (FLI) (Hosseininejad et al., 2009).

Se sensibilizaron microplacas de ELISA (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Germany [Polysorb]) con 12 ng/pocillo de antígeno nativo de *T. gondii* TgSAG1 diluido en 0,1M de bicarbonato de sodio pH 8,3 a 37°C/1h. Los sueros se diluyeron 1:100 en PBS-T 0,05% con 20% de suero equino y se incubaron a 37°C por 30 min. Todas las muestras y controles se realizaron por duplicado. Luego de 3 lavados con PBS-T 0,05%, se agregaron 100µl/pocillo de conjugado anti-pig IgG con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, USA) diluido 1:4000 y se incubó a 37°C por 30 min. Antes del paso final se realizaron 3 lavados con PBS y dos lavados con agua destilada. Se incubó con el buffer del sustrato (0,004% H₂O₂ en acetato de sodio 0,2 M y ácido cítrico 0,2 M y TMB 100 µg/ml 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine) a 37°C. La reacción se interrumpió luego de 15 min. con ácido sulfúrico 2N. Las OD se midieron en un lector de ELISA Sunrise™ (TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany) a 450 nm (filtro de referencia: 620 nm). Las OD se normalizaron como se describió para ELISA-rGra7.

3. Evaluación de la sensibilidad y la especificidad de ambas pruebas.

Para determinar la sensibilidad (S) y especificidad (E) relativas de las pruebas de ELISA-rGra7 y ELISA-TgSAG1 se utilizó el programa MedCalc 8.01.0 y el programa R-program environment (packages “graphics” and “stats”) (R version 2.13.1 (2011-07-08); Copyright 2011; The R Foundation

for Statistical Computing; ISBN 3-900051-08-9; <http://CRAN.R-project.org/>) respectivamente. El valor de corte se evaluó mediante la curva de ROC (*receiver-operating characteristic*).

Utilizando un valor de corte arbitrario se puede distinguir un área bajo la curva (AUC) de ROC clasificada como: no informativa (AUC = 0,5), poco precisa (AUC 0,51 - 0,7), moderadamente precisa (AUC 0,71 - 0,9), altamente precisa (AUC 0,91- 0,99) y prueba perfecta (AUC = 1) (Swets, 1988).

4. Análisis estadístico general.

La concordancia, κ , entre las pruebas serológicas se obtuvo mediante el programa Epidat 3.1. Los valores de kappa se interpretaron de acuerdo a Conraths y Schares 2006 (tabla 1 M) (Conraths and Schares, 2006).

Tabla 1 M: Valores de concordancia (κ)

0,00	pobre
0,00–0,20	débil
0,21–0,40	aceptable
0,41–0,60	moderada
0,61–0,80	muy buena
>0,81	excelente

B. Aislamiento de *T. gondii* y estudios moleculares.

5. Obtención de muestras de cerdos de frigorífico.

Se realizaron seis visitas a frigoríficos porcinos de la provincia de Buenos Aires con el fin de obtener muestras de suero, diafragma y lengua de cerdos para consumo en el período comprendido entre marzo de 2008 y abril de 2010. Las categorías seleccionadas fueron cerdas reproductoras adultas y cachorras provenientes preferentemente de granjas intensivas a campo o intensivas en confinamiento. Se muestrearon un total de 122 animales obteniendo un total de 244 muestras de tejidos correspondientes a 50 g de diafragma y 50 g de lengua por cada animal. En el momento del sacrificio se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante durante el degüello para la obtención de suero (n=82). El mismo se fraccionó en tubos de 1,5 ml y se conservó refrigerado (2– 8°C) por 24 hs hasta su análisis por la prueba de IFI. Posteriormente se conservó a -20°C.

En los casos en que no fue posible obtener sangre se procedió posteriormente a obtener jugo de carne (n=40). Se colectó el jugo contenido en los tubos donde se conservaron las muestras de lengua y diafragma o bien se congelaron a -20°C en tubos de 1,5ml, fracciones de músculos de los animales muestreados y luego de 24hs se descongelaron a temperatura ambiente para obtener el líquido exudado.

Se realizaron *pools* de 50grs de diafragma y lengua y se conservaron en recipientes estériles de 50 ml (tubos Falcon) refrigerados entre 2-8°C para

utilizar como inóculo en ratones y obtener aislamientos de *T. gondii* de los mismos.

Fragmentos de 2 x 2 mm de diafragma y lengua se separaron con bisturíes individuales para cada muestra y se conservaron en tubos de 1,5ml (Eppendorf) a -20 °C para análisis moleculares.

Fragmentos de tejido (lengua y diafragma) de 2 x 2 cm se conservaron en formol bufferado 10% para procesar por histopatología las muestras positivas por PCR o aislamiento.

6. Detección de anticuerpos para *T. gondii* en sueros y/o jugos de carne de los animales muestreados.

Examen serológico de los cerdos muestreados para inocular ratones:

Las muestras de suero obtenidas se analizaron mediante la prueba de IFI para determinar la presencia de anticuerpos IgG específicos para *T. gondii*, a partir de una dilución de 1:25. En los casos en que no se dispuso de suero se utilizó jugo de carne a partir de una dilución 1:10. (Prueba de IFI ver Anexo 1).

Luego del examen serológico, los tejidos (diafragma y lengua) de los animales seleccionados que resultaron seropositivos (Título IFI ≥ 50) fueron inoculados en ratones exocriados (Swiss, N:NIH) para intentar el aislamiento del parásito.

7. Obtención de muestras de cerdos de explotaciones extensivas para consumo familiar.

Durante el mes de julio de 2010 se visitaron dos granjas de cría familiar extensiva en la localidad de Las Flores, Buenos Aires: las cuáles se denominaron granjas “N” y “C” utilizando las letras iniciales de los apellidos de los propietarios. Se sangraron 22 lechones en la granja N y 10 lechones en la granja C. A partir de los sueros obtenidos se realizó la prueba de IFI para detectar animales seropositivos. Dado que en ambas granjas se habían identificado gallinas y pollos parrilleros con anticuerpos específicos para *T. gondii* por IFI e IB y se habían realizado aislamientos del parásito, se seleccionaron y conservaron 2 animales de cada granja durante dos meses y se planificó el sacrificio y muestreo de los mismos. Antes del sacrificio, se sangraron nuevamente y se seleccionó uno de cada granja de acuerdo al título de anticuerpos (**Tabla 3**). Se realizó la necropsia y se tomaron muestras de cerebro (SNC), lengua y corazón y se tomó sangre al momento del degüello.

8. Inoculación de ratones.

Diseño experimental: Se utilizaron 2 cepas de ratones para la inoculación de los tejidos digeridos. Ratones Swiss (N:NIH) para los tejidos provenientes de cerdos de frigorífico y de granjas familiares. Ratones GKO IFN gamma para la inoculación de los tejidos provenientes de los cerdos de las granjas familiares.

Aislamiento de T. gondii en ratones inoculados con tejidos de cerdos

Muestras de tejidos:

Cerdos de frigorífico

Pooles de 50 g de diafragma y lengua de cerdos muestreados que resultaron seropositivos por IFI (n=33/48) se procesaron por la técnica de digestión péptica modificada por J.P. Dubey (Dubey, 1998). Se inocularon 2-3 ratones Swiss (N:NIH) hembras de 30g (procedentes del Bioterio de la FCV, UNLP) por cada muestra. Los ratones se mantuvieron con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*. Los animales inoculados se observaron procediendo como se indica en el Anexo 3 (Aislamiento de *T. gondii* en ratones).

Cerdos de granjas familiares N y C.

Se inocularon 9 ratones Swiss-N:NIH por cada uno de los cerdos (n=2) seleccionados; 3 ratones con un *pool* de lengua y diafragma, 3 con cerebro y 3 con corazón. Además se inocularon 3 ratones GKO IFN gamma con un *pool* de los órganos antes mencionados del cerdo de la granja “C” y 2 con un *pool* de la misma composición del cerdo de la granja “N”.

Cepas previamente aisladas: PIG10 y PIG15

Por otra parte se utilizaron dos aislamientos de *T. gondii* realizados en ratones a partir de la inoculación de material de diafragma obtenido de cerdos de frigorífico de la provincia de Bs. As. que fueron denominados PIG 10 y PIG 15 (Omata et al., 1994), mantenidos en el Laboratorio de Inmunoparasitología (FCV, UNLP) mediante pasaje en ratones.

Para el mantenimiento de las cepas previamente aisladas se procedió como se indica en el Anexo 3 (Aislamiento de *T. gondii* en ratones).

9. Identificación de ADN para *T. gondii*.

Extracción de ADN de T. gondii en tejidos de cerdos de frigorífico y en ratones:

Se realizó la extracción de ADN total de las muestras de lengua de los cerdos de frigorífico seropositivos (**Tabla 7**) y cerebros de los ratones inoculados seropositivos (**Tabla 8**) con un kit comercial DNAeasy®Tissue Kit QIAGEN de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se realizó el sacrificio de los ratones inoculados con las cepas PIG10 y PIG15, se obtuvieron quistes de cerebro y se extrajo el ADN con el mismo kit comercial utilizado para las muestras de cerdos de frigorífico.

El ADN obtenido se conservó congelado a -20°C hasta su utilización.

PCR para T. gondii:

Se realizó la amplificación mediante PCR de las muestras de ADN extraídas utilizando independientemente 3 juegos de *primers* específicos para *T. gondii*: *primers* B22/B23 (Bretagne et al., 1993) para el gen B1, TOX4-TOX5 (Homan et al., 2000) y TOX5 -TOX8 (Reischl et al., 2003) para la secuencia repetitiva TOX de *T. gondii*.

PCR utilizando primers B22/B23: (Bretagne et al., 1993).

Un µl de ADN genómico de cada muestra se agregó a los tubos que contenían el *master mix* conteniendo 2,5 µl de 10× PCR buffer (Fermentas Life Sciences), 200 µM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 0,75 U de *Taq*

DNA polimerasa (Fermentas Life Sciences) y 0,4 μ M de cada primer en un volumen final de reacción de 25 μ l. Para la amplificación se utilizó un termociclador (PCR Sprint Thermo Electron Corporation) con un programa de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos con desnaturalización (94 °C; 30 s), hibridación (*annealing*) (60 °C; 30 s) y extensión (72 °C; 60 s) y un paso de extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1,5% y se visualizaron luego de una electroforesis utilizando SyBR safe (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Como referencia para comparar el tamaño de los amplificados se utilizó un marcador de pares de bases (Ladder cada 50 bp, 50-500, O'Range ruler, Fermentas Life Sciences).

PCR utilizando primers TOX5-TOX8 y TOX4-TOX5.

Se utilizó un programa que incluye un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos con desnaturalización (94 °C; 60 s), hibridación (*annealing*) (60 °C; 60 s) y extensión (72 °C; 60 s) y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se visualizaron como se describió previamente (Ladder cada 100bp, 100-1000).

10. Genotipificación de cepas de *T. gondii*.

Las muestras de ADN que fueron positivas por PCR se caracterizaron genéticamente utilizando los marcadores 5'SAG2, 3'SAG2, BTUB, GRA6, SAG3, c22-8, L358, PK1, c29-2 y Apico de *T. gondii* mediante técnicas de PCR anidada (*nested*-PCR) seguida por cortes con enzimas de restricción (RFLP) siguiendo el procedimiento descrito en (Basso et al., 2009). Como controles de referencia para los tipos clonales I, II and III de *T. gondii* se utilizó ADN extraído de taquizoítos de las cepas de referencia RH, Me49 y NED de *T. gondii* respectivamente, mantenidas en cultivos celulares. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio. Para estimar el tamaño de los amplificados, junto con las muestras se utilizó un marcador de PM (Ladder cada 100bp DNA, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) (ver anexo 2).

Figura 1 M: Marcadores utilizados como referencia para tipificar molecularmente aislamientos de *T. gondii*.

Resultados

RESULTADOS

A. Estudios inmunológicos

Evaluación de la prueba de ELISA- rGra7. Concordancia entre las pruebas de referencia:

La concordancia entre la IFI y el IB fue de $\kappa = 0.7554$ (muy buena) para los 195 sueros analizados. A partir de estos sueros se obtuvieron los 160 RSC para la evaluación, en una primera etapa, de la prueba de ELISA-rGra7 (**Tabla 1**). De los 160 sueros seleccionados como RSC que se utilizaron para analizar el ELISA-rGra7 se obtuvieron 90/160 sueros positivos (valor de corte= 0,1671 índice), 35 concordantes con los 40 RSC positivos. Sin embargo 55 de 120 negativos por RSC resultaron positivos por ELISA-rGra7 (**Tabla 2**).

En una segunda etapa también se analizaron para rGra7 los 229 sueros RSC obtenidos al azar para la evaluación de la prueba de ELISA-TgSAG1. Se detectaron anticuerpos en 135/229 de los sueros considerados RSC por ELISA-rGra7 (valor de corte= 0,1671 índice). Sin embargo 28/111 sueros positivos de los RSC no fueron detectados por el ELISA-rGra7 y por el contrario 52/118 sueros negativos del grupo RSC se identificaron como positivos por este ELISA (**Tabla 3**).

La concordancia entre las pruebas de IB/IFI, IB/ELISA-rGra7, IFI/ELISA-rGra7 se muestra en la **tabla 4**, siendo bajos los valores para ELISA-rGra7 sobre las 300 muestras analizadas.

Evaluación de la prueba de ELISA con antígeno purificado TgSAG1

(P30) de origen nativo: Concordancia entre las pruebas de referencia:

Se detectaron anticuerpos específicos para *T. gondii* en 160 de 300 sueros (53,3%) por **IB**, en 133 de 300 (44.3%) por **IFI**, y en 123 de 300 (41%) por **ELISA-TgSAG1 (P30)**.

Doscientos veintinueve sueros demostraron concordancia por IFI e IB. Ciento once sueros fueron seropositivos para RSC, 103 sueros de 111 RSC resultaron positivos por ELISA-TgSAG1 (P30). De 118 negativos por RSC, 116 fueron negativos por este ELISA (**Tabla 5**). La concordancia entre las RSC y ELISA-TgSAG1 (P30) fue excelente (Kappa 0,9124).

Cuarenta y nueve de 300 sueros fueron positivos por IB y no por IFI, 22 sueros fueron positivos por IFI y no por IB, la concordancia entre las pruebas fue moderada. Los valores de kappa obtenidos entre estas pruebas se muestran en la **tabla 6**.

Sensibilidad y Especificidad relativas de las pruebas de ELISA:

ELISA-rGra7:

La **S** y **E** relativas para la prueba de **ELISA-rGra7** se evaluó con 160 sueros RSC (IFI ≥ 25) siendo la **S** de 87,5% y la **E** de 55%. Se determinó como valor de corte un índice de 0,1672. Para la segunda etapa donde se evaluaron 229 RSC (IFI ≥ 50) se obtuvo una **S** de 74,7 % y una **E** de 55,9 %.

ELISA-TgSAG1 (P30):

La **S** y **E** relativas para la prueba de **ELISA- TgSAG1 (P30)** evaluada sobre los 229 sueros concordantes por **IFI** e **IB** fueron 92,8 % y 98,3 %, respectivamente, utilizando un valor de corte de: índice= 0,204 obtenido por análisis ROC como se explicó previamente y también se reveló una AUC de 0,983 en relación a las técnicas usadas como RSC considerada muy buena (Fig. 2).

B. Estudios moleculares.**Inoculación de ratones con los tejidos de cerdos seropositivos.**

Cinco de noventa y cinco ratones inoculados con tejidos provenientes de 33/48 cerdos presentaron títulos positivos para *T. gondii* (IFI ≥ 25) (**Tabla 8**). No se observaron parásitos (taquizoítos o quistes) en los lavados peritoneales o exámenes en fresco del cerebro de los ratones inoculados.

Las muestras de cerebro de los ratones seropositivos fueron negativas por PCR utilizando los *primers* B22-23, TOX4-5 y TOX5-8.

Obtención de muestras de cerdos de granjas familiares C y N.

Los resultados serológicos del primer muestreo de los animales de las granjas familiares C y N determinaron 4/10 y 7/22 animales seropositivos, respectivamente.

No se detectó seroconversión para *T. gondii* en ninguno de los ratones inoculados.

Genotipificación de las cepas de *T. gondii* aisladas de cerdos.

Se determinó que el aislamiento de *T. gondii* denominado PIG 10 corresponde al genotipo II para todos los marcadores seleccionados, mientras que el aislamiento PIG 15 presentó alelos tipo II en todos los marcadores con excepción del marcador Apico, para el que correspondió al tipo I (**Tabla 9**).

Discusión

DISCUSIÓN

A. Estudios inmunológicos de la infección por *Toxoplasma gondii* en cerdos.

El antígeno de superficie de 30kDa (TgSAG1) de *T. gondii* purificado por cromatografía de afinidad usado en la prueba de ELISA-TgSAG1 demostró ser de utilidad para la detección de anticuerpos para este protozoo en cerdos naturalmente infectados.

Se encontró una excelente concordancia cuando se compararon los resultados obtenidos por el ELISA-TgSAG1 con los sueros considerados RSC. La concordancia fue moderada a muy buena para IFI/ ELISA-TgSAG1 (P30), IFI/IB y IB/ELISA-TgSAG1 (P30).

Estudios previos desarrollaron un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos en perros con esta proteína nativa (TgSAG1, P30) (Hosseininejad et al., 2009). En ese estudio se encontró una buena sensibilidad (94,5%) y especificidad (93,6%) usando IFI como prueba de referencia. En nuestro estudio, además de IFI, se desarrolló paralelamente IB con el fin de obtener un panel de sueros positivos o negativos para ser utilizados como RSC. Saavedra y Ortega (Saavedra and Ortega, 2004), usaron IB como prueba diagnóstica en cerdos de frigorífico, identificándolos como positivos cuando reaccionaron con las bandas de peso molecular de 30 kDa, correspondiente a TgSAG1 el antígeno de superficie considerado en el presente estudio. El IB combina la alta resolución de la electroforesis en geles de poliacrilamida con la sensibilidad y especificidad del enzimoimmunoensayo (Johnstone and

Thorpe, 1987). Magi y Migliorini observaron que el IB fue más sensible que el ELISA para determinar anticuerpos en infecciones congénitas (Magi and Migliorini, 2011) y García y col. (2008) reportaron que el IB fue capaz de detectar IgG para *T. gondii* en humor acuoso más eficientemente que la IFI y la prueba de MAT (García et al., 2008). Estos hallazgos sugieren que el IB representa una herramienta serológica muy sensible y podría explicar porque esta prueba detectó un mayor número de sueros positivos comparado con las otras técnicas. Por otro lado, la interpretación del IB no es sencilla ya que los sueros de los animales no infectados reconocen algunas bandas no específicas de los antígenos elaborados con taquizoítos. Por eso se seleccionaron las bandas de 22, 30 y 42kDa detectadas por el suero de un cerdo experimentalmente infectado.

El uso de este antígeno proteico de superficie, TgSAG1, permite la detección de anticuerpos desde el comienzo de la infección, ya que induce una importante respuesta inmune humoral (Lekutis et al., 2001). Además, estudios recientes en ovinos determinaron que el ELISA-TgSAG1 permitió discriminar entre infecciones agudas y crónicas de acuerdo al incremento de la avidéz de la IgG (Sager et al., 2003). Según Dubey (2009) es necesaria la estandarización de los antígenos y de los valores de corte utilizados en las pruebas de ELISA empleadas para la detección de anticuerpos en sueros de cerdos, ya que existe un gran número de pruebas disponibles siendo difícil la comparación de los resultados obtenidos. (Dubey, 2009).

La sensibilidad y especificidad obtenidas por la curva de ROC, 92,8 % y 98,3 %, respectivamente determinaron que la prueba de ELISA indirecta con antígeno nativo sería de gran utilidad para la detección de anticuerpos en cerdos naturalmente infectados.

Luego de observar la baja concordancia obtenida para IFI/ ELISA-rGra7, IB /ELISA-rGra7 se considera que la proteína recombinante rGra7 en las condiciones en que fue utilizada en este estudio, no detectaría correctamente los anticuerpos presentes en los sueros porcinos analizados, dado que 28/111 sueros detectados positivos por el grupo RSC no fueron detectados por el ELISA-Gra7 y por el contrario 52/118 sueros negativos en el grupo RSC dieron resultados positivos.

Esto podría relacionarse con la estructura de la proteína recombinante utilizada, derivada del modelo de expresión del sistema procarionte de *E.coli*, que no realizaría las modificaciones postraduccionales de la misma manera que *T. gondii* (Graille et al., 2005) o bien con el método utilizado para su purificación. Los resultados obtenidos en este estudio durante la evaluación de la prueba de ELISA-rGra7 no coinciden con los hallazgos descriptos por Nigro y col. en humanos y Gatkowska y col. en ratones (Gatkowska et al., 2006; Nigro et al., 2003).

B. Estudios moleculares de la infección por *Toxoplasma gondii* en cerdos.

Aunque se detectaron anticuerpos específicos para *T. gondii* en los sueros/jugos de carne de los cerdos seleccionados para el aislamiento en ratones, no se detectó ADN del parásito en los tejidos porcinos analizados por PCR utilizando los tres pares de *primers* específicos utilizados. Si bien 5 de 95 ratones inoculados con tejidos de cerdos seropositivos resultaron positivos por IFI, no se detectó ADN por la técnica de PCR en los cerebros de los mismos. Éstos hallazgos coinciden con los de Hill y col. (2006), García y col. (2006, 2008) y Tsutsui y col. (2007) que al comparar las técnicas de PCR, histopatología y bioensayo concluyeron que la PCR y la histopatología eran poco sensibles para la detección de quistes tisulares, con respecto al aislamiento del parásito (Dubey, 2009). En este estudio, probablemente la carga parasitaria presente en los tejidos de los cerdos no fue suficiente para infectar a los animales inoculados, pero sin embargo fue capaz de inducir respuesta inmune humoral. También podría deberse al modelo utilizado para el aislamiento y al número de ratones utilizados. Otros autores como Belfort- Neto y col. (2007) detectaron altos porcentajes de ADN del parásito en muestras de lengua y diafragma por PCR e incluso realizaron la caracterización molecular por SAG2, BTUB, SAG3 y GRA6 identificando genotipos atípicos pero no pudieron aislar parásitos viables en ratones deficientes para IFN γ y concluyendo que la carga parasitaria, del mismo modo que en este estudio no era suficiente para infectarlos (Belfort-Neto et al., 2007). En Estados Unidos, con el fin

de aumentar las probabilidades de efectuar aislamientos, se alimentaron gatos con mayores cantidades de carne (500 g versus 50 g) obteniendo resultados favorables (Dubey, 2009).

Estudios realizados en Argentina demostraron que la seroprevalencia para *T. gondii* en cerdos destinados al consumo, estimada en 63,3% en 1994 (Omata et al., 1994), diez años después había disminuído al 37,8% (Venturini et al., 2004). En la actualidad podría haber un menor riesgo de infección de los animales, dadas las mejoras incorporadas en los últimos años en las instalaciones y sistemas de manejo en la producción porcina. Esto podría relacionarse con la imposibilidad de realizar aislamientos de los animales utilizados para tomar muestras en este estudio.

Las cepas de cerdos caracterizadas molecularmente en este trabajo, pertenecieron al genotipo II, de baja patogenicidad en el modelo ratón. Se asemejan genotípicamente, a las cepas tipificadas en Estados Unidos en donde también se encontró mayormente el Tipo II (56% de los 182 aislamientos) para un grupo de 10 marcadores, de los cuáles 9 fueron los mismos utilizados en este estudio (Velmurugan et al., 2009). En Brasil, en cambio, se identificaron los genotipos I y III en dos y cinco aislamientos respectivamente que resultaron letales para el ratón en todos los casos (de Dos Santos et al., 2005), pero es importante considerar que en ese estudio solo se utilizó como marcador molecular el locus SAG2. De acuerdo a nuestro conocimiento esta es la primera vez que se tipifican por PCR-RFLP cepas de cerdos de nuestro país. Sin embargo, dado que estas cepas se habían conservado en el Laboratorio, y ante la

imposibilidad de realizar nuevos aislamientos, no es posible concluir que éste sea el único genotipo presente. Esto podría variar en otras regiones del país y de acuerdo al tipo de explotación, por lo que sería importante realizar un relevamiento a nivel nacional tanto de explotaciones porcinas como de otras especies domésticas.

Tablas y figuras

TABLAS

TABLAS ELISA-rGra7

Tabla 1: Distribución de sueros positivos y negativos por IFI e IB considerados RSC para la prueba de ELISA-rGra7.

		IFI (≥ 25)		
		Positivos	Negativos	Total
IB	Positivos	52	20	72
	Negativos	1	122	123
Total		53	142	195

$\kappa=0,7554$ (muy buena); $p \geq 0,05$.

Tabla 2: Resultados de las muestras analizadas por la prueba de ELISA-rGra7 en relación con los 160 RSC (IB, IFI ≥ 25) considerados inicialmente

		ELISA-rGra7		
		Positivos	Negativos	Total
RSC	Positivos	35	5	40
	Negativos	55	65	120
Total		90	70	160

$\kappa=0,2941$ (aceptable); $p \geq 0,05$; S: 87, 5%, E: 55%.

Tabla 3: Resultados de las muestras analizadas por la prueba de ELISA-rGra7 en relación con los 229 RSC (IB, IFI ≥ 50) de los 300 sueros seleccionados al azar.

		ELISA-rGra7		
		Positivos	Negativos	Total
RSC	Positivos	83	28	111
	Negativos	52	66	118
Total		135	94	229

$\kappa=0,3051$ (aceptable); $p \geq 0,05$; S: 74,7 %, E: 55,9 %.

Tabla 4: Concordancia (Kappa) observada sobre 300 sueros seleccionados al azar entre IB, IFI, y ELISA-rGra7.

	IB	IFI (≥ 50)
IFI (≥ 50)	0,53*	
ELISA-rGra7	0,2127 [#]	0,2519 [#]

$\kappa=*,^{\#}$ $p \geq 0,05$. * moderada; [#] aceptable.

TABLAS ELISA-TgSAG1 (P30)**Tabla 5:** Muestras concordantes por la prueba de ELISA-TgSAG1 (P30) en relación con RSC (IB, IFI ≥ 50) resultados.

		ELISA-TgSAG1 (P30)		
		Positivos	Negativos	Total
RSC	Positivos	103	8	111
	Negativos	2	116	118
Total		105	124	229

$\kappa=0,9124$ (excelente); $p \geq 0,05$; S: 92,8%, E: 98,3%

Tabla 6: Concordancia (Kappa) observada sobre 300 sueros seleccionados al azar entre IB, IFI y ELISA-TgSAG1 (P30).

	IB	IFI (≥ 50)
IFI (≥ 50)	0,53*	
ELISA-TgSAG1	0,66 [#]	0,73 [#]

$\kappa=*,^{\#} p \geq 0,05$. * moderada; [#] muy buena

Tabla 7: Detección de anticuerpos específicos para *T. gondii* en sueros y jugos de carne de cerdos de frigorífico utilizados para inocular ratones.

Nº de Muestreo	Número de animales	Animales seropositivos IFI ≥ 25	Animales seropositivos jugo de carne. IFI ≥ 10
1	10	10	
2	23	23	
3	20	12	
4	29	1	
5	20		2
6	20		0
Total	122	46	2

Tabla 8: Detección de anticuerpos específicos para *T. gondii* en los ratones inoculados con material de cerdos de frigorífico en 6 muestreos.

Nº de muestreo	Nº de muestras inoculadas	Nº de ratones inoculados	Ratones seropositivos	Resultado del aislamiento
1	10	25	0	0
2	10	30	1 ^a	0
3	10	30	1 ^a	0
4	1	4	2 ^b	0
5	2	6	1 ^b	0
6	0	0	0	0
Total	33	95	5	0

^a dilución 1:25; ^b dilución 1:100.

Tabla 9: Genotipificación de los aislamientos de *T. gondii* de cerdos de frigorífico.

Aislamientos	Marcador genético (cromosoma)								
	nSAG2 (VIII)	SAG3 (XII)	BTUB (IX)	GRA6 (X)	c22-8 (Ib)	c29-2 (III)	L358 (V)	PK1 (VI)	Apico
Tipo I (RH)	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Tipo II (ME49)	II	II	II	II	II	II	II	II	II
Tipo III (NED)	III	III	III	III	III	III	III	III	III
PIG10	II	II	II	II	II	II	II	II	II
PIG15	II	II	II	II	II	II	II	II	I

Genotipificación por la técnica de PCR-RFLP de los aislamientos de *T. gondii* de cerdos de frigorífico, conservados por pasaje en ratón en el laboratorio de Inmunoparasitología .

FIGURAS

Figura 1: Proteínas detectadas por la prueba de *immunobloting* con sueros de cerdos naturalmente infectados.

La flecha negra indica la banda de 30 kDa (P30), las flechas grises indican las bandas de 22, 42kDa consideradas específicas para *T. gondii* detectadas en el control positivo (membrana 50) y en las muestras de suero Membranas 1-48: sueros de animales naturalmente infectados. Marcador de peso molecular (PM: 14,4; 20,1; 30; 45; 66; 97kDa).

Figura 2: Sensibilidad y especificidad relativas de la prueba de ELISA-TgSAG1 para diferentes valores de corte por análisis TG-ROC

*El valor de corte seleccionado fue un índice de OD= 0,204 para asegurar una especificidad relativa > 98% (indicado con línea de puntos).

Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de los ADNs obtenidos a partir de muestras de cerdos (*primers* B22-B23).

PCR utilizando los *primers* B22-B23 de *T.gondii*. 1-14 muestras de diafragma de cerdos de frigorífico. La flecha verde (15) indica el control positivo de 115pb, control negativo (16), marcador de peso molecular (17) (cada 50pb, 50-500).

Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de los ADNs obtenidos a partir de muestras de cerdos (*primers* TOX5-TOX8).

PCR utilizando los *primers* Tox5-Tox8, 1-14 muestras de diafragma de cerdos de frigorífico, la flecha verde indica el control positivo de 429pb (15), control negativo (16), marcador de peso molecular (17) (cada 100pb, 100-1000). Gel de agarosa 1,5%.

Figura 5: PCR –RFLP de los aislamientos PIG10 y PIG15 para el marcador SAG3.

PCR – RFLP para SAG3, 1: PIG10; 2: PIG15; 3: RH; 4: ME49, 5: NED. Pb: marcador de peso molecular (cada 100pb). Gel de agarosa 3%.

Figura 6: PCR –RFLP de los aislamientos PIG10 y PIG15 para el marcador APICO.

PCR – RFLP para APICO, 1: PIG10; 2: PIG15; 3: RH; 4: ME49, 5: NED. Pb: marcador de peso molecular (cada 100pb). Gel de agarosa 3%.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, C.D., Dubey, J.P., Tenter, A.M., Webert, D.W., 1997. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens H4 and H11: use in ELISAs for detection of toxoplasmosis in swine. *Vet. Parasitol.* 70, 1-11.
- Anon. 2005. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. PART 1. SECTION I.1.3 (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE).
- Anon. 2009. Principles and Methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In OIE Terrestrial Manual p. pp18.
- Anon. 2011. Scientific Report of the European Food Safety Authority (EFSA) - Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for public health hazards to be covered by meat inspection of swine. In EFSA Journal pp. 2371, 2125pp.
- Azevedo, S.S., Pena, H.F., Alves, C.J., Guimarães Filho, A.A., Oliveira, R.M., Maksimov, P., Schares, G., Gennari, S.M., 2010. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 80-84.
- Bacigalupe, D., Quiroga, M.A., Basso, W., Unzaga, J.M., Moré, G., Pardini, L., Larsen, A., Venturini, L., Venturini, M.C., 2008. Toxoplasmosis aguda en *Saimiri boliviensis* In: III Congreso Latinoamericano de Zoonosis. VI Congreso Argentino de Zoonosis. Asociación Argentina de Zoonosis (AAZ). Buenos Aires, Argentina, p. 37.
- Bacigalupe, D., Unzaga, M.F., Moré, G., Unzaga, J.M., Piscopo, M.V., Petruccelli, M.A., Venturini, M.C., 2011. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from *Oryctolagus cuniculus* in Argentina. In: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 2011, Buenos Aires, Argentina, August 2011, p. Poster session R.
- Bacigalupe, D., Venturini, M., Venturini, L., Angel, S., Gazzotti, J., Basso, W., Unzaga, J., Machuca, M., 2005. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in pigs using a recombinant antigen. In: XX International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Nueva Zelanda.
- Basso, W., Moré, G., Quiroga, A., Pardini, L., Bacigalupe, D., Venturini, L., Valenzuela, M.C., Balduchi, D., Maksimov, P., Schares, G., Venturini, M.C., 2009. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*). *Vet. Parasitol.* 61, 201-206.
- Basso, W., Venturini, M.C., Moré, G., Quiroga, A., Bacigalupe, D., Unzaga, J.M., Larsen, A., Laplace, R., Venturini, L., 2007.

- Toxoplasmosis in captive Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Argentina. *Vet. Parasitol.* 144, 157-161.
- Beck, H.P., Blake, D., Darde, M.L., Felger, I., Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrilo, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., Weir, W., 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol.* 39, 175-189.
- Belfort-Neto, R., Nussenblatt, V., Rizzo, L., Muccioli, C., Silveira, C., Nussenblatt, R., Khan, A., Sibley, L.D., Belfort, R., Jr., 2007. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79, 111-114.
- Blader, I.J., Saeij, J.P., 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* 117, 458-476.
- Bretagne, S., Costa, J.M., Vidaud, M., Tran, J., Nhieu, V., Fleury-Feith, J., 1993. Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *J. Infect. Dis.* 168, 1585-1588.
- Conraths, F.J., Schares, G., 2006. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Vet. Parasitol.* 136, 91-98.
- Chávez-Velásquez, A., Alvarez-García, G., Gómez-Bautista, M., Casas-Astos, E., Serrano-Martínez, E., Ortega-Mora, L., 2005. *Toxoplasma gondii* infection in adult llamas (*Lama glama*) and vicunas (*Vicugna vicugna*) in the Peruvian Andean region. *Vet. Parasitol.* 130, 93-97.
- de Dos Santos, C.B., de Carvalho, A.C., Ragozo, A.M., Soares, R.M., Amaku, M., Yai, L.E., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from Sao Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 131, 207-211.
- de Moura, L., Bahia-Oliveira, L.M., Wada, M.Y., Jones, J.L., Tuboi, S.H., Carmo, E.H., Ramalho, W.M., Camargo, N.J., Trevisan, R., Graça, R.M., da Silva, A.J., Moura, I., Dubey, J.P., Garrett, D.O., 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 326-329.
- Desmonts, G., Remington, J.S., 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 11, 562-568.
- Dubey, J.P., 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.* 74, 75-77.
- Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164, 89-103.
- Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev. 11, 267-299.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P., Powell, E.C., 1995. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. Am. J. Vet. Res. 56, 1030-1036.
- Durlach, R., 2008. Consenso argentino de toxoplasmosis congénita. Medicina (Buenos Aires) 68, 75-87.
- Ferguson, D.J.P., 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem. Int. Oswaldo Cruz 104, 133-148.
- Gamble, H.R., Dubey, J.P., Lambillotte, D.N., 2005. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. Vet. Parasitol. 128, 177-181.
- García, J.L., Gennari, S.M., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Headley, S.A., Vidotto, O., da Silva Guimaraes Junior, J., Monteiro Bugni, F., Igarashi, M., 2008. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs, and immunoblotting for the detection of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humor samples from experimentally infected pigs. Res. Vet. Sci. 84, 237-242.
- Gatkowska, J., Hiszczynska-Sawicka, E., Kur, J., Holec, L., Dlugonska, H., 2006. *Toxoplasma gondii*: An evaluation of diagnostic value of recombinant antigens in a murine model. Exp. Parasitol. 114, 220-227.
- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nature reviews Immunology AOP (advance on-line publishing).
- Graille, M., Stura, E.A., Bossus, M., Muller, B.H., Letourneur, O., Battail-Poirot, N., Sibai, G., Gauthier, M., Rolland, D., Le Du, M.H., Ducancel, F., 2005. Crystal structure of the complex between the monomeric form of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. J. Mol. Biol. 354, 447-458.
- Grigg, M.E., Ganatra, J., Boothroyd, J.C., Margolis, T.P., 2001. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 184, 633-639.
- Grimwood, J., Smith, J.E., 1995. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. Int. J. Parasitol. 26, 169-173.
- Habib, H.S.M., Ali, N.M., El-kadery, A.A.S., Soffar, S.A., Razek, M.G.A., 2011. Sequential recognition of antigenic markers of *Toxoplasma gondii* tachyzoite by pooled sera of mice with experimental toxoplasmosis. Parasitol. Res. 108, 151-160.
- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P., Lunney, J.K., Gamble, H.R., 2006. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in

- naturally and experimentally infected swine. Vet. Parasitol. 141, 9-17.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int. J. Parasitol. 30, 69-75.
- Hosseininejad, M., Azizi, H.R., Hosseini, F., Schares, G., 2009. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. Vet. Parasitol. 164, 315-319.
- Howe, D.K., Honore, S., Derouin, S., Sibley, L.D., 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 35, 1411-1414.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J. Infect. Dis. 172, 1561-1566.
- Jenkins, M., 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance Vet. Parasitol. 101 291-310.
- Johnstone, A., Thorpe, R., 1987, Immunochemistry in practice, Second Edition Oxford, Great Britain 306 p.
- Jungersen, G., Jensen, L., Riber, U., Heegaard, P.M., Petersen, E., Poulsen, J.S., Bille-Hansen, V., Lind, P., 1999. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. Int. J. Parasitol. 29, 1307-1319.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C.J.M., Reddy, A., Dubremetz, J.F., Webster, P., Joiner, K.A., 1998. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms The Journal of Cell Biology 141, 1323-1333.
- Kijlstra, A., Eissen, O.A., Cornelissen, J., Munniksmä, K., Eijck, I., Kortbeek, T., 2004. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. Invest Ophthalmol Vis Sci 45, 3165-3169.
- Kijlstra, A., Jongert, E., 2008. Toxoplasma -safe meat: close to reality? Cell.
- Kijlstra, A., Meerburg, B., Cornelissen, J., De Craeye, S., Vereijken, P., Jongert, E., 2008. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. Vet. Parasitol. 156, 183-190.
- Kim, J.-H., Kang, K.-I., Kang, W.-C., Sohn, H.-J., Jean, Y.-H., Park, B.K., Kim, Y., Kim, D.-Y., 2009. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. J Vet Sci. 10, 147-151.
- Klein, S., Wendt, M., Baumgärtner, W., Wohlsein, P., 2010. Systemic Toxoplasmosis and Concurrent Porcine Circovirus-2 Infection in a Pig. J. Comp. Path. 142, 228-234.
- Klun, I., Vujanic, M., Nikolic, A., Ivovic, V., Bobic, B., Bradonjic, S., Dupouy-Camet, J., Djurkovic-Djakovic, O., 2011. *Toxoplasma*

- gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. Vet. Res. 42, 1-6.
- Lang, C., Gross, U., Lüder, C.G.K., 2007. Subversion of innate and adaptive immune responses. Parasitol. Res. 100, 191-203.
- Lehmann, T., Blackston, C.R., Parmley, S.F., Remington, J.S., J.P. Dubey, 2000. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen coding and housekeeping genes. J. Parasitol. 86, 960-971.
- Lekutis, C., Ferguson, J., Grigg, M., Camps, M., Boothroyd, J., 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. Int. J. Parasitol. 31, 1285-1292.
- Magi, B., Migliorini, L., 2011. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. New. microbiol. 34, 93-95.
- Maksimov, P., Buschtöns, S., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Görlich, K., Tenter, A.M., Dubey, J.P., Nagel-Kohl, U., Thoms, B., Bötcher, L., Kühned, M., Schares, G., 2011. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. Vet. Parasitol. (in press), doi: 10.1016/j.vetpar.2011.1005.1049.
- Melo, M.B., Jensen, K.D.C., Saeij, J.P.J., 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. Trends in Parasitol. 27, 487-495.
- Mennechet, F., Kasper, L., Rachinel, N., Minns, L.A., Luangsay, S., Vandewalle, A., Buzone-gatel, D., 2004. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. Eur. J. Immunol. 34, 1059-1067.
- Mercier, C., Adjogble, K.D.Z., Däubener, W., Delauw, M.F.C., 2005. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? . Int. J. Parasitol. 35, 829-849.
- Mevelec, M.N., Chardès, T., Mercereau-Pujalon, O., Bourguin, I., Achbarou, A., Dubremetz, J.F., Bout, D., 1992. Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 56, 227-238.
- Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J., Smith, N.C., 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 39, 23-39.
- Moré, G., Maksimov, P., Pardini, L., Herrmann, D.C., Bacigalupe, D., Maksimov, A., Basso, W., Conraths, F.J., Schares, G., Venturini, M.C., 2011. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. Vet. Parasitol. in press.
- Moré, G., Pardini, L., Basso, W., Machuca, M., Bacigalupe, D., Villanueva, M.C., Schares, G., Venturini, M.C., Venturini, L., 2010. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. Vet. Parasitol. 169, 57-61.
- Morrisette, N.S., Ajioka, J.W., 2009. The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. Int. J. Parasitol. 39, 865-869.

- Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichman, G., Fischer, H.G., 2002. Expression variances, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein Gra7. *Microbes and Infection* 4, 581-590.
- Nigro, M., Gutierrez, A., Hoffer, A.M., Clemente, M., Kaufer, F., Carral, L., Martin, V., Guarnera, E.A., Angel, S.O., 2003. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 609-613.
- Omata, Y., Dilorenzo, C., Venturini, C., Venturini, L., Igarashi, I., Saito, A., Suzuki, N., 1994. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. *Vet. Parasitol.* 51, 205-210.
- Pollard, A.M., Onatulu, K.N., Hiller, L., Haldar, K., Knoll, L.J., 2008. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol- anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 173, 2725-2735.
- Quiroga, M.A., Venturini, M., Venturini, L., Bacigalupe, D., Origlia, J., Idiart, J., 2004. Toxoplasmosis sistémica en un mono saimiri (*Saimiri boliviensis*) del jardín zoológico de La Plata. In: IV Reunión Argentina de Patología Veterinaria, p. 62.
- Reischl, U., Bretagne, S., Kruger, D., Ernault, P., Costa, J.M., 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* 3, 7.
- Saavedra, G.M., Ortega, Y.R., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from slaughterhouses in Lima, Peru and Georgia, USA. *J. Parasitol.* 90, 902-904.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., Boothroyd, J., 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314, 1780-1783.
- Sager, H., Gloor, M., Tenter, A., Maley, S., Hassig, M., Gottstein, B., 2003. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol. Res.* 91, 171-174.
- Silva, D.A.O., Lobato, J., Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., 2007. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 143, 234-244.
- Silva, N.M., Lourenco, E.V., Silva, D.A.O., Mineo, J.R., 2002. Optimisation of Cut-off Titres in *Toxoplasma gondii* Specific ELISA and IFAT in Dog sera using Immunoreactivity to SAG-1 antigen as Molecular marker of infection. *The Veterinary Journal* 163, 94-98.
- Swets, J.A., 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240, 1285-1293.
- Tait, E.D., Hunter, C.A., 2009. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 201-210.

- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30, 1217-1258.
- Unzaga, J., Venturini, L., Lizziero, M., Venturini, M., Lorenzo, C.D., Bacigalupe, D., 1996. Abortos en cabras por *Toxoplasma gondii*. In: XI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico., Azul, Argentina, p. Póster 16.
- Velmurugan, G.V., Su, C., Dubey, J.P., 2009. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. J.Parasitol. 95, 95-99.
- Venturini, L., Unzaga, J., Basso, W., Bacigalupe, D., Venturini, M., Ramos, M.C., Machuca, M., Lacchini, R., 2000. *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*: su relación con abortos en cabras. . In: Congreso Argentino de Parasitología, Mar del Plata. Argentina., p. 485.
- Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Venturini, L., Machuca, M., Perfumo, C.J., Dubey, J.P., 1999. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stillborn piglets in Argentina. Vet. Parasitol. 85, 331-334.
- Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Venturini, L., Rambeaud, M., Basso, W., Unzaga, J.M., Perfumo, C.J., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and an outdoor farm in Argentina. Vet. Parasitol. 124, 161-165.
- Venturini, M.C., Venturini, L., 2004. La toxoplasmosis en medicina veterinaria, In: Cacchionre, D., Larghi. (Ed.) Temas de zoonosis II. Asociación Argentina de Zoonosis, pp. 305-311
- Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int. J.Parasitol. 39, 895-901.
- Weiss, L.M., Kim, K. 2007 *Toxoplasma gondii* The model apicomplexan: perspectives and methods, Kim, L.M.W.a.K., ed. (Elsevier Ltd.), p. 800.
- Windeck, T., Gross, U., 1996. *Toxoplasma gondii* strain specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. Parasitol. Rese.arch 82, 715-719.
- Wingstrand, A., Lind, P., Haugegaard, J., Henriksen, S.A., Bille-Hansen, V., Sorensen, V., 1997. Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Vet. Parasitol. 72, 129-140.
- Wolf, D., Schares, G., Cardenas, O., Huanca, W., Cordero, A., Bärwald, A., Conraths, F.J., Gauly, M., Zahner, H., Bauer, C., 2005. Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicuñas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. Vet. Parasitol. 130, 81-87.

Anexos

Técnicas utilizadas

ANEXOS

Anexo 1: Técnicas utilizadas en los métodos serológicos

Solución fisiológica (CINa al 0,85 %)

CINa..... 0,85 g
Agua destilada..... 100 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Solución buffer de fosfatos (P.B.S.)

Solución madre

Cloruro de sodio (NaCl)..... 40 g
Cloruro de potasio KCl)..... 1 g
Di-sodio hidrogeno fosfato(Na_2HPO_4).....5,75 g
Potasio di-hidrogeno fosfate.. (KH_2PO_4) 1 g
Agua destilada..... 500 ml

Solución de trabajo: utilizar la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final será de 7,2.

Cultivo de células VERO (células de riñón de mono verde africano) para la elaboración de antígeno para IFI.

Materiales utilizados: Medio RPMI 1640 con glutamina (PAA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, PAA) para crecimiento o 3% SFB para mantenimiento y con 1 % de antibiótico (penicilina- estreptomycin) PAA y antimicótico (anfotericina B).

Botellas de cultivo, 25 cm (Cellstar)

Procedimiento

- Descongelar una ampolla de células VERO conservada en nitrógeno líquido, colocar en una botella de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio RPMI. Una vez observada la formación de una monocapa:
- Eliminar el medio de la botella .
- Agregar PBS pH 7,2 y enjuagar, eliminar el PBS.
- Agregar 2,7 ml de PBS y 0,3 ml de Tripsina- EDTA sol. 10 x (5 g de tripsina/l 1:250, 2g EDTA/l) e incubar a 37° 30 min.
- Una vez desprendidas las células completar hasta 5 ml con RPMI.
- Colocar 1 ml de esa suspensión en cada nueva botella de cultivo con 5 ml de medio con 10 % de SFB colocado previamente.
- Incubar a 37° bajo una atmósfera con 5 % de CO₂.
- Las células deben multiplicarse una vez por semana. En dos a cinco días puede estar formada la monocapa.

Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI):

*Preparación del antígeno para inmunofluorescencia indirecta para *T. gondii*:*

- Infectar una botella de cultivo con 1 millón de taquizoítos de la cepa RH de *T.gondii*
- Recolectar el sobrenadante de la botella infectada donde se observe que los taquizoítos han roto el 80% de la monocapa celular y traspasar a un tubo de centrifuga.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante, resuspender en PBS y volver a centrifugar. Repetir la operación tres veces.
- Inactivar los taquizoítos con 1 % de formol e incubar en heladera durante 15 minutos. Lavar con PBS tres veces, centrifugando y resuspendiendo el culot cada vez.
- Suspender los taquizoítos en PBS en una dilución aproximada de 10^7 taquizoítos/ml.
- Colocar 10 µl de la suspensión en cada pocillo del portaobjetos y secar a temperatura ambiente.
- Conservar a -20° C.

Procedimiento:

- Realizar las diluciones del suero en PBS (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, etc.)

- Incubar el antígeno con el suero problema a 37 °C durante 30 minutos.
- Lavar con PBS 10 minutos.
- Incubar con el conjugado anti-especie específica (Anti IgG de cerdo, Sigma) 30 minutos a 37 °C.
- Lavar con PBS.
- Montar con glicerina al 10 % en PBS.
- Observar con microscopio de fluorescencia.

Preparación del antígeno para la prueba de *immunoblotting* (inmunotransferencia).

Sonicado de taquizoítos de la cepa RH

- Se toman los stock de taquizoítos congelados a -20 °C en una concentración de 6×10^7 taquizoítos/ml en solución fisiológica.
- Se descongelan a temperatura ambiente y se colocan en un tubo de 15 ml.
- El tubo con la suspensión de taquizoítos se sumerge en un vaso de precipitado con hielo y se somete a sonicado (30 ciclos discontinuos a potencia 3 durante 30 segundos, 5 veces en total; y 2 veces más a 80 ciclos a potencia 3 durante 30 segundos).
- Luego se observa una gota al microscopio óptico para confirmar la ruptura de los parásitos.

Medición de la concentración proteica del lisado de taquizoítos (kit comercial Bio-Rad protein assay)

- Preparar tres a cinco diluciones del testigo (albúmina bovina)
- Cargar 160 µl de cada dilución del testigo y de las muestras .en los pocillos de la microplaca.
- Agregar 40 µl del reactivo a cada pocillo. Mezclar por agitación o por pipeteo.
- Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se puede extender la incubación, pero no se debe exceder más de una hora.
- Medir la densidad óptica de los pocillos en un lector de ELISA a 595 nm.

Concentración de proteínas para la preparación del antígeno de immunoblotting (inmunotransferencia) por acetona y frío.

Luego de tomar una fracción del lisado de taquizoítos para su análisis por el kit de BIO Rad (medición de la concentración de Proteína)

- Se toma una parte de la solución con el lisado de taquizoítos y se mezcla con 4 partes de acetona (1:5).
- La mezcla se lleva a freezer a -80°C durante 60 minutos.
- Luego se centrifuga la mezcla durante 10 minutos a 10000 RPM
- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet obtenido en buffer de muestra para electroforesis en una concentración de 2mg/ml.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (protocolo utilizado en el laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP).

Soluciones stock

Todas las soluciones se preparan con agua tridestilada.

A) Acrilamida- Bisacrilamida (30-08)

Acrilamida.....30 g
Bis acrilamida.....0,8 g
Agua c.s.p.....100 ml

Preparar en vaso de precipitado o Erlenmeyer graduado; agitar hasta disolución, retirar el imán y completar el volumen. Guardar a 4° C protegida de la luz.

B) Buffer Tris-ClH 1,5 M pH 8,8

Tris.....18,15 g
HCl c.s.p.....pH 8,8
Agua c.s.p.....100 ml

Disolver el Tris en la mitad del volumen final de agua. Ajustar el pH con HCl puro, retirar el imán y completar el nivel de agua indicado. Guardar en frascos rotulados y guardar a 4° C.

C) Buffer Tris-ClH 0,5 M pH 6,8

Tris.....3 g
ClH c.s.p.....pH 6,8
Agua c.s.p....50 ml

Disolver el Tris en la mitad del volumen final de agua en un erlenmeyer o vaso de precipitado con imán. Ajustar el pH al valor indicado, retirar el imán y completar el volumen con agua. Guardar en frasco rotulado a 4° C.

D) SDS al 10 %

Disolver 10 g de SDS en 50 ml de agua en Erlenmeyer con agitación, y si es necesario en Baño María a 50° C aproximadamente. Completar el volumen con agua. Guardar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

E) APS al 10%

Se prepara en el momento de usar.

Se disuelven 0,02 g de persulfato de amonio en 200 µl de agua.

La droga pura se guarda en heladera.

F) Buffer de corrida, concentración 10x

Tris.....	30,2 g
Glicina.....	144 g
SDS.....	10 g
Agua c.s.p.....	1000 ml

Solución de trabajo: Utilizar diluída la solución madre en una proporción 1:10 para su uso en la electroforesis (100ml solución 10X + agua c.s.p. 1000ml)

G) Azul de bromofenol 0,10 %

10 mg de la droga en 10 ml de agua

H) Buffer de muestra (S. B.)

Para condiciones reductoras:

Tris- ClH 1 M pH 6,8	6,25 ml
SDS	2,3 g
2- mercaptoetanol	5 ml

Glicerina	10 ml
Azul de Bromofenol 0,3 %	1 ml
Agua destilada c.s.p.	50 ml

Conservar en heladera. Utilizar 1:1 o 1:5 con la muestra. Si se desean condiciones no reductoras se reemplaza el 2- mercaptoetanol por agua.

Técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE)

Se utilizó una cuba de electroforesis de la marca Bio-Rad para realizar todo el procedimiento.

A) Gel de corrida o resolving gel

Se puede utilizar en diferentes concentraciones según el tamaño de la molécula a correr.

12 %

Acrilamida-bis (30-08)	4 ml
Tris- ClH pH 8,8	2,5 ml
Agua	3,17 ml
SDS 10%	200 µl
APS	150 µl
TEMED	10 µl

La mezcla se prepara en un vaso de precipitado con imán y se agita suavemente en los distintos pasos. Se vuelca entre los vidrios y se coloca suavemente por encima agua destilada para favorecer la polimerización. Las cantidades de TEMED y APS pueden variar si no se logra una polimerización adecuada en un tiempo aproximado de 20 o 30 minutos. Se deja polimerizar a temperatura ambiente, si es invierno o el clima está frío colocar las placas en estufa a 37° C para favorecer la polimerización.

B) Gel de siembra o stacking- gel

Se puede usar al 4 o 5 %. En este trabajo se utiliza al 4 %.

Acrilamida-bis (30-08)	0,66 ml
Tris- ClH pH 6,8	1,25 ml
Agua	3 ml
TEMED	5 µl
SDS 10%	0,05 ml
APS	0,05 ml

Se vuelca el agua del vidrio, se enjuaga con pipeta Pasteur la superficie del gel de corrida (usando gel concentrador), inmediatamente se vuelca el gel concentrador sobre el de corrida hasta casi el borde del vidrio. Se coloca el peine con cuidado de no formar burbujas. Se deja a temperatura ambiente o en estufa a 37°C para facilitar la polimerización.

C) Se retira el peine y se enjuaga la superficie de las cavidades con el buffer de corrida, luego se colocan las placas en el aparato de electroforesis, se sujetan y se completan los reservorios con el buffer.

Sembrar las muestras en cantidad apropiada de 15- 20 µl por calle.

Sembrar el marcador de peso molecular: 5 µl por calle

Realizar la corrida: se corre 60 min. a 50 mA de corriente constante, aproximadamente. Si se necesita se puede dar más tiempo de corrida.

Inmunotransferencia (*Immunoblotting*, *Western blot*) (Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP)

Buffer de transferencia:

Tris base	1,45 g
Glicina	0,7325 g
Metanol	50 ml
Agua destilada c.s.p.	250 ml

Solución para el bloqueo

Leche descremada	5 %
Tween 20	0,2 %
PBS c.s.p.	100 %

- Cortar las membranas del tamaño adecuado al gel, usar guantes para todo el procedimiento.
- Embeberlas en metanol, lavarlas con agua destilada y enjuagar con el buffer a usar.
- Embeber los papeles de filtro con el buffer y colocarlos en el piso del aparato de transferencia. Quitar las burbujas de aire que pudieran haberse formado.
- Colocar la membrana sobre los filtros, humedecerlas con el buffer y quitar las burbujas.
- Colocar el gel y con una birome marcar en la membrana las calles. Agregar buffer.
- Colocar encima el papel de filtro embebido en el buffer y quitar las burbujas.

- Realizar la transferencia durante 60 a 90 minutos y a 50 mA de corriente constante.
- Sacar la membrana y cortar la calle correspondiente al marcador de peso molecular. Teñir éste con Amido black en el caso de que no sea coloreado.
- Recortar las membranas de acuerdo a las calles donde se sembró el antígeno para lo cual puede utilizarse la coloración de Rojo Ponceau.
- **Coloración de Rojo Ponceau (se utiliza para cortar las membranas transferidas por *immunoblotting*).**
 - *Solución stock:*
 - Rojo Ponceau 2g
 - Ácido tricloroacético 30g
 - Ácido sulfosalicílico 30g
 -
 - Completar con agua destilada en cantidad suficiente para 100ml.
 - *Solución de trabajo:* utilizar la solución madre diluída 1:10. Luego de colorear las membranas y realizar la observación de las mismas pueden enjuagarse con agua destilada a temperatura ambiente.

Protocolo de *Immunoblotting*

- Realizar el bloqueo de los sitios inespecíficos colocando la membrana en la solución correspondiente. Dejar una noche a 4°C, o una hora a 37°C.

- Luego del bloqueo, preparar el anticuerpo a utilizar, diluyendo el suero 1:100 con la misma solución utilizada para el bloqueo de la membrana. Colocar la membrana dentro de esta solución.
- Incubar 90 minutos a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05 % (PBS-T), en agitación durante 5 minutos cada lavado.
- Incubar con el conjugado anti-cerdo marcado con peroxidasa diluido 1:1000 en la solución de bloqueo. 90 minutos a 37°C.
- Lavar 3 veces durante 5 minutos cada una con PBS-T y en agitación.
- En un recipiente de color claro preparar el sistema revelador:
 - A) Buffer del sustrato: Trisma base pH 7,4 1 M (solución 10x)
Prepararlo diluyendo 6,05 g de Tris en 20 ml de agua destilada, bajar el pH a 7,4 y agregar el agua restante.
Para usar: Diluir 5 ml de buffer en 45 ml de agua destilada.
 - B) Agregar al buffer 30 µl de agua oxigenada 30 vol. Y 0,01 g de DAB.
Homogeneizar para disolver completamente.
- Colocar la membrana en el recipiente que contiene el sistema revelador y agitar hasta la aparición de color marrón en la membrana, donde se verán las bandas.
- Frenar la reacción colocando la membrana en agua destilada.
- Secar la membrana y conservarla envuelta en papel de aluminio.

Técnica de *Immunoblotting* con antígeno total de *T. gondii* para la detección de anticuerpos en suero (protocolo cedido por el Dr. Gereon Schares, Instituto de Investigación en Salud Animal Friedrich Loeffler).

Materiales:

- Solución de bloqueo: Gelatina de pescado 2% +PBS Tw20.
- Membranas elaboradas con antígeno total de *T. gondii* (2×10^7 taquizoítos).
- Sueros problema y controles diluidos 1:100.
- PBS/Tween 20 0,05%.
- PBS 1X.
- Conjugado: anti- Pig IgG 1:250 (Jackson immunoresearch Labor code number 114-035-003 Lot: 42260)
- Buffer del sustrato: Reconstituir 1 tableta de Chloronaphtol en 10 ml de metanol y agregar 30 ml PBS y 40µl H₂O.
- Agitador

Procedimiento:

- Cortar y numerar las membranas en tiras de 3 mm de ancho y colocar en la placa para IB.
- Incubar las membranas con 500 µl por pocillo de solución de bloqueo (gelatina de pescado 2% y PBS Tw20) durante 5 min.
- Inyectar 5 µl del suero diluyéndolo en la solución de bloqueo

previamente incorporada para obtener 1:100.

- Incubar 1h a temperatura ambiente en agitación.
- Aspirar los sueros diluïdos.
- Lavar las membranas 5 veces/1min con PBS/T.
- Diluir el conjugado en solución de bloqueo (1:250), agregar 500 µl por pocillo e incubar 1h a temperatura ambiente en agitación.
- Luego de incubar lavar las membranas 3 veces/1min con PBS/T y 2 veces/1min con PBS.
- Reconstituir el sustrato en su buffer y agregar 500µl por pocillo.
- Detener la reacción a los 15 min o menos, cuando las bandas se hagan visibles en el control.
- Aspirar el sustrato y descartar en un recipiente para ese fin debido a que es un residuo peligroso.
- Lavar 1vez/1min con agua bidestilada.

Prueba de ELISA-rGra7

Antígeno rGRA 7:

Antígeno recombinante rGra7 (concentración 5µg/ml): el gen que codifica para dicha proteína de *T.gondii* fue clonado en vectores de expresión procariontes (*Escherichia coli*). Fue elaborado y cedido por el Dr.Sergio Angel, INTECH, Chascomus, Argentina.

Materiales:

- *Buffer* de pegado del antígeno: pH 9,6 (NaCO₃:1,59g/1L + NaHCO₂:2,39g/1L)

- Solución de bloqueo: Leche descremada (Difco) 3% en *buffer* de fosfatos más Tween 20 (PBS-T) 0,2%
- Muestras de suero y conjugado
- Sueros controles positivos de animales naturalmente infectados con título de anticuerpos > 3200
- *Buffer* de dilución de las muestras: PBS 1X
- Conjugado: *anti-pig* peroxidasa (1:1000) Sigma (St Louis, MO)
- Microplacas de 96 pocillos: Nunc ImmunoPlate- Maxi Sorp
- Solución de lavado: PBS-T 0,05%
- Solución *buffer* del sustrato: (0,1M ácido cítrico + 0,2M fosfato ácido disódico 12H₂O: pH 5)
- Cromógeno: ABTS (2,2'-azino- bis (3-ethylbenzthiazoline 6sulphonic acid) 0,03% en solución de *buffer* del sustrato.
- H₂O₂: (30%) 0,01% en solución de *buffer* del sustrato.

Solución buffer carbonato – bicarbonato pH9.6 para sensibilizar placas de ELISA:

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,39 g

- Mezclar las sales en 900 ml de agua destilada, regular el pH con HCl a 9,6 y luego completar a 1 litro.
- La lectura de las placas se realizó en un Lector de ELISA (Labsystem Multiscan MS)

Procedimiento

Sensibilización de la microplaca:

- Diluir el antígeno en *stock* a una concentración de 5µg/ml en buffer de pegado del antígeno. Con una pipeta multicanal llenar los pocillos de la microplaca con 100 µl por pocillo. Incubar las placas durante una noche a 4°C.
 - Lavar las placas 3 veces con PBS-T, agregar 100µl/ pocillo de la solución de bloqueo e incubar a 37°C/ 1 h.
 - Lavar 5 veces con PBS-T.
 - Diluir las muestras de suero 1:25 con PBS 1X y agregar 100µl/ pocillo en duplicado, incubar a 37°C/ 1h. Luego de incubar, lavar 5 veces con PBS- T.
 - Diluir los sueros controles positivo y negativo.
 - Diluir el conjugado 1:1000 en PBS 1X y agregar 100µl/pocillo e incubar a 37°C/ 1 h.
 - Lavar 5 veces luego de incubar con PBS-T.
 - Agregar 100µl/pocillo de la solución buffer del sustrato + sustrato. Incubar 7 min a temperatura ambiente en oscuridad.
 - Medir las densidades ópticas (OD) con un filtro de 405nm.
- Adicionalmente se obtuvieron los índices para las OD obtenidas normalizando los datos de acuerdo a los controles positivo y negativo.

Prueba de ELISA-TgSAG1:**Antígeno nativo TgSAG1 (P30):**

El antígeno TgSAG1 (P30) fue elaborado y cedido por el Dr. Gereon Schares, Instituto Friedrich Löffler, Wusterhausen, Germany (Hosseininejad et al., 2009).

Materiales:

- Microplacas de 96 pocillos Nunc Polysorp
- PBS-T 1X (10XPBS + ddH₂O + 0,05% tween20)
- Buffer de bicarbonato (0,1M pH 8,3) BIC
- Ag TgSAG1(P30): concentración 5µg/ml
- Buffer de dilución de la muestra (PBS-T+ 20% Suero equino)
- Muestras y sueros controles.
- Conjugado: *anti-pig* peroxidasa (1:4000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, USA).
- Buffer de dilución del conjugado: PBS-T+1% suero equino)
- Buffer del sustrato: 250ml ddH₂O+ 247ml 0,2M Na-acetato + 2,5ml 0,2M ácido cítrico)
- 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), H₂O₂ 30% al 0,004% .
- Acido sulfúrico como solución de stop.

Procedimiento:**Sensibilización de las microplacas:**

- Disolver el antígeno liofilizado con agua deionizada o bidestilada (250ul) a temperatura ambiente durante 1 hora en un tubo de 1,5ml y vortexear.
- Resuspender el antígeno rehidratado en la solución de pegado. La concentración del antígeno TgSAG1 (P30) debe ser de 1:50 (0,012ug / pocillo).
- Con una pipeta multicanal llenar los pocillos de la microplaca con 120 ul por pocillo.
- Incubar 1 h a temperatura ambiente y lavar 3 veces con el buffer de lavado.

Preparación de las muestras:

- Diluir las muestras de suero 1:100 en PBS T 20% suero equino, adicionar 100ul/ pocillo por duplicado en la placa sensibilizada e incubar 30 min a 37 °C.
- Luego de la incubación, lavar con solución de lavado y agregar el conjugado *anti-pig* IgG con peroxidasa diluído 1:4000 en PBS-T 1% suero equino 100 µl/ pocillo e incubar 30 min a 37°C.

(si el conjugado se encuentra prediluído con glicerina 1:2, utilizar el doble del volumen para la concentración final)

Nota: Lavar entre cada paso con PBS-T tres veces. En el paso final lavar tres veces con PBS-T y luego 2 veces con agua destilada.

- Agregar 100 µl/ pocillo del sustrato diluído (100ug/ml) 3,3',5,5'tetramethylbenzidine y 0,004% (1,2ul de H₂O₂ 30%) peróxido de

hidrógeno en 0,2M acetato de sodio 0,2M y ácido cítrico (10ml),
incuba 15 min a temperatura ambiente.

- Detener la reacción con el agregado de 50ul de ácido sulfúrico a una concentración final de 4N. Medir las densidades ópticas a 450 nm (filtro de referencia 620nm) utilizando un lector de ELISA (Labinstruments).

Anexo 2: Técnicas utilizadas en los estudios moleculares

Solución de buffer Tris Base EDTA (TBE)

Solución madre:

Tris base.....54g
Ácido bórico27,5g
EDTA 0.5M (pH=8)..... 20 ml

Completar hasta 1000ml con agua destilada

Solución de trabajo: utilizar la solución madre diluída 1:5 en agua destilada.

Geles de agarosa al 1,5%:

Para preparar un gel de 17 calles:

Agarosa..... 0,45gr
Buffer TBE 1X.....30ml
SYBR Safe DNA30ul

- Pesar la agarosa y colocarla en un Erlenmeyer.
- Agregar el buffer TBE.
- Llevar al microondas potencia máxima hasta que comience la ebullición.
- Sacar del microondas y agitar suavemente hasta su completa disolución.
- Dejar entibiar y agregar el colorante Sybr Safe DNA, homogeneizar.
- Volcar el contenido en el molde para preparar el gel, colocar el peine y esperar hasta su completa gelificación.

- Luego cargar 10ul de cada muestra + 2ul de buffer de muestra en cada calle, utilizar el mismo volumen para el marcador de peso molecular.

Técnica de PCR-RFLP:

Para realizar la genotipificación de *T. gondii* se realiza el análisis de los aislamientos por PCR-RFLP con dos grupos de marcadores denominados nuevos y viejos.

Los nuevos son: c22-8, L358, PK1, c29-2 y Apico,.

Los viejos son: nSAG2, BTUB, GRA6 y SAG3.

En una primera etapa se realizan dos multiplex con *primers* externos para cada grupo de marcadores.

Marcadores viejos y nuevos:

ADN muestra	2,5	μl
Volumen final de reacción	25	μl
BSA	20	μg/ml
MgCl ₂	1,50	mM
Concentración del primer (I)	0,30	μM
Concentración del primer (II)	0,30	μM
Concentración de los dNTP	250,00	μM
		U/100
Taq-polimerasa	5,00	μl

Colocar los tubos de PCR en el termociclador y utilizar el siguiente programa: 94°C/4min; 35 ciclos de 94°C/30seg, 55°C/ 1min, 72°C/2min y una extensión final a 72°C/5min.

En una segunda etapa se utilizan los *primers* internos para completar la nested-PCR. En este paso se toma ADN amplificado de la primera etapa y se agrupan las reacciones de la siguiente manera:

- marcadores nuevos internos (c22-8, c29-2, Apico, PK1 y L358)
- nSAG2
- BTUB y GRA6
- SAG3

nSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, PK1, L358 y Apico

Volumen de ADN	2,5	µl
Volumen final de la reacción	25	µl
BSA	20	µg/ml
MgCl ₂	0,75	mM
Concentración del primer (I)	0,50	µM
Concentración del primer (II)	0,50	µM
Concentración de los dNTP	250,00	µM
		U/100
Taq-polimerasa	5,00	µl

Al finalizar la nested-PCR para cada marcador se deben realizar los cortes con enzimas de restricción para cada muestra de la siguiente manera:

nSAG2: 37°C, 0,5 h --> 65°C, 0,5 h

H ₂ O	3,7	µl
TaqI Puffer	1	µl
TaqI	0,1	µl
Bsh1285I	0,2	µl
DNA	5	µl

2011

BTUB: 37°C, 1 h --> 65°C, 1 h

H ₂ O	3,7 µl
TaqI Puffer	1 µl
TaqI	0,1 µl
Bsh1285I	0,2 µl
DNA	5 µl

GRA6: 65°C, 1 h

H ₂ O	3,9 µl
R	1 µl
Tru1I	0,1 µl
DNA	5 µl

SAG3: 37°C, 1 h

H ₂ O	3,9 µl
Tango Y	1 µl
BcnI	0,1 µl
DNA	5 µl

C22-8: 37°C, 0,5 h

H ₂ O	3,7 µl
Tango	1 µl
Alw26I	0,1 µl
MboII	0,2 µl
DNA	5 µl

L358: 37°C, 1 h

H ₂ O	3,7 µl
R	1 µl
BsuRI	0,1 µl
Hin1II	0,2 µl
DNA	5 µl

PK1: 37°C, 1 h

H ₂ O	3,8 µl
Tango	1 µl
Eco88I,	
RsaI	0,1 µl
DNA	5 µl

2011

Apico: 37°C, 1 h

H ₂ O	2,6 µl
Tango	2 µl
BspTI, HpyF3I	0,2 µl
DNA	5 µl

c29-2: 37°C, 1 h --> 65°C, 1 h

H ₂ O	3,8 µl
Tango	1 µl
RsaI, Tail	0,1 µl
DNA	5 µl

Anexo 3: Técnicas utilizadas para el aislamiento

Aislamiento de *T. gondii* en ratones

- Inocular ratones exocriados con el material sospechoso por vía SC o IM.
- Luego de 6 días o ante la aparición de signos clínicos lavar la cavidad peritoneal con 2,5 ml de PBS.
- Colocar una gota en un portaobjeto, montar con cubreobjeto y observar al microscopio con 400x.
- La ausencia de taquizoitos no indica necesariamente que el animal no se haya infectado.
- Pasado 1 mes de inoculados, obtener suero y hacer IFI.
- Sacrificar a los animales seropositivos, obtener el cerebro y observar en fresco.
- Si se detectan quistes, contarlos y hacer una suspensión.
- Inocular 500-1000 taquizoitos por ratón con el fin de mantener la cepa.
- Sacrificar a los animales conservados y reinocular al observar signos clínicos. O bien estipulando un período de acuerdo a la virulencia de la cepa.

**Protocolo de digestión pepsina / HCl para aislamiento de
Toxoplasma gondii (Dubey, 1998)**

- Cortar las muestras (50 gs) en pequeños trozos de 1-2 cm con tijera y guardar en tubos de 50ml.
- Triturar en seco con una picadora a baja velocidad durante 15s y luego repetir lo mismo a alta velocidad durante 30s con 125 ml de solución salina
- Verter el homogenato en un vaso plástico con un agitador magnético. Rotular según órganos y número de animal.
- Precalentar la mezcla a 37°C, agregar 250 ml de una solución precalentada (37°C) de pepsina ácida (pepsina 1:10000, 2.6 g; Cl Na 5 g; HCl 7 ml y agua destilada csp 500 ml) .Incubar en baño a 37°C durante 60 min.
- Filtrar el homogenato a través de 2 capas de gasa y centrifugar 250ml de la mezcla en un tubo de boca ancha de 250 ml a 1200 g durante 10 min.
- De acuerdo al tipo de tejido puede variar la capa de grasa que se forma y queda adherida al borde del tubo de centrifuga. Para prevenir la formación de ésta capa de grasa es conveniente suspender el sedimento en 20 ml de buffer fosfato (PBS, pH 7, 2). Descartar el sobrenadante y transferir la mezcla a un tubo de 50 ml con fondo cónico. Neutralizar la mezcla con 15 ml de una solución

fresca de bicarbonato de sodio 1,2% (pH 8,3). Mezclar y centrifugar a 1200 X g durante 10 min.

- Descartar el sobrenadante y agregar aproximadamente 5- 10 ml de solución fisiológica que contenga 1000 unidades de penicilina y 100ug de estreptomicina por ml.
 - Mezcladores, tablas de picar y otros materiales deben ser lavados con agua caliente a 60° C y jabón, luego enjuagados con agua fría y finalmente fisiológica antes de usar en otro espécimen para evitar contaminaciones cruzadas entre muestras.
 - Inocular por vía subcutánea 1 ml de la muestra en 5 a 10 ratones (Swiss- Webster de 20- 25 g) utilizando agujas 21-23 g. Es conveniente que cada ratón sea identificado individualmente con una marca de ácido pícrico y alcohol.
 - Observar los ratones inoculados en busca de signos clínicos.
- Realizar el lavado peritoneal a los 6 días pos inoculación (pi). Si alguno de los animales inoculados muere, realizar improntas de cerebro y pulmón y teñir con Giemsa para buscar taquizoítos.
- Sangrar los animales a los 27-30 días pi. Examinar el cerebro de los animales que sobrevivieron en busca de quistes tisulares.