



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCIÓN: MEDICINA PREVENTIVA**

**“PREVALENCIA DE TOXOPLASMOSIS EN  
PORCINOS DE ABASTO.  
REVISIÓN SOBRE SU IMPORTANCIA  
COMO AGENTE PRODUCTOR DE ZONOSIS.”**

**AUTOR: Ferraro María del Carmen**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Esperanza, noviembre de 2012.**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCIÓN MEDICINA PREVENTIVA**

**“PREVALENCIA DE TOXOPLASMOSIS EN  
PORCINOS DE ABASTO.  
REVISIÓN SOBRE SU IMPORTANCIA  
COMO AGENTE PRODUCTOR DE ZONOSIS.”**

**AUTOR: María del Carmen Ferraro**

**DIRECTOR: Dr. Eduardo GUARNERA  
CODIRECTOR: Dra. María Cristina SCAGLIONE**

**Miembros del tribunal de tesis: Mgter. Onelia LAVARONI  
Mgter. María Florencia BONO  
Mgter. Laura UGNIA**

In memoriam, a Lilia y Francisco.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”) por permitirme desarrollar el presente trabajo.

A la dirección y personal del Instituto de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni” (ANLIS “Dr. Carlos Malbrán) por el apoyo brindado.

Al director de la tesis, Dr. Eduardo Guarnera por su invaluable colaboración, predisposición y calidad humana.

A los Dres. Sergio Ángel y Valentina Martin por su muy preciada asistencia técnica.

A la Sra. Codirectora Dra. Cristina Scaglione por su comprometida e inestimable cooperación, soporte y constante aliento.

Al señor Codirector Dr. Héctor Tarabla por su valiosa orientación y apoyo técnico.

A la dirección y personal de las Industrias Frigoríficas Recreo por permitirme efectuar la búsqueda de las muestras.

A la Bioqca. Lili Dalla Fontana por su asistencia en la técnica de Hemoaglutinación.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme la oportunidad de finalizar mi maestría.

A mi familia por su soporte afectivo, amigos y compañeros de tareas, parte integrante y valiosa de mi vida, y a todas las personas que me han señalado el camino mediante su apoyo y comprensión para poder concretar esta meta,

a todos ellos, MUCHAS GRACIAS.

## ÍNDICE

### I. INTRODUCCIÓN

I.1. Descripción de la enfermedad	13
I.2. Hipótesis	20
I.3. Objetivo general	21
I.4. Objetivos específicos	21

### II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Generalidades de la enfermedad.	22
II.2. Agente etiológico. Estructura básica	22
II.2.a) Taquizoito	23
II.2.b) Bradizoítos – Quistes tisulares	26
II.3. Ciclo de Vida	28
II.3.a. Estadio enteroepitelial	28
II.3.b. Ooquistes.	30
II.3.c. Ultraestructura taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos.	33
II.3.d. Fijación y desarrollo del <i>T. gondii</i>	33
II.3.e. Desarrollo y biología de los bradizoítos y quistes <i>in vivo</i> .	35
II.4. Estructura y biología	36
II.4.a Células hospedadoras parasitadas y prevalencia.	36
II.4.b. Tamaño quistes / Bradizoitos	36
II.4.c. Separación quistes	36
II.4.d. Ruptura de los quistes	37
II.4.e. Resistencia a la Pepsina Ácida	38
II.4.f. Células huésped y cepas de <i>T. gondii</i>	38
II.5. Epidemiología	39
II.5.a) Transmisión	39
II.5.b) Enfermedad en los animales domésticos	42
Porcinos	42

Bovinos	45
Ovinos	47
Equinos	48
Caninos	49
Aves (gallináceas)	50
Conejos	51
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>III.1. MATERIALES</b>	52
III.1.1. Localización del estudio	52
III.1.2. Obtención de las muestras	55
III.1.3. Categoría y procesamiento de las muestras	57
III.1.3.a) Grupo control negativo	57
III.1.3.b) Grupo experimental	57
<b>III.2. MÉTODOS – Pruebas serológicas</b>	58
III.2.a. Hemoaglutinación Indirecta <sup>®</sup>	58
III.2.b. Inmuno Ensayo Enzimático o ELISA Indirecto <sup>®</sup>	59
III.2.c. Análisis estadístico de los datos epidemiológicos	61
<b>IV. RESULTADOS</b>	
<b>IV.1. Cálculo de prevalencias totales</b>	64
IV.1.a. Prevalencia Técnica de HAI	65
IV.1.b. Prevalencia Técnica de ELISA	66
IV.1.c. Prevalencia total a ambas pruebas	67
IV.1.d. Cálculo de concordancia	68
<b>IV.2. Prevalencia específicas</b>	69
IV.2.a. Prevalencia por género	69
IV.2.b. Prevalencia por procedencia	69
IV.2.c. Prevalencia por categoría de animales	70

<b>V. DISCUSIÓN</b>	
V.1. De la prevalencia general	73
V.2. De los métodos analíticos	75
V.3. De las explotaciones	77
V.4. De la situación sanitaria actual	78
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	81
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	83
<b>VIII. ANEXOS TÉCNICAS Y SOLUCIONES</b>	100
<b>IX. ANEXO IMÀGENES</b>	107

## ÍNDICE DE TABLAS

1	Evaluación serológica controles negativos ELISA / HAI....	56
2	Resultados de ELISA frente a HAI. ....	62
3	Distribución establecimientos según la categoría de animales	64
4	Resultado serologías HAI / ELISA .....	65
5	Prevalencia de reactores - Prueba HAI .....	66
6	Estado sanitario total de los animales – HAI .....	66
7	Prevalencia de animales reactores - Prueba ELISA.....	67
8	Estado sanitario total de los animales - ELISA	67
9	Resultados Test 1 y Test 2. CASOS – NO CASOS.....	68
10	Frecuencia reactores a ambas pruebas según sexo .....	69
11	Frecuencia reactores a ambas pruebas según sexo y procedencia	70
12	Clasificación de capones livianos y pesados pruebas s/ su respuesta serológica PV .....	71
13	Distribución de los reactores considerados por categoría faena y sexo. ....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Esquema de un esporozoíto de <i>T. gondii</i> .	107
2	Esquema de un taquizoíto y un bradizoíto de <i>T. gondii</i>	108
3	Representación esquemática del complejo apical del <i>T. gondii</i> .	108
4	Complejo apical de taquizoítos	109
5	Ooquistes de <i>T. gondii</i> .	111
6	Esquema de un esporozoíto de <i>T. gondii</i> .	111
7	Ciclo de endodiogenia	112
8	Taquizoítos en las etapas finales de endodiogenia	112
9	Macrófago con taquizoítos	113
10	Quistes tisulares de <i>T. gondii</i> .	113
11	Quistes tisulares de <i>T. gondii</i> en cerebro de ratón	114
12	<u>Extremo anterior de un bradizoíto</u>	114
13	Bradizoíto en quiste tisular	115
14	Etapas enteroepitelial de <i>T. gondii</i> en las vellosidades intestinales	115
15	Imagen m. electrónica de etapa enteroepitelial de tipo D	115
16	Gamontes de <i>T. gondii</i> .	116
17	Ooquiste expuesto a fluidos de exquistación.	116
18	Ooquiste esporulado en la última etapa de exquistación.	117
19	Frotis de cerebro con quistes de <i>T. gondii</i> .	117
20	Imágenes de ooquistes en diferentes etapas	118

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

1	Mapa de la región C-E Pcia. Santa Fe, O de Entre Rios	53
2	Mapa de la región C-S Pcia Santa Fe, S Cordoba, C-S Entre Rios	53
3	Mapa de la región Sureste de la Pcia Córdoba	54
4	Mapa de la procedencia general de los animales	54
5	Estadios infecciosos de <i>T. gondii</i>	107
6	Ciclo hospedador intermediario y hospedador definitivo	119
7	Etapas en el hospedador / ambiente	110
8	Tipos de <i>T. gondii</i> según el tiempo y estadios	110

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

1	Controles Negativos por ELISA	56
---	-------------------------------	----

## RESUMEN

Uno de los aspectos primordiales en Medicina Preventiva es la vigilancia de los hábitos alimentarios de una población. Demostrado a nivel mundial el rol significativo del porcino en la transmisión de la toxoplasmosis, es importante ponderar el papel epidemiológico en forma regional.

En la Provincia de Santa Fe, Argentina, ha sido reportado entre el 37,1 % y 38 % de reactores en porcinos de consumo, pero debido a la falta de actualización, se investiga acerca del estado higiénico-sanitario de los mismos. El objetivo de este trabajo fue efectuar un relevamiento serológico en 178 animales destinados a consumo, mediante dos técnicas serológicas: Hemoaglutinación Indirecta (HAI) y el Inmunoensayo Enzimático (ELISA). La prevalencia total hallada entre ambas pruebas fue del 21,9 %.

Se demostró asociación en la categoría capones livianos con respecto a los machos ( $p = 0,05$ ) no así, con la presencia de la enfermedad y el sexo ( $p = 0,4443$ ). Por otra parte, los resultados demostraron que la asociación entre el peso/edad y el índice de seropositividad, eran altamente significativos ( $p < 0,0001$ ).

La capacidad discriminadora de las pruebas estableció que el 73% de los establecimientos, mostró evidencias de exposición al parásito.

Este estudio epizootiológico sugiere que un elevado número de explotaciones porcinas enfrentan factores de riesgo, lo cual señala un elevado impacto sanitario en la población.

Palabras Clave: Toxoplasmosis; Porcinos; Diagnóstico; Epidemiología.

## SUMMARY

One of the main aspects in preventive medicine is monitoring the eating habits of a population. It has been demonstrated worldwide, the significant role that pigs are in the spread of toxoplasmosis and the epidemiological role of this species on a regional basis.

In the province of Santa Fe, Argentina, has been reported between a 37,1 and 38 % of reactors in pigs for consumption, but due to the few publications, the research is about hygiene and health state. The aim of this study was to conduct a serological survey in 178 animals for consumption, using two assays, indirect hemagglutination (IHA) and enzyme immunoassay (ELISA).

The overall prevalence found between the two tests was 21,9 %. It was demonstrated an association between the presence of the disease and sex ( $p=0.4443$ ), but if the category was established between light and males and capons ( $p=0.05$ ). Moreover, the results revealed highly significant between the weight / age and the rate of seropositivity ( $p < 0.0001$ ).

The discriminatory power of the evidence was 73 % of establishments, showed evidence of exposure to the parasite. This epidemiological study suggests that these populations face higher risk factors for health impact.

Keywords: Toxoplasmosis; Porks; Diagnosis; Epidemiology.

## I – INTRODUCCIÓN

### I.1.- DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La toxoplasmosis es la zoonosis parasitaria más difundida en la población humana y en más de 330 especies de animales domésticos y/o silvestres, reconociéndose actualmente, que ningún continente se encuentra libre de la presencia de este parásito (Acha y Szyfres, 2003). A nivel mundial se estima que un tercio de la población mundial se halla infectada (Consenso Toxoplasmosis Congénita, CTC, 2005), esto la torna en una de las parasitosis de mayor prevalencia (Dubey, 2004). Montealegre *et al.* (2009), señalaron mediante numerosos estudios seroepidemiológicos, que aproximadamente, la mitad de la población mundial en algún momento de su vida ha sido infectada, lo cual demuestra una baja morbimortalidad.

Esta enfermedad es producida por el protozooario intracelular obligado, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), cuyo ciclo de vida es indirecto facultativo, lo cual representa la necesaria participación de los felinos como hospedadores definitivos, mantenedores y amplificadores de esta enfermedad. Tanto las aves como un gran número de mamíferos, intervienen como hospedadores intermediarios. (Arias *et al.*, 1996; Anderson, 1979). Los principales mecanismos de transmisión natural se efectúan por vía oral o transplacentaria, siendo los estadios infectantes los taquizoítos, los bradizoítos y los esporozoítos. (Frenkel, 1973)

Actualmente se estima que más de un tercio de la población en los países en desarrollo, se ve afectada anualmente por afecciones originadas en los alimentos que

son considerados como zoonosis. Schlundt *et al.*, (2004) aseguran que la ocurrencia de estos patógenos zoonóticos se ha incrementado significativamente debido a factores, tales como las modificaciones en los sistemas de producción animal y a la cadena productiva de los alimentos. Estos últimos, alterarían los patrones de exposición y la susceptibilidad de las poblaciones (Correa *et al.*, 2008).

En este contexto, la toxoplasmosis fue catalogada como una enfermedad parasitaria transmitida por alimentos (EPTA) (Schlundt *et al.*, 2004), de naturaleza emergente, causada por la ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida como contaminante, procedente de hospedadores intermediarios con el parásito.

El agua natural y el suelo son considerados asimismo, potenciales fuentes de infección (Bowie *et al.*, 1997; Bahia-Oliveira *et al.*, 2003) de tal manera, que pueden establecer un ciclo endémico (Aramini *et al.*, 1999; Issac-Renton *et al.*, 1998).

Actualmente se incluye al *T. gondii* junto a *Cryptosporidium parvum* dentro de los cinco patógenos zoonóticos emergentes más importantes, transmitidos por la bebida y alimentos (Schlundt *et al.*, 2004).

Ya afirmaban Dubey *et al.*, y Frenkel *et al.*, en 1970, que tanto los alimentos como objetos contaminados con heces de gatos, representaban la fuente de infección más importante, posteriormente se incluyó el consumo de quistes tisulares presentes en los embutidos o carne procedente de animales infectados de origen bovino o porcino insuficientemente cocida o cruda (Dubey y Beattie, 1988; Dubey *et al.*, 1995). En este contexto, estas especies han adquirido gran importancia en el estudio de la transmisión de toxoplasmosis al hombre (Smith, 1991; D'Angelino, 1983; D'Angelino & Ishizuka,

1986).

Observaciones ulteriores efectuadas por Dubey y Beattie (1988), adjudicaron a la carne del porcino la principal responsabilidad en los casos de toxoplasmosis humana en Estados Unidos.

Está demostrado que la incidencia de toxoplasmosis requiere de ciertas condiciones climáticas especiales, por lo que varía de un área geográfica a otra. Además, factores relacionados con el estilo de vida de la población, cultural, higiénica y socioeconómica, tienen significancia epidemiológica en esta infección. Scandizzo y Bernstein (2008) sostienen que estos valores crecen linealmente con la edad.

Varios estudios sobre seroprevalencia en América Latina, demostraron que al menos el 65% de los individuos mayores de 60 años tiene anticuerpos a *T. gondii*. (De la Rosa, *et al.*, 1999). En algunas regiones de Colombia alcanzó al 73 % (Castro *et al.*, 2008); en Guatemala al 94%, El Salvador con el 80% (Seminario OPS-OMS, 2001); mientras que Costa Rica y Uruguay presentaron una prevalencia intermedia del 50% y 58% respectivamente, siendo las más bajas reportadas en las naciones de habla hispana en este continente (Zapata *et al.*, 2005).

Las mujeres con serología positiva previa al embarazo se consideran inmunes, no requiriendo de mayores controles; mientras que la población susceptible se halla conformada por las negativas a la primoinfección (CTC, 2005). Dentro de esta última categoría -grupo de riesgo más importante-, en el caso de adquirir la primoinfección durante el embarazo, en el 90 % de los casos, puede cursar asintóticamente si es

inmunocompetente (Zapata *et al.*, 2005). Si el agente supera estas barreras, puede sobrevenir la transmisión placentaria, la cual ocurre en relación lineal con el tiempo de gestación, siendo baja la frecuencia durante el primer trimestre, aumentando hacia el final del embarazo. Según Desmonts y Couvreur (1979) las probabilidades de transmitir una infección prenatal son de aproximadamente el 15%, 50% y 75% para cada uno de los trimestres del embarazo. El cuadro congénito puede manifestarse durante la vida intrauterina o luego del nacimiento.

En la Argentina, los primeros estudios epidemiológicos fueron realizados por Cecilio Romana en 1954 quien enfatizó en la Provincia de Tucumán, una prevalencia del 46% empleando toxoplasmina como reactivo (Gorodner, 2002).

En este contexto, Chiaretta *et al.*, en el año 2003, presentaron en el marco de un programa interinstitucional en la ciudad de Río Cuarto, Córdoba; determinaron en niños hasta 15 años que habitaban en áreas de riesgo, una prevalencia del 51,78 %, identificándose con otros países latinoamericanos como Paraguay, Costa Rica, Panamá, Brasil y México. Reportaron asimismo, prevalencias en Tucumán, Chaco, Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe; con el 46%, 35%, 62%, 61% y 53% respectivamente.

Scandizzo y Bernstein más recientemente (2008), encontraron cifras que ascienden hasta el 97,7% de positividad en un Hospital Zonal de la Provincia de Buenos Aires, en mujeres gestantes. Durlach *et al.*, en el 2003, divulgaron en la misma categoría de mujeres, en la ciudad de Buenos Aires el 47.3% mientras que en provincia se elevó al 51.7%. En el año 2008, Durlach *et al.*, informaron en la ciudad de Jujuy el 39,7%, en la



Provincia de Santa Fe, el 42.2%; en la ciudad de Resistencia un 28.5% y en Mendoza el 54,9%.

Otros estudios centrados en alumnos de Veterinaria, realizado por Trabattoni *et al.*, (2008) indicó el 23,35 % en la ciudad de Esperanza, UNL, Santa Fe; en Rio Cuarto, UNRC, se señaló el 51,75 % (Chiaretta *et al.*, 2003) mientras que en Casilda, UNR; una prueba tamiz distinguió un 44 % (Besso *et al.*, 2002).

En Europa, un estudio multicéntrico de casos y controles que abarcaron Nápoles, Lausana, Copenhague, Oslo, Bruselas y Milán, estimaron que entre el 30% al 63% de las infecciones en los diferentes centros referenciales, atribuyeron la presentación de esta parasitosis, al consumo de productos cárneos mal cocidos o curados y del 6% al 17% al contacto con el suelo (Cook *et al.*, 2000), no atribuyendo como factor de riesgo a los felinos.

Montealegre *et al.*, (2009) aseguraron que la fuente más común de infección en los países industrializados fue el contacto directo y el consumo de carnes con quistes. Demostraron que los toxoplasmas conservan su vitalidad en la carne y órganos infectados a 4 °C por 3 semanas y a -15 °C por 3 días. Señalaron además, que las carnes con mayor riesgo para el consumo han sido las de conejo, cerdo, cordero, cabrito, bovino, en ese orden, de acuerdo a sus hábitos alimenticios.

Igual comportamiento demostraron los bradizoítos en la leche bovina, manteniendo la infectividad luego de 20 días de almacenamiento a temperaturas de refrigeración (Hiramoto *et al.*, 2001). Walsh *et al.*, (1999) por su parte, informaron que

taquizoítos de la cepa RH sobrevivieron durante 3-7 días en leche de cabra a 4°C, y 14 días en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) a la misma temperatura.

La toxoplasmosis no es considerada una enfermedad de tipo profesional aunque Rosso *et al.*, (2007) señalaron que las personas que trabajan manipulando animales o sus subproductos, tienen mayores probabilidades de adquirir la afección, sugiriendo que la transferencia constante del parásito determina el mantenimiento de la prevalencia.

La preferencia mundial de consumo cárnico corresponde a la porcina con el 44%, seguida por la aviar 34% y luego el 24% por la vacuna. En la Unión Europea se registran los niveles de consumo más elevados con 40 kg/año/persona, en América del Norte es de 30 kg; en Rusia y Brasil con 12 kg (Ciudad y Jataba, 2010).

De acuerdo a un relevamiento de la Cámara de la Industria y el Comercio de Carnes de la Republica Argentina (CICCRA) durante el año 2011, el consumo de carne bovina se ubicó en 52,3 kilos *per cápita*, siendo el nivel más bajo desde 1958 (De Santis, 2011). La presiones y conflictos de los mercados han diversificado el consumo de las proteínas cárnicas, desplazando notoriamente la preferencia hacia la especie en estudio, llegando a los 12 kilos por habitante / año (Ocampo, 2012) a tal punto, que se han importado casi 4.000 toneladas de carne fresca procedentes de Brasil (80%); Chile (18%) y Dinamarca (0,56%) (Uccelli, 2011).

La carencia de un programa de vigilancia activa en animales en Argentina, no permite instaurar un método adecuado para la detección rápida pre o post-sacrificio. De esta manera se podría disponer de información que refleje el estado sanitario en diferentes especies de animales, sobre todo las de consumo, para poder ponderar así el

riesgo de exposición para las personas.

Se encuentran experimentando actualmente un kit de Inmunoaglutinación para humanos como método de diagnóstico (Peretti *et al.*, 2011) que detecta anticuerpos específicos en forma rápida y económica.

En la especie porcina se ha descrito una conducta diferente. En éstos, la subsistencia de los bradizoítos en los tejidos es mayor, por lo cual la capacidad infectante de los quistes es más prolongada. Esto sitúa al porcino en una perspectiva diferente respecto de la epidemiología de la enfermedad (Dubey, 2010).

Con respecto a los factores de riesgo, Dubey y Thulliez (1989) aseguran que la carne del porcino “es la mayor fuente de infección para los humanos y felinos, dadas las grandes posibilidades de contacto y consumo de alimentos, suelos y roedores contaminados” (Dubey *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1992).

La crianza extensiva de la especie mencionada incrementa el riesgo relativo (R.R.) 23 veces más respecto a las del confinamiento, lo que indica que existe asociación positiva, es decir, que la presencia del factor de riesgo lo asocia a mayor frecuencia de reactores. Del mismo modo, establecimientos con más de 29 hembras ofrecen un R.R. 4,5 superior en granjas, que con menor número de reproductoras (Assadi-Rad *et al.*, 1995).

Siguiendo estos lineamientos, la presencia de gatos indican riesgos significativamente mayores, cuando los porcinos se encuentran expuestos a la presencia

de ejemplares felinos seropositivos. El mismo autor indica un R.R. 2,6 veces mayor que la no-tenencia de felinos. Este valor se interpreta como el cociente entre los dos riesgos  $0.04 / 0.015 = 2.6$  (es decir: ocurre 4 veces por cada 15 oportunidades que no sucede).

Para la detección de los anticuerpos se han desarrollado técnicas serológicas que difieren según el tipo de antígeno (parásitos enteros, porciones solubles), presentan diferente sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, valor predictivo y valor clínico. Por tal motivo, se emplearon dos técnicas diferentes para otorgar mayor validéz a los resultados obtenidos.

Se pretende que los resultados obtenidos a partir de este estudio, constituyan un aporte al conocimiento sobre el estado higiénico-sanitario de una tropa de porcinos de abasto en un frigorífico de la Ciudad de Santa Fe, y establecer un análisis objetivo acerca de los alimentos de origen cárnico en nuestro medio.

## **I. 2.-HIPÓTESIS**

1. En la ciudad de Santa Fe se faenan porcinos infectados con cepas de *Toxoplasma gondii*.
2. La prevalencia en esta especie, superaría el 35% de los animales muestreados.
3. Las técnicas serológicas empleadas demuestran una adecuada capacidad discriminatoria.

### **I. 3.-OBJETIVO GENERAL**

- Conocer la situación inmunológica de la toxoplasmosis en un grupo de porcinos destinados a consumo a partir de un frigorífico de la ciudad de Santa Fe.

### **I. 4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la prevalencia relativa de esta infección parasitaria según dos técnicas de diagnóstico serológico (HAI –ELISA).
- Comparar los resultados obtenidos mediante estas de dos técnicas serológicas.
- Señalar la prevalencia específica de la infección considerando algunas variables como categoría de faena y sexo.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1.- GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD

Esta infección es causada por el protozoo parásito *Toxoplasma gondii* de amplia prevalencia como se informó a nivel mundial tanto en animales como en humanos. Se realiza una revisión de su ciclo de vida, estructura de los taquizoítos, bradizoítos, ooquistes, esporozoítos, esporocistos y estadios enteroepiteliales considerando además su modo de penetración. Se brindan algunos detalles de la biología de los quistes tisulares durante su desarrollo, ruptura y posibles mecanismos promotores de la reactivación. Otros aspectos revisados son potenciales mecanismos de cambios de estado y/o conversión: pasaje de esporozoítos a taquizoítos y bradizoítos; y el ciclo inverso. (Dubey y Lindsay, 1998; Acha y Szyfres, 2003).

Esta afección ha emergido en pacientes inmunodeprimidos como una reactivación de una infección latente de manera aún desconocida (Larsen *et al.*, 1978). Se enfoca esta revisión en base a la estructura y biología de los estadios del *T. gondii* (taquizoítos, bradizoítos y quistes tisulares), en los hospedadores intermediarios (humanos y algunas especies animales); en las fases de resistencia (quistes) y en los estadios externos a los hospedadores (ooquistes) (Schlundt *et al.*, 2004)

### II.2.- AGENTE ETIOLÓGICO - ESTRUCTURA BÁSICA

Son tres los estadios infecciosos del *T. gondii*: los *taquizoítos* (en grupos o clones), los *bradizoítos* (en los quistes tisulares), y los *esporozoítos* (dentro de los

ooquistes). Estos estadios se encuentran encadenados en un complejo ciclo de vida (Ilustración N°5).

### **II.2.a- Taquizoítos**

El término “*taquizoíto*” (tachos = del gr. veloz) propuesto por Frenkel (1973) corresponde al estadio que más rápidamente se multiplica en todas las células de los hospedadores intermediarios como así también, en las células epiteliales no intestinales de los hospedadores definitivos (Dubey y Lindsay, 1998).

Esta expresión "*taquizoíto*" sustituye al término empleado previamente como "*trofozoito*" (trophicos = del gr. alimentación) la cual ha sido denominada también como *endodiozoitos* o *endozoitos*. Los agregados de numerosos taquizoítos son designados como *clones*, *colonias terminales* o *grupos*. Estos taquizoítos adoptan a menudo una forma de media luna, de aprox. 2 a 6 µm con una estructura final anterior (conoide) y un extremo posterior redondeado (Fig. 2 y Fig. 3).

Ultraestructuralmente el taquizoíto contiene varias organelas y cuerpos de inclusión con una película protectora (cubierta externa): anillos apicales, anillos polares, conoides, roptrias, micronemas, microporos, mitocondrias, microtúbulos subpeliculares, complejo de Golgi, ribosomas, retículo endoplasmático rugoso y liso, núcleos, gránulos densos, gránulos de amilopectina (que pueden estar ausentes), y una membrana múltiple de plástidos como organelas los cuales han sido denominados como complemento de Golgi o apicoplasto. Los núcleos se encuentran usualmente ubicados hacia el área

central de la célula, los cuales contienen gránulos de cromatina y un nucléolo central. (Fig. 2, Fig.7 y Fig. 8).

La película consiste en tres membranas: un plasmalema y dos revestimientos estrechamente aplicados de tal manera que constituyen un complejo interno de membrana (Fig.3, Fig.4, Fig.12). Posee una membrana interna discontinua en el extremo anterior con microporos laterales por encima de los anillos polares y un poro en el extremo posterior del zoito. El anillo polar se encuentra rodeando un cilindro a modo de cono truncado denominado *conoide*, el cual consiste en 6 a 8 elementos microtubulares como un resorte comprimido. Veintidós microtúbulos subpeliculares se originan en el anillo polar y corren longitudinalmente de a pares, hacen las veces de jaula organizados a modo de una espiral suave y estrías prominentes para finalizar en el conoide. (Fig. 3, Fig.4, Fig.6) Entre el extremo anterior y el núcleo, hay 8 a 10 organelas en forma de maza llamadas *roptrias* (Fig.2, Fig.6). Estas son estructuras de excreción, cada uno compuesto de un cuello estrecho anterior de hasta 2,5  $\mu\text{m}$  de largo que se extiende hacia el interior del conoide (Dubey *et al.*, 1998).

Los taquizoítos pueden moverse por deslizamiento, flexión, ondulación y rotación, aunque no poseen medios de locomoción como cilios, flagelos o pseudópodos. Las funciones del conoide, roptrias, microporos y micronemas no se conocen ciertamente pero estarían relacionados con la penetración a la célula huésped y la creación de un entorno adecuado para el crecimiento intracelular del parásito así como su desarrollo. El conoide puede rotar, inclinarse, extenderse y retraerse inmediatamente antes de la penetración. Las roptrias poseen una función secretora y se



las asocia con la penetración a la célula huésped, segregando sus contenidos a través de la plasmalema justo por encima del conoide en el exterior gracias a una enzima proteolítica. Los taquizoítos para entrar en las células huésped pueden penetrar activamente a través del plasmalema del huésped o por la fagocitosis. Después de entrar, se convierte en un taquizoíto ovoide, rodeándose por una vacuola parasitófora (VP), la cual deriva aparentemente de los parásitos y de la célula huésped. Estos se multiplican asexualmente dentro de la célula huésped por endodiogenia (Fig.7 y Fig.8), una forma especializada de reproducción (Dubey, 2010).

En la endodiogenia el complejo de Golgi se divide para convertirse en dos complejos en el extremo anterior del núcleo. A continuación, junto con la membrana interna y los microtúbulos subpeliculares de las células hijas se separan en la cúpula anterior. El núcleo del parásito toma forma de herradura desplazándose en forma de cúpula hacia el extremo anterior. La membrana interna de los microtúbulos del complejo y los subpeliculares se continúan ampliando en forma envolvente hacia la mitad del núcleo, que con el tiempo se comprime en dos. Las células hijas continúan creciendo hasta llegar a ocupar toda la superficie de la célula madre. Los taquizoítos se siguen dividiendo por endodiogenia (Fig. 8) (Dubey, 2010).

*In vivo*, la mayoría de los grupos de taquizoítos están dispuestos al azar, debido a ciclos asincrónicos de endodiogenia. Sin embargo, se forman de vez en cuando, rosetas debido una manifestación de división sincrónica. En raras ocasiones, los taquizoítos de ciertas cepas se dividen por fisión binaria. Se puede producir la ruptura de la célula

huésped, cuando ya no puede contener el crecimiento desmedido de los taquizoítos (Fig.9)

Las tasas de invasión y crecimiento pueden variar dependiendo de la cepa de *T. gondii* y el tipo de células del huésped. Luego de la entrada de taquizoítos a una célula, hay un *período de latencia* variable antes de que el parásito se divida, y esta fase de retardo se debe en parte al parásito. Existen cepas virulentas de ratón que crecen más rápido en cultivos celulares que ciertas cepas “avirulentas”, del mismo modo, presentan una mayor tendencia más hacia la formación de “rosetas” que otras. A pesar que los *T. gondii* aislados se han clasificado genéticamente en tipos I, II y III, no hay diferencias estructurales apreciables entre ellos (Dubey, 2010).

### **II.2.b.- Bradizoítos y Quistes Tisulares**

El término "*bradizoítos*" (bradi = del gr. lento) fue impuesto también por Frenkel (1973), para describir el organismo que se multiplica lentamente dentro de los quistes tisulares. Estas formas han sido denominadas también cistozoitos.

Los quistes tisulares crecen manteniéndose intracelularmente (Fig.10-C) dividiéndose por endodiogenia. Estos varían en tamaño pudiendo tener los quistes jóvenes desde 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contener sólo dos bradizoítos (Fig. 10-A, Fig. 10- B) mientras que los mayores pueden contener cientos de organismos (Fig.10-E). Los quistes en el cerebro suelen ser esféricos y rara vez alcanzan un diámetro de 70  $\mu\text{m}$ , mientras que los quistes intramusculares son más alargados.

Aunque los quistes se pueden desarrollar en órganos o vísceras tales como pulmones, hígado y riñones, (Lindsay *et al.*, 2002) sostienen que estos presentan una mayor frecuencia de presentación en los tejidos nerviosos y musculares (cerebro, ojos y músculo esquelético y cardíaco). Se pueden presentar quistes en tejidos intactos sin causar daño o respuesta inflamatoria alguna, pudiendo persistir durante toda la vida del huésped (Mills *et al.*, 1997).

La pared del quiste es de delgado tejido elástico (< 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor), encerrando cientos de formas en media luna -bradizoítos- (Fig. 12, Fig. 13) de 7 por 1,5  $\mu\text{m}$  de tamaño aproximadamente cada uno, dentro del citoplasma de la célula huésped. Esta pared es argirófila, no contiene glucógeno u otros polisacáridos, y se encuentra rellena de material granular que completa así el espacio entre los bradizoítos (Mc Hugh *et al.*, 1994).

Estructuralmente los bradizoítos (Fig.13) difieren muy poco de los taquizoítos. En los primeros, el núcleo se encuentra situado hacia el extremo posterior, mientras que en los taquizoítos es más central. El contenido de roptrias en bradizoítos suelen ser más densos a la microscopia electrónica y se enroscan como un bucle sobre sí mismos (Fig.3 y Fig.4), mientras que los taquizoítos son de disposición más laberíntica. Estos bradizoítos contienen varios gránulos de amilopectina que se tiñen de rojo con el reactivo PAS (Acido Peryódico de Schiff). Los bradizoítos son más delgados que los taquizoítos y asimismo son menos susceptibles a la destrucción por las enzimas proteolíticas, pero el período de prepatencia en los felinos luego de la ingesta, es menor con bradizoítos que la realizada con taquizoítos (Pavesio *et al.*, 1992).

### II.3.- CICLO DE VIDA

#### II.3.a.- Estadio Enteroepitelial

Los gatos eliminan ooquistes después de ingerir cualquiera de las tres fases infecciosas de *T. gondii*, es decir, taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos. El periodo de prepatencia (tiempo para la diseminación de ooquistes posterior a la infección inicial) y la frecuencia de efusión de ooquistes, varía de acuerdo al estadio ingerido. Estos periodos prepatentes serán de 3 a 10 días pos-ingestión (d.p.i.) de quistes tisulares,  $\geq 18$  días después de la ingestión de ooquistes y  $\geq 13$  días después de la ingestión de taquizoítos. (Frenkel *et al.*, 1970).

Menos del 50% de los gatos expulsan ooquistes luego de la ingestión de taquizoítos u ooquistes, mientras que casi todos los gatos eliminan ooquistes luego de la ingestión de quistes tisulares (Jewell *et al.*, 1972). En este último caso, la pared del quiste es disuelta fácilmente por acción de las enzimas proteolíticas en el estómago e intestino delgado. Los bradizoítos liberados penetran en las células epiteliales del intestino delgado iniciando así el desarrollo de numerosas generaciones. (Ilustración N°7). El núcleo del *T. gondii* es haploide conteniendo su genoma, un total de 14 cromosomas (Dubey, 2010) excepto en la división sexual en el intestino de los felinos. Los esporozoítos son el resultado de la meiosis y parecen seguir las clásicas leyes de Mendel.

Dentro de las células epiteliales intestinales pueden desarrollar 5 tipos morfológicamente diferentes de *T. gondii* antes que se inicie la fase gametogónica. Estos estadios son designados como tipos A al E, habiendo varias generaciones dentro de cada uno (Ilustración N° 8). Poco se ha añadido a la estructura o a la biología de los

tipos A a C, desde la descripción original de Dubey y Frenkel (1972). Hasta ahora, sólo las últimas etapas (presumiblemente la tipo D) han sido estudiadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Estas formas se multiplican por una forma especializada de esquizogonia (Fig. 14, Fig. 15). Al igual que en la esquizogonia normal, el núcleo se divide varias veces sin acompañamiento del citoplasma, pero luego de que se han formado cuatro o más de éstos, recién ahora se inicia la formación de las células hijas. Se dirigen hacia la periferia del esquizonte, mientras que el plasmalema de la madre se va invaginando alrededor de cada uno, formándole el plasmalema de cada merozoíto. Se separan del esquizonte por sus extremos posteriores dejando a veces, un cuerpo residual.

La esquizogonia observada en los organismos tipo D se diferencia de los coccidios convencionales (*Eimeria*) en que los merozoítos inmaduros se forman internamente y no sobresalen de la superficie. Cabe señalar que muchos de los detalles de la esquizogonia no están claros, incluso los de tipo D. Piekarski *et al.* (1971) propusieron el término "endopoligenia" para describir la división de esquizontes en los enterocitos felinos. Sostenían que la formación de merozoítos comienza luego de dos divisiones nucleares. Vivier en 1970, ya había empleado el término "endopoligenia" para describir la formación de las divisiones de más de dos hijas de taquizoítos en el peritoneo de los ratones.

Tras el desarrollo asexual (tipos A a E), el ciclo sexual se inicia 2 días posteriores a la ingestión de los quistes tisulares por el gato (Ilustración N° 8). La liberación de merozoítos de los esquizontes tipo D y E, inician la formación de gametos. Estos se

distribuyen por todo el intestino delgado, pero se ubican más frecuentemente sobre el núcleo de la célula epitelial del íleon cerca de las vellosidades (Fig. 14, Fig. 15) de 3 a 15 d.p.i.

Los gamontes femeninos contienen un núcleo central y varios gránulos PAS positivos. Estos últimos pueden ser de dos tipos: tipo I y tipo II. El Tipo I posee alrededor de 0,35  $\mu\text{m}$  de diámetro y son más densos, aparecen antes que los tipos II que son menos abundantes pero de mayor tamaño (1,2  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Dubey, 2010).

Los gamontes masculinos maduros (microgamontes) son ovoides o elipsoidales (Fig. 16-A). Durante la microgametogénesis, el núcleo del microgamonte se divide para producir de 10 a 21 núcleos que se dirigen hacia la periferia, penetran en las protuberancias formadas en forma periférica. Uno o dos cuerpos residuales permanecen en el microgamonte luego de la división en microgametos (Fig. 14). Estos últimos son alargados y se componen principalmente de material nuclear. En el extremo anterior se señala una estructura puntiaguda llamada la *perforatorium*, en el que se encuentran dos cuerpos basales. Dos largos flagelos libres se originan en los cuerpos basales proyectándose posteriormente. Los microgamontes pueden tener hasta 21 gametos los que pueden utilizar sus flagelos para nadar y penetrar para fertilizar los macrogametos, formando así los cigotos. Luego de la fecundación, se forma una pared alrededor del ooquiste del parásito (Fig. 9). Las células epiteliales infectadas se rompen, liberándose así los ooquistes al lumen intestinal (Dubey, 2010).

### **II.3.b.- Ooquistes**

Los ooquistes no esporulados son esféricos o subsféricos de 10 por 12  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 5-A, Fig. 20). La pared del ooquiste (cigoto) posee cinco capas pero con

microscopía de luz se aprecian sólo dos capas sin color. Los gránulos polares están ausentes y los esporocistos llenan casi totalmente los ooquistes. La esporulación se produce en el medio ambiente, fuera del gato, dentro de 1 a 5 días dependiendo de la aireación y la temperatura. Los ooquistes ya esporulados son subesféricos a elipsoidales de 11 por 13  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 5-B y Fig. 5-C, Fig.18, Fig. 20). Cada ooquiste contiene dos esporocistos elipsoidales, sin cuerpos residuales de *Stieda*. Los esporocistos miden de 6 a 8  $\mu\text{m}$  conteniendo residuos intra-esporocísticos (Dubey, 2010).

Cada esporocisto contiene además cuatro esporozoítos cada uno (Fig. 5-C, Fig. 20). La ultraestructura de la esporulación fue descrito por Ferguson, *et al.* (1978) y Ferguson *et al.*, (1979). El citoplasma de los ooquistes no esporulados (cigoto) tiene un núcleo grande con nucleoplasma amorfo y diferentes nucléolos. El núcleo se divide en dos ocasiones, dando lugar a cuatro núcleos, que se sitúan en la periferia del cigoto, formándose una segunda membrana limitante. Luego de la división del citoplasma, se forman dos esporoblastos esféricos, cada uno con dos núcleos. Como la esporulación continúa, los esporoblastos se alargan formando los esporocistos. Las dos membranas externas del esporoblasto se transforman en la capa externa de la pared del esporocisto. En última instancia, cuatro placas curvadas forman la capa más interna de los esporocistos que están articuladas por cuatro puntos de sutura con una depresión en la superficie en el punto de unión (Fig. 17). Cada núcleo se divide en dos, esbozándose el esporozoíto. Así, cuatro esporozoítos se van formando dentro de cada esporocisto. Un destacado cuerpo residual queda encerrado en una simple membrana, consistiendo en gránulos de amilopectina y cuerpos lipídicos, una vez que finalizó la formación de los esporozoítos (Dubey, 2010).

Ultraestructuralmente, la pared de los ooquistes esporulados (Fig. 18) se compone de tres capas: una capa externa densa, una capa media luminosa y una moderadamente densa interna. El tratamiento de los ooquistes con hipoclorito de sodio al 1,3% elimina la capa exterior. Una única micrópila relativamente pequeña, está situada en una pared intermedia del ooquiste (Fig. 18-B) de 350  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esta depresión, muesca o escotadura, cuya terminología es indentación; consta de tres capas que se continúan con las tres capas en la pared del ooquiste, siendo la externa la más delgada. Aunque la función de la micrópila aún se desconoce, podría representar el sitio permeable de la pared que es susceptible a las acciones de  $\text{CO}_2$  y de varias enzimas que permiten la entrada de las sales biliares y tripsina, lo cual estimula la exquistación de los esporozoítos de los esporocistos (Dubey, 2010).

La pared de los esporocistos consta de dos capas distintas, una densa y gruesa externa y una interna menos densa. Esta última consiste en cuatro placas curvadas (Fig. 17) con dos engrosamientos en el lugar de aposición, los cuales se rompen en presencia de sales biliares y tripsina produciéndose de esta manera la exquistación y liberando a los esporozoítos. Cuando estas placas se separan, se enrollan hacia adentro formando unas bobinas cónicas (Dubey, 2010).

Ultraestructuralmente, el esporozoíto es similar al taquizoíto, excepto por la abundancia de micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina en el primero. Los esporozoítos son de 2 por 6 a 8  $\mu\text{m}$  de tamaño con un núcleo subterminal (Fig. 2, Fig.6). Dubey (2010) no describe sobre la presencia de cuerpos cristaloides que refracten la luz dentro de los esporozoítos del parásito.



### **II.3.c.-Ultraestructura de los taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos.**

Los esporozoítos, taquizoítos, y bradizoítos son similares ultraestructuralmente pero difieren en ciertas organelas y cuerpos de inclusión. Las tres formas tienen similares números de roptrias pero difieren en la ubicación (Beckers *et al.*, 1994). Por ejemplo en los taquizoítos son uniformemente laberínticos; en los esporozoítos usualmente las contienen como estructuras densas, mientras que en los bradizoítos las roptrias son densas y algunas están dobladas sobre sí mismos (Fig. 2, Fig. 6).

Los taquizoítos poseen unas pocas micronemas, los esporozoítos tienen un número intermedio y los bradizoítos muchas de estas. Hay numerosos gránulos densos de amilopectina en los esporozoítos y taquizoítos, mientras que en los bradizoítos son muy escasos. Por otra parte, manifiestan ser relativamente grandes en los esporozoítos y bradizoítos pero paradójicamente pueden ser pocos, pequeños o aún ausentes en los taquizoítos. Los cuerpos lipídicos son cuantiosos en los esporozoítos (Fig. 1), de rara presentación en los taquizoítos y están ausentes en los bradizoítos (Fig. 2) (Dubey, 2010).

### **II.3.d.- Fijación y desarrollo del *Toxoplasma gondii***

En general, la adherencia y penetración a las células del huésped (taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos y merozoítos) parecen ser similares a los descritos para otros coccidios. Los acontecimientos mecánicos implicados en la fijación y la penetración incluyen: (a) el deslizamiento, (b) la exploración de la célula huésped con la punta del

conoide, (c) la inyección del plasmalema dentro de la célula huésped, (d) un movimiento de unión hacia atrás a lo largo del zoíto y penetración en la célula huésped de los micronemas parcialmente exquistados, roptrias, y gránulos densos (Speer *et al.*, 1997).

Los zoítos de *T. gondii* pueden penetrar en una gran variedad de células de una amplia gama de huéspedes, lo que indica que los receptores bioquímicos involucrados en la fijación y penetración, probablemente son comunes a la mayoría de las células animales (Tomavo *et al.*, 1991).

Los taquizoítos al penetrar en las células del huésped, se rodean por una membrana que deriva evidentemente del plasmalema de la célula huésped. Esta membrana está destinada a convertirse en la membrana de VP y un número de proteínas del parásito asociado con ella, incluyendo proteínas ROP<sub>2</sub>, ROP<sub>3</sub>, ROP<sub>4</sub> y ROP<sub>7</sub> (Beckers *et al.*, 1994). La proteína ROP<sub>2</sub> se encuentra en la célula huésped cubierta por la membrana citoplasmática, lo que sugiere que desempeña un papel en la recepción y comunicación bioquímica del parásito. A los pocos minutos luego de la penetración, los taquizoítos modifican la membrana de la VP recién formada con las proteínas del parásito, formando unas membranas túbulo-vesiculares dentro de la VP. La presencia de este material en los esporozoítos durante el tránsito en el epitelio intestinal, indica que la reproducción del parásito no siempre sigue a la formación de una VP, sino que luego de penetrar las células de la lámina propia, pasaría a VP tipo 2, donde aquí los esporozoítos se multiplican por endodiogenia (Dubey, 2010).

**II.3.e.- Desarrollo y biología de los bradizoítos y quistes tisulares *in vivo*. Historia.**

Levaditi *et al.* (1928), aparentemente fueron los primeros en informar de que *T. gondii* puede persistir en los tejidos durante muchos meses como quistes. Sin embargo, una considerable confusión entre los términos "pseudoquistes" (grupo de taquizoítos) y "quistes" existe desde hace muchos años. Frenkel y Friedlander (1951) posteriormente caracterizan la citología de los quistes, asegurando que contienen organismos con un núcleo subterminal con gránulos PAS-positivos rodeado por una pared argirófila. Los quistes fueron mayores a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, conteniendo cerca de 3.000 organismos (Van Der Waaij, 1959).

Jacobs *et al.* (1960) proporcionan por primera vez, una definición biológica cuando descubrieron que los organismos quísticos eran resistentes a la digestión por el jugo gástrico (pepsina-HCl), mientras que los taquizoítos eran destruidos inmediatamente. De esta manera, los quistes tomaron importancia en el ciclo vital por su capacidad infectante para los carnívoros (Sharma y Dubey, 1981).

Cuando los ooquistes de *T. gondii* fueron encontrados en las heces de gato por Frenkel en 1970, éste hallazgo fue añadido al ciclo biológico del parásito. Dubey y Frenkel en 1976, hicieron el primer estudio en profundidad de la distribución de los quistes tisulares y de los bradizoítos, definiéndolos biológica y morfológicamente. Describieron, de esta manera, la formación de quistes ya a los 3 d.p.i. en ratones con taquizoítos (Van Der Waaij, 1959).

## II.4.- ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA

### II.4.a.- Células hospedadoras parasitadas y prevalencia.

Los quistes tisulares se pueden desarrollar en muchos órganos y tipos de células, pero Dubey *et al.*, en 1998 y luego Dubey en 2010, aseguran que es el hospedador quien determina esta característica. En cerdos, perros y gatos alimentados con ooquistes de varias cepas, los quistes tisulares desarrollan mayormente de músculos y órganos, mientras que en ratones lo hacen a nivel cerebral.

### II.4.b.- Tamaño de los quistes tisulares y número de bradizoítos.

El tamaño del quiste tisular depende de la edad del mismo, tipo de célula huésped, y método empleado para la medición citológica (Cornelissen *et al.*, 1981). Los quistes de tejido joven pueden contener tan sólo dos bradizoítos y tener de 5 a 60  $\mu\text{m}$  pero nunca se han reportado tamaños superiores a 90  $\mu\text{m}$  de diámetro y contener 60.000 organismos (Fig.10, Fig.11, Fig.19) aunque Dubey (1998) afirma que no se debería aventurar acerca del número de bradizoítos.

### II.4.c.- La separación de los quistes a partir de tejidos del huésped.

Cornelissen *et al.* (1981) describieron un técnica especial de separación de los quistes de los tejidos, a partir de una suspensión de homogeneizados de cerebro de ratón, valiéndose de la gravedad específica de los quistes (1,056).

#### **II.4.d.- Ruptura de quistes tisulares y reactivación de infecciones latentes.**

Se conoce que los quistes *T. gondii* persisten en los órganos de los hospedadores infectados por varios meses y quizás de por vida, dependiendo de la especie y las cepas del parásito como así también la localización de los mismos.

Es un hecho también, que hay más quistes por gramo de tejido en los ratones y ratas (Webster, 1994) que en otros huéspedes. Una marcada inflamación provoca la rotura y fuga de los quistes, pero en los animales infectados en forma crónica, hay una liberación lenta de bradizoítos, los que pueden ser destruidos por un huésped inmunocompetente (Vivier, 1970).

En el caso de individuos inmunosuprimidos esta liberación puede reactivar la infección. Los factores que afectan la ruptura en gran parte son desconocidos. Ferguson *et al.*, en 1989, han documentado este hecho en ratones crónicamente infectados con la cepa de STR, cuya ruptura y multiplicación posterior de taquizoítos llevaron a una fulminante toxoplasmosis.

Se dispone de poca información acerca de los mecanismos de recaída. Los tratamientos con corticoides, suero anti linfocitario y anti interferón (IFN) son capaces de inducir una inmunosupresión y reagudización de la toxoplasmosis. El modelo animal, la vía de inoculación y la etapa de *T. gondii* utilizados para la infección primaria, así como los criterios utilizados para la evaluación de las recaídas son consideraciones muy importantes. Por ejemplo, los hámsters son más sensibles a los corticosteroides que los ratones o ratas y a su vez, la administración por vía oral es

menos eficaz que por vía parenteral (Dubey, 1998; Frenkel *et al.*, 1976). Sin embargo, muchos taquizoítos mueren en los focos necróticos y no infectan nuevas células.

#### **II.4.e.- Resistencia a la pepsina ácida.**

Los taquizoítos son más susceptibles a la digestión con solución ácida de pepsina, que los bradizoítos (Jacobs *et al.*, 1960). Sin embargo, este método no discrimina taquizoítos de bradizoítos.

#### **II.4.f.- Células huésped y cepas de *Toxoplasma gondii***

Los tipos de células huésped y las cepas de *T. gondii* utilizadas para el estudio de quistes y el desarrollo bradizoítos *in vitro* han sido muy variadas (Mc Hugh *et al.*, 1994). La mayoría de estudios se han hecho con células de fibroblastos ya que estas células son fáciles de cultivar y suelen sobrevivir por largos períodos. La mayoría de las 20 cepas, producen quistes *in vitro* (Lindsay *et al.*, 1993) y fueron agrupadas según la virulencia en los ratones. Las cepas con tasas de reproducción bajas son *menos patógenas* para el ratón (VEG, ME-49, Beverley, Prugniaud y NTE).

Otras cepas suelen producir que los quistes se dividan rápidamente -*cepas patógenas*- (es decir, RH y BK) (Gross y Bohne, 1994; Matsubayashi y Akao, 1963). Durante los años '80 y '90 se desarrollaron técnicas para reconocer diferencias genéticas entre los toxoplasmas, aislados a partir de humanos y animales. Tomando como base los fragmentos de restricción, polimorfismo y longitud (RFLP); Dubey

(2010) identifica a Howe y Sibley como quienes clasificaron los tres tipos genéticos: tipo I, II y III considerando su virulencia en ratones.

De esta manera, las cepas tipo I eran letales para el ratón en un 100% independientemente de la dosis; mientras que los tipos II y III, demostraban un comportamiento avirulento. De igual manera, la población del *T. gondii* posee una gran variabilidad genética, por lo que las diferentes cepas se encuentran actualmente bajo una amplia investigación.

Se acepta que la mayoría de los taquizoítos son inmediatamente destruidos por la pepsina ácida, mientras que sobreviven en tripsina al 1% durante 3 horas (Jacobs *et al.*, 1960). Los bradizoítos por su parte, sobreviven en pepsina hasta 2 horas, considerando Sharma y Dubey (1981), que la destrucción de los taquizoítos en pepsina ácida se debe a los ácidos y no a la pepsina, respaldando los ensayos de Pettersen (1979), quien no halló diferencias en las tasas de supervivencia incubados a temperatura ambiente o a 37 °C (la pepsina se activa sólo a 37 °C y pH muy bajo).

## II.5.- EPIDEMIOLOGÍA

### II.5.a.- La transmisión de la toxoplasmosis

Los gatos pueden infectarse por la ingestión de bradizoítos a partir de quistes tisulares, esporozoítos en ooquistes o taquizoítos y por vía trasplacentaria por el pasaje de taquizoítos (Venturini *et al.*, 1992, Venturini *et al.*, 1997). Si la infección se produce por esporozoítos (liberados de ooquistes), el período prepatente puede variar entre 19 y 41 días, la producción de ooquistes puede ser muy escasa, durante un período patente corto, o no ocurrir. (Dubey y Frenkel, 1972). Los gatos de una semana de edad y/o

destetados, infectados con taquizoítos por vía digestiva, pueden enfermar y morir de toxoplasmosis; o vivir y producir ooquistes con las heces después de un período prepatente de 19 días durante 4 a 6 días (Chiappino *et al.*, 1984).

Si los gatos adquieren la infección al comer bradizoítos presentes en quistes tisulares, el período prepatente es de 3 a 10 días, el período patente de 10 a 30 días y se pueden eliminar millones de ooquistes (Venturini *et al.*, 1992). Los ooquistes sin esporular, refrigerados, permanecen viables al menos por 3 meses (Dubey, 2010). Cuando están en el medio, a 22° C esporulan en 24 a 48 horas. Si estos se hallan esporulados y son almacenados a 4°C, pueden ser infectantes por períodos de hasta 4 años y medio, entre 10 a 25 °C hasta 6 meses, estos períodos se acortan a medida que aumenta la temperatura; a 60° pierden su capacidad de infectar en 1 minuto (Brown *et al.*, 1995; Christie *et al.*, 1978). Relevamientos realizados en distintas condiciones indican que se pueden detectar ooquistes hasta en el 41% de los animales estudiados y han comprobado experimentalmente que los gatos pueden volver a eliminar ooquistes después de una reinfección. (Brown *et al.*, 1995; Dardé *et al.*, 1989). La infección puede ser adquirida tempranamente por vía trasplacentaria, lactogénica (Dubey y Frenkel, 1972) o si la gata alimenta con presas a sus crías. Posteriormente dependerá de las probabilidades de ingerir carnes crudas infectadas provistas por sus dueños o las presas que hayan capturado. Se considera que comienzan a cazar alrededor de los 3 - 4 meses, pero aquellos animales que no reciben suficiente alimento serán más propensos a cazar que los bien alimentados. El aumento de la prevalencia con la edad de la población indicaría que, en áreas urbanas, la infección temprana no es muy frecuente.



Cuando las condiciones ambientales son favorables y hay presas disponibles, la tasa de infección depende de la concentración de gatos en un área, que a su vez determinan la concentración de ooquistes en el suelo (Dubey, 1977). Dubey y Fenner (1993), aseguran que los felinos salvajes también son hospedadores definitivos de *T. gondii*. Appleford y Smith (1997) señalan la adquisición de la infección por medio del agua de bebida contaminada.

Se estima que la fuente de infección más importante para los ovinos y caprinos son las pasturas contaminadas con ooquistes. El parásito permanece en la musculatura, dentro de los quistes tisulares; experimentalmente pudo recuperarse de los tejidos al menos hasta 173 d.p.i. en ovinos y 440 d.p.i. en cabras. La musculatura constituye una fuente de infección para los seres humanos que manipulan esas carnes y para quienes las comen crudas o mal cocidas. Los gatos también podrán infectarse ingiriendo carne o vísceras y contaminar el medio ambiente con ooquistes eliminados con la materia fecal, asimismo las placentas y fetos abortados pueden ser fuente potencial para otras especies (Venturini, 2000).

Dubey (2010) ha recopilado numerosa información sobre la resistencia de los quistes a las bajas temperaturas, al efecto de la congelación, curado, salado y decapado. Sus experiencias corroboran la destrucción de estas estructuras por congelación a  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  y mediante la cocción convencional a más de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tomando esta medición en el interior de la carne y con grosor uniforme. La supervivencia promedio entre  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  llega hasta 2 meses.

La cocción en microondas requiere una consideración especial, debido a la particular física de las microondas que permite la presencia de puntos calientes y fríos, por lo que no debería considerarse una opción para la destrucción de quistes.

Pueden llegar a sobrevivir incluso, varios días con posterioridad a la muerte de un animal infectado, pese a que sus tejidos han iniciado la descomposición. Describe Dubey (2010), a modo de anécdota, el aislamiento a partir del cerebro de un cuervo infectado en forma natural, cuyo cadáver había sido completamente comido por los gusanos.

### **II.5.b.- La enfermedad en animales domésticos**

#### **PORCINOS**

La patogenicidad del *T. gondii* está estrechamente relacionado con la virulencia de la cepa y la especie del huésped (Dubey, 2010). La infección del porcino tiene importancia por su repercusión en salud pública.

En relación a lo mencionado, Ortega (2008) describe que entre los posibles hospedadores intermediarios, el cerdo ocupa un papel destacado desde el punto de vista sanitario por su fácil transmisión al hombre. La infección en esta especie se encuentra difundida prácticamente a nivel mundial, cursando en la mayoría de los casos de manera subclínica, aunque ocasionalmente puede presentar brotes de toxoplasmosis clínica.

Se presenta con mayor frecuencia en los animales jóvenes, dado que se incrementa la resistencia con la edad. Las manifestaciones clínicas en los lactantes son

debilidad, tos, incoordinación, diarrea y mortalidad perinatal. Las hembras gestantes que adquieren la infección (Dubey, 1998) pueden presentar muerte embrionaria, muerte fetal, momificación, parto prematuro o mortinados.

Puede haber compromiso de las vías respiratorias con tos y disnea, fiebre ligera o verdadera hipertermia de 40 a 41.6°C, anorexia, apatía, temblores, debilidad, tambaleo, cianosis, flujo ocular, diarrea y otros de naturaleza neurológica, como incoordinación motora o encefalitis inespecífica. No es raro observar cuadros inespecíficos como orquitis, nefritis, neumonía, vértigos y tumefacción testicular, tal como son descritos por Flores (1991); Jacobs *et al.* (1960); Soulsby (1987).

Experimentalmente, los lechones destetados y alimentados con quistes u ooquistes, desarrollan una respuesta febril, anorexia con pérdida de peso, pero generalmente se recuperan a las 3 semanas posinfección, pudiéndose recuperar parásitos hasta los 14 d.p.i. (Dubey, 2010).

En general, la mayoría de las infecciones de los cerdos adultos, en buenas condiciones físicas transcurren en forma subclínica o con síntomas inespecíficos que escapan al diagnóstico durante la fase aguda. Los portadores aparentemente sanos de estas infecciones latentes albergan quistes en sus tejidos, convirtiéndolos en portadores crónicos.

Aunque se describan las presentaciones más frecuentes, la edad, etapa fisiológica, edad gestacional, cepa actuante, vía de ingreso y raza, entre otros factores; pueden dar cuenta de las grandes variaciones y comportamiento de esta enfermedad. (Acha y Szyfres, 2003; Dubey, 2010).

El examen de los sueros pre y posparto, indicaron que los anticuerpos no se transmiten por vía placentaria y desaparecen de la leche a los 3 meses de la lactancia. La lesión predominante fue la placentitis necrosante con abundante presencia de trofozoítos. Estos pudieron ser aislados también a partir de cerebro, corazón, lengua, ojos, diafragma y de los principales cortes comerciales (p.e. jamón, tocino, panceta, costillas, paleta, tocino y lomos). Dubey (2010) demostró su viabilidad hasta 759 d.p.i. a partir del hígado y de riñón hasta 875 d.p.i.

Los animales muertos y membranas fetales deben eliminarse inmediatamente mediante enterramiento o incineración, para evitar el canibalismo y la propagación hacia los otros animales, manipulándolos con guantes en todo momento. No deberían admitirse gatos cerca de las hembras preñadas y convendría cubrir los alimentos, para prevenir la contaminación con ooquistes y aves migratorias (Dubey, 2010).

La especie porcina es considerada la fuente de contaminación más significativa de origen animal para las personas en Estados Unidos, por lo que se encuentran desarrollando los mayores esfuerzos para confrontar genéticamente los aislamientos y mejorar de esta manera, la comprensión de la transmisión de la enfermedad (Smith *et al.*, 1992).

Los cerdos pueden obtener la infección a partir de una amplia variedad de fuentes, que incluyen a especies salvajes (Aramini *et al.*, 1999), silvestres y domésticas en proximidad a los criaderos (Smith, 1991; Venturini, 2000).

En un estudio comparativo entre dos sistemas de producción, la seroprevalencia no sobrepasó el 5,4 % en las granjas de cría en confinamiento, mientras que en los criados a campo ésta llegó a ser del 100 % en los reproductores (Venturini *et al.*, 1999; Venturini *et al.*, 2004). En estas condiciones, en los primeros establecimientos las crías pueden no presentar síntomas, mientras que en los extensivos, pueden llegar al 24%. Dubey *et al.* (1995), asocia la seroprevalencia con el libre acceso de los gatos a las madres (Weigel *et al.*, 1995; Weigel *et al.*, 1999).

## BOVINOS

Los bovinos se encuentran entre los hospedadores intermediarios más resistentes a *T. gondii*; siendo el motivo de esa resistencia aún desconocido, sin embargo, en animales inoculados experimentalmente, el parásito puede multiplicarse en los tejidos pero son rápidamente eliminados.

En terneros, el parásito puede producir cuadros de fiebre, disnea, tos, flujo nasal, inapetencia, dorso hundido, decúbito permanente, depresión, temblores de la cabeza y el cuello, ataxia, irritabilidad y otros síntomas nerviosos. Se han demostrado microorganismos únicamente en los ganglios durante unas cuantas semanas (Dubey *et al.*, 1989).

En el ganado adulto, la infección cursa generalmente sin sintomatología. La mayoría de los investigadores no lograron aislar el parásito de la musculatura en condiciones naturales, mientras que experimentalmente éste se ha podido recuperar hasta 267 d.p.i. (Venturini, 2000).

Ha sido descrita la presencia del parásito en esta especie a nivel mundial, pero poco se sabe sobre la especificidad y sensibilidad del diagnóstico en el ganado bovino, debido a que varias de las técnicas empleadas para el diagnóstico en humanos dan resultados erráticos con los sueros del ganado bovino (Dubey, 2010). Entre todas las pruebas evaluadas, un título de 1:100 o mayor con MAT (Técnica de Microaglutinación), parece ser indicativa de infección en esta especie.

La ingestión de productos con carne o lácteos a partir de esta especie no se considera importante en la transmisión, sin embargo, aún no se ha podido adjudicar un comportamiento definido en la epidemiología de la enfermedad (Dubey, 2010). Por ello, el bovino es considerado como un huésped pobre para *T. gondii*. Aunque el ganado puede ser infectado con éxito, el parásito es eliminado o reducido a niveles indetectables a las pocas semanas, quizás debido a una resistencia innata.

El aborto es un problema económico importante en la industria ganadera mundial pero las múltiples etiologías y el avanzado estado de autólisis de los fetos, dificultan el diagnóstico. Es muy probable que esta parasitosis se confunda con el *Neospora caninum* dado que morfológicamente son parásitos muy similares y son importantes causantes de abortos (Dubey, 2010; Venturini, 2000).

Los mismos resultados fueron obtenidos tanto en *Bos taurus* como en *Bos indicus*, pero se detectó además *T. gondii* en el semen de animales inoculados, tanto por vía oral con ooquistes como por vía subcutánea con taquizoítos de la cepa RH, lo que sugiere una transmisión venérea (Dubey, 2010). La importancia de estos hallazgos en la epidemiología de la enfermedad en condiciones naturales es incierta.

Se encontraron anticuerpos del parásito en terneros muertos lo que sugiere infección transplacentaria, por lo tanto, sería necesario reevaluar la infección en el ganado bovino.

Algunos valores de prevalencia informados fueron: en Santa Fe mediante la técnica de IFI, Pizzi *et al.*, (1987) el 38 %, Wynne de Martini y Martin (1977) por HAI 64% en bovinos de consumo; en la Provincia de Santa Fe el 27% sobre 180 animales por IFI (Benvissuto *et al.*, 1985); en Buenos Aires por IFI 94,4% (Venturini *et al.*, 1995); en un relevamiento de 5 provincias argentinas el 35% (Bakos *et al.*, 1985; Ulon y Marder, 1990); en Chaco, Marder *et al.* (1990) reseñan el 39% de reactores sobre 249 bovinos estudiados.

Debido a la dificultad de aislamiento del parásito no se ha considerado como una fuente importante de infección para el hombre. Sin embargo, estudios realizados en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP en bovinos de Argentina, sugieren una alta prevalencia. Mediante IFI se detectaron anticuerpos tipo Ig G en el 91% de 90 bovinos para consumo, y mediante la técnica de PCR se detectó ADN de *T.gondii* en el 10% a partir de muestras de corazón. (Venturini *et al.*, 2004).

## OVINOS

Luego de ingerir la forma infectante, el parásito invade el tracto gastrointestinal, los nódulos linfáticos gastrointestinales llegando al torrente sanguíneo. La mayoría de los ovinos son asintomáticos en las primeras fases de la infección. Aproximadamente 14 días después de la infección en hembras preñadas, el parásito invade la placenta. La

infección transplacentaria durante el primer trimestre (1 a 40 días) puede provocar la muerte y reabsorción fetal.

Buxton y Finlayson describieron en 1986, que los ovinos que enfermaban durante el segundo trimestre podían padecer muerte fetal, aborto y momificación, observando que en mellizos abortados, uno podía momificarse mientras que el restante desarrollaba de manera relativamente normal. Del mismo modo, determinaron que la infección durante la gestación tardía, no impedían el nacimiento de corderos, pero podían presentar luego debilidad y morir (Buxton, 1998).

Dubey (2010) sostiene que las hembras que han abortado debido a éste parásito, no suelen presentar recurrencias en los abortos, por lo cual se pueden conservar para reproducción.

## EQUINOS

El caballo participa de la infección como hospedador intermediario, pero es poco receptiva al desarrollo de la enfermedad. La persistencia en tejidos es más prolongada que en otros animales, y experimentalmente fue recuperado hasta 476 d.p.i.

Dubey *et al.*, (1999) anunciaron el 13,1 % de positivos sobre 76 equinos en la Provincia del Chaco, mediante el test MAT.

Son raros los casos clínicos, por lo que se le atribuye principalmente una forma subclínica. Ocasionalmente se ha detectado *post mortem* la presencia del parásito en équidos con signos de encefalomiелitis progresiva, ataxia, movimientos en círculo, paresia, ceguera aparente, disfagia, dificultad respiratoria, observándose en dichos



animales lesiones hemorrágicas focales y acúmulos perivasculares de linfocitos y macrófagos en el cerebro y médula espinal, así como mielomalacias multifocales (Flores, 1991).

Sin embargo, se demostró que durante los últimos 20 años, existían dos protozoarios: *Sarcocystis neurona* y *Neospora* sp., los cuales además de ser morfológicamente similares, demostraron tener la capacidad de provocar cuadros clínicos similares (Dubey *et al.*, 1999).

En las inoculaciones experimentales con cepa RH, desarrollan fiebre transitoria (4-8 d.p.i.), presencia de anticuerpos específicos entre 6 y 12 d.p.i., pero las formas tisulares no persisten por más de 3 meses. Se informó transmisión transplacentaria pero se requiere de mayores estudios (Dubey, 2010).

## CANINOS

En perros la toxoplasmosis puede manifestarse con síntomas neuromusculares, respiratorios y gastrointestinales. La mayoría de los casos fueron animales de menos de un año de edad. No se considera que *T. gondii* sea un patógeno primario de los caninos, la mayoría de los casos clínicos han estado asociados a la infección por el virus de Distemper, a diferencia de *N. caninum* que es un patógeno primario. Ambas infecciones pueden cursar con el síndrome de encefalomiелitis o de miositis - polirradiculoneuritis (encefalitis-encefalomiелitis a protozoarios) (Braund, 2003) y hasta la descripción de *Neospora caninum*, fueron descriptas como una sola enfermedad.

La prevalencia serológica es variable, hay datos de nuestro país sobre la seroprevalencia de ambas infecciones y de la de toxoplasmosis. En La Plata se

determino que la prevalencia de toxoplasmosis y neosporosis en una población de 97 perros adultos fue de 47,4 % y 43,2% respectivamente, mientras que el 28,9 % eran positivos a ambos parásitos (Di Lorenzo *et al.*, 1997). En la Ciudad de Buenos Aires se halló el 60% de 145 positivos a toxoplasmosis (Gury Dohmen, 1995) y en la ciudad de Corrientes, Ulon y Marder en 1990, relatan que un 46 % sobre 341 caninos presentaban serología positiva.

En los pequeños carnívoros domésticos aún no se han desarrollado vacunas, como sí en las ratas, ovejas o cerdos inmunizados con quistes o taquizoítos de la cepa RH o la S48 de *Toxoplasma gondii*, con el agregado de inmunoestimuladores (Durlach y Martino, 2009)

#### AVES – (GALLINACEAS)

Las gallinas y pollos se infectan pero no manifiestan gran cantidad de síntomas ni se detectan pérdidas importantes en la producción (Kaneto *et al.*, 1997). La prevalencia es muy variable, del 2 % pero pueden llegar al 100 % (Dubey, 2010); pero ello depende del sistema productivo, ya que cuando son criados a cielo abierto o "suelos" pueden ingerir mayor cantidad de ooquistes.

En los casos de presentar síntomas y ser positivos a la MAT, se describe el hallazgo de neuritis periférica, pero no se puede descartar la presencia del Herpesvirus (Enf de Marek) (Dubey *et al.*, 2003).

En Río de Janeiro (Brasil) los mismos autores, detectaron anticuerpos en el 65 % de 198 pollos, siendo aislados del 70.9 % de los animales. En otro estudio en la ciudad de San Pablo, el 39 % de 82 pollos fueron seropositivos, siendo aislado de 25 de ellos (Dubey *et al.*, 2002).

La mayoría de estos aislamientos se agruparon en tres cepas: la tipo I se considera altamente virulenta para ratones y se la aísla predominantemente de casos de toxoplasmosis humana y los tipos II y III son avirulentas para ratones.

En Argentina (Pcia de Buenos Aires) (Venturini, 2000), aislaron sobre el 65,5 % de 29 pollos, los tres genotipos presentes, predominando el tipo III. Esto revela la factibilidad de las infecciones multiparasitarias en condiciones naturales.

Existe una muy amplia dispersión y capacidades infectivas en diferentes tipos de aves de las que pueden aislarse como Anseriformes, Falconiformes, Galliformes, Columbiformes, Passeriformes, Psittaciformes entre otros (Dubey, 2010).

## CONEJOS

La demanda de carne de conejo para el consumo humano está aumentando, por lo tanto, la está tomando importancia epidemiológica

Dubey (2010) informa en España una prevalencia general del 14,2 % por MAT (1:25) llegando a valores del 53,8 % en algunas regiones. Algunos autores han descrito aislamientos a partir del cerebro de conejos silvestres, e identificación del ADN del parásito en el Reino Unido. En Chile se describen infecciones congénitas o postnatales tempranas en animales silvestres.

Perfumo *et al.*, (1978) junto a Dubey y Beattie (1988), describen casos de toxoplasmosis en esta especie animal, como causantes de hepatitis, neumonía y linfadenitis aguda con muerte consecuente. Las lesiones principales se concentran en el bazo (Dubey, 2010).

### III - MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. MATERIALES

##### III. 1. 1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El muestreo comprendió 11 establecimientos correspondientes a las Provincias de *Santa Fe* que incluía 7 granjas, concentrando un total de 113 animales (correspondiendo al 63,48 % del total de la muestra); *Córdoba* con 3 granjas que agrupaban 40 animales (22,47 %); y *Entre Ríos* con un establecimiento compuesto por 25 animales (14 %).

Establecimientos correspondientes a la Provincia de Santa Fe:

- ✓ San Genaro N (Dpto. San Jerónimo)
- ✓ Totoras (Dpto. Iriondo)
- ✓ Arroyo Seco (Dpto. Rosario)
- ✓ San Agustín (Dpto. Las Colonias)
- ✓ Franck (Dpto. Las Colonias)
- ✓ Monte Vera (Dpto. La Capital)

Establecimientos de la Pcia. de Córdoba:

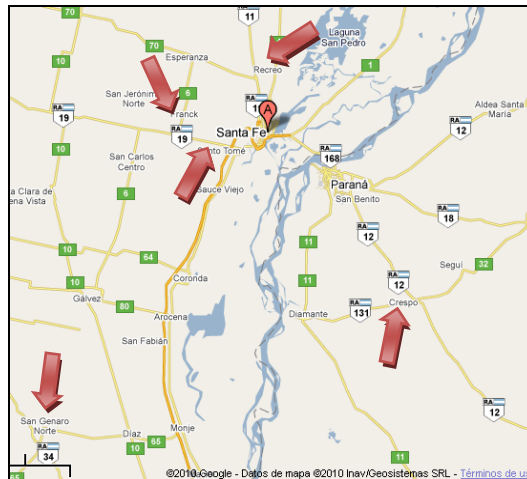
- ✓ Marcos Juárez. (Dpto. Marcos Juárez)
- ✓ Monte Buey (Dpto. Marcos Juárez)

Establecimiento de la Provincia de Entre Ríos:

- ✓ Crespo (Dpto. Paraná)

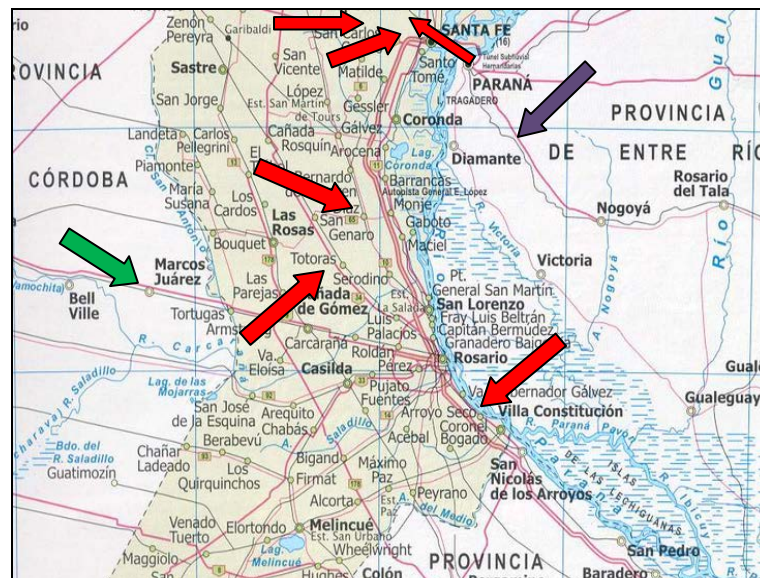
En la ilustración N° 1, a continuación, se señalan algunos de los establecimientos muestreados en Santa Fe: San Genaro N; San Agustín y Franck del Dpto Las Colonias y a Monte Vera, del Dpto. La Capital.

También se puede apreciar a la localidad de Crespo, en la Pcia. de Entre Ríos.



**Ilustración N° 1:** Mapa de la región centro-este de la Provincia de Santa Fe y oeste de Entre Ríos

Fuente: Google maps 2010 ©



**Ilustración N° 2:** mapa de la zona centro-sur de la Provincia de Santa Fe. SE Córdoba y Centro-sur de Entre Ríos

Fuente: Google maps 2010 ©

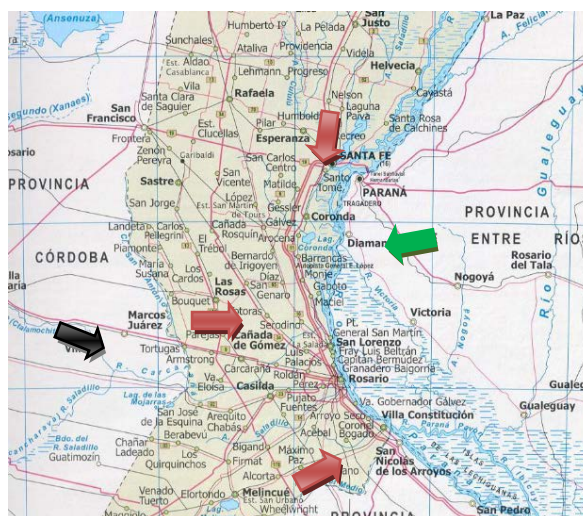
En el mapa anterior (ilustración N° 2) se señalaron los establecimientos de Santa Fe –rojo– (en las localidades de San Genaro, Totoras, Arroyo Seco, San Agustín, Frank y Monte Vera); en la Pcia. de Córdoba, a Marcos Juárez –verde– y en Entre Ríos se señala Crespo –violeta–.



**Ilustración 3:** mapa de la zona sureste de la Provincia de Córdoba.

Fuente: Google maps 2010 ®

En la ilustración N° 3 se señalan las localidades de procedencia de los animales radicados en la Provincia de Córdoba Marcos Juárez y Monte Buey) ambos pertenecieron al Dpto. de Marcos Juárez, al sureste provincial.



**Ilustración 4:** Ubicación general - procedencia geográfica de la totalidad de los establecimientos – Pcia. Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos

Fuente: Google maps 2010 ®



En la ilustración N° 4 se pone de manifiesto la distribución general y por lo tanto el área de influencia del presente estudio. Se aprecia que las distancias exceden los 200 km.

### III. 1. 2. OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Los sueros correspondieron a 178 porcinos provenientes de localidades de las Provincias de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos. Las categorías de animales incluyeron a capones, capones pesados y cerdas.

Fueron obtenidas y procesadas la totalidad de las muestras correspondiente a los animales destinados a faena, puesto las tropas no eran muy numerosas.

Como controles serológicos negativos, fueron procesadas muestras de sangre a partir de 23 animales, los cuales comprendían 19 lechones con sus respectivas madres (4) provenientes de la Escuela de Agricultura y Granja, de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Estos animales se encontraban en una franja etaria entre los 2 y 3 meses de edad, mantenidos en condiciones controladas en criaderos de pisos elevados y alimentados a base de balanceado y bebederos tipo chupete (Tabla N° 1).

En este caso, tanto madres como lechones fueron testeados en cuatro oportunidades mediante el test de HAI para corroborar su seronegatividad a través del tiempo, del mismo modo por ELISA registrando el valor de su absorbancia.

Controles	Categorías	Control serologías	
		ELISA $\bar{X}$ DO: 0,36	HAI 17/8,1/9,8/9,16/9
1	Madre 1	0,296	Neg
2	Madre 2	0,254	Neg
3	Madre 3	0,355	Neg
4	Madre 4	0,300	Neg
5	Lechón 1	0,011	Neg
6	Lechón 2	0,205	Neg
7	Lechón 3	0,324	Neg
8	Lechón 4	0,140	Neg
9	Lechón 5	0,169	Neg
10	Lechón 6	0,208	Neg
11	Lechón 7	0,248	Neg
12	Lechón 8	0,192	Neg
13	Lechón 9	0,313	Neg
14	Lechón 10	0,121	Neg
15	Lechón 11	0,125	Neg
16	Lechón 12	0,199	Neg
17	Lechón 13	0,179	Neg
18	Lechón 14	0,230	Neg
19	Lechón 15	0,206	Neg
20	Lechón 16	0,075	Neg
21	Lechón 17	0,155	Neg
22	Lechón 18	0,137	Neg
23	Lechón 19	0,126	Neg

Tabla N° 1: Evaluación serológica de los controles negativos por ELISA Y HAI.  
(Madres y lechones)

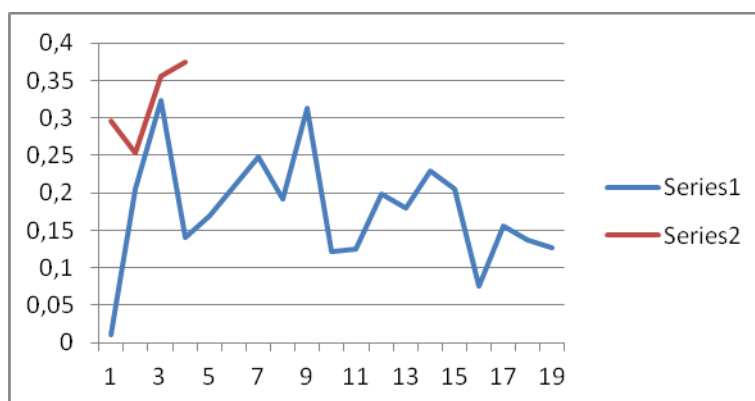


Gráfico N° 1: Controles negativos (madres y lechones)  
mediante el Test de ELISA

Ref.: Series 1= lechones (azul) / Series 2= madres (rojo)  
CO: 0,36



Se aprecian los resultados en el Gráfico N° 1, las dispersiones entre los valores máximos y mínimos de absorbancias para los controles negativos, los que se encuentran entre 0,1 y 0,25. Valor de corte o CO: 0,36.

#### Tamaño muestral

Todos los sueros fueron examinados para la búsqueda de Ac para *T. gondii*. El tamaño de la muestra fue calculada con un intervalo de confianza del 95% un error estándar del 5 % y asumiendo una prevalencia previa del 38% (Pizzi, *et al.*, 1987). De esta manera se estimó como número adecuado un n de al menos 168, situación que optimizamos con 178 animales.

### III. 1.3. CATEGORIA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

#### III.1.3.a) Grupo control negativo

Las muestras en los animales controles fueron colectadas mediante punción de la vena cava craneal y acondicionadas en tubos sin anticoagulante. Las mismas fueron procesadas en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, siendo retirado el suero por separación espontánea o centrifugación, luego rotulados, identificados y mantenidos a -20°C hasta su estudio.

#### III.1.3.b) Grupo experimental

Las muestras de esta categoría fueron recobradas a partir de las cavidades cardiacas mediante la apertura de las mismas. Las fracciones séricas fueron separadas mediante centrifugación en el mismo laboratorio que del grupo anterior y luego

conservadas a -20° C para la conformación de la seroteca, hasta su testeo en busca de Ac contra *T. gondii*. El suero de cada animal fue identificado con un número de registro individual, procedimiento realizado entre 2 a 4 horas de obtenidas las muestras.

### III.2. MÉTODOS - PRUEBAS SEROLÓGICAS

#### III. 2. a) HEMOAGLUTINACIÓN INDIRECTA

La determinación de positividad para HAI es de carácter cualitativo, por lo que se seleccionó como positivos a los sueros cuyos títulos superaron fueron  $\geq 1/32$ . (Blood and Radostits, 1992; Dubey and Beattie, 1988).

La prevalencia se analizó de acuerdo a su frecuencia de presentación (sueros positivos a la prueba serológica) y fue expresado en forma porcentual. Se buscó además alguna otra variable que pudiese determinar la existencia de alguna significancia estadística.

Se empleo un kit para Hemoaglutinación Indirecta (Toxotest Wiener Laboratories ®), 2000, Rosario, Argentina, (Pizzi *et al.*, 1987; Remington, 1970)

Procedimiento operativo: [descrito en detalle en Anexo Técnicas y Soluciones].

Se desarrolló la Técnica de Titulación con 2-ME al 1% para control de heterofilia.

**Interpretación de los resultados:**

La reacción es considerada reactiva cuando forma una malla o red de bordes irregulares con el 50 al 100% de aglutinación.

La reacción es considerada negativa cuando los hematíes se depositan en el fondo de la placa formando un botón de eritrocitos no aglutinados.

**Limitaciones del método:**

La utilidad de este ensayo es el screening de anticuerpos anti *T. g.* en muestras de sangre.

Los valores obtenidos con este ensayo deben ser tomados como una ayuda diagnóstica y debiendo ser evaluados por el profesional médico actuante considerando, además, la historia clínica del paciente, los hallazgos físicos y sintomatológicos y otros procedimientos diagnósticos.

**III. 2. b) INMUNO ENSAYO ENZIMÁTICO - ELISA INDIRECTO**

Se emplearon policubetas de poliestireno sensibilizadas por adsorción del antígeno sobre la base sólida. Se utilizó 100 µl / pocillo de una suspensión de antígeno en buffer/aa.

Luego se lavaron 3 veces con buffer de lavado (PBS-T) y dos veces con agua destilada. Los sueros se diluyeron al 1% en buffer proteico (PBS-BSA) [Anexo

Técnicas y Soluciones] y se incubaron 50 µl de esta solución por 1 h a 37°C. Luego se lavaron 6 veces con buffer de lavado (PBS-T).

Anti-Suero: (Técnica y reactivos – principio del Método – Procedimiento operativo)

Como conjugados se empleó un kit de ELISA goat anti-swine (γ cadena específica) diluido 1:1000 conjugado con peroxidasa (anti-Ig G caprino anti cerdo (Swine/Porcine Toxoplasmosis Immunoassay Ig G Antibody Kit, Product Code: TXP-96 well- Biocell™ Lab, Inc – 2000)

Se diluyó el suero 1/1000 respectivamente en PBS a pH 7,4 e incubaron 50 µl por 30 min. a 37°C. Luego se lavó con buffer de lavado.

El revelado de la reacción se realizó con 100 µl de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> y se leyó en 450 nm y 630 nm en lector para microplacas de ELISA (MRX, Dinattech®)

Esta técnica fue estandarizada en el Instituto Malbrán empleando Ag totales de elaboración propia. Cada muestra de suero se analizó por duplicado y la lectura de las absorbancias de cada pocillo fue ejecutada en un lector automático de ELISA con filtro a 492 nm. Los resultados fueron expresados como la media de las absorbancias.

El valor límite o *cut off* (CO) fue establecido en 0,360.

Se considera la densidad óptica de cada uno de los controles negativo y positivo (ya señalados anteriormente) y el valor del cut-off (valor umbral). Comparando la densidad óptica de las muestras con la densidad óptica de los sueros control, se determinó la reactividad o no reactividad frente a los anticuerpos anti-*T.gondii*.

Las muestras con valores de densidad óptica inferiores al valor del control cut-off deben considerarse no reactivas mientras que aquellas con densidad óptica superiores al mismo se deben considerar como positivas o reactivas.

Las muestras con valores de densidad óptica comprendidos en el intervalo de  $\pm$  10% del control cut-off, fueron tomadas como dudosas siendo sometidas a un nuevo ensayo.

### III. 2.c) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Las prevalencias brutas o totales de infección por *T. gondii* se determina como la proporción de positivos a cada una de las dos técnicas empleadas (HAI y ELISA).

Prevalencia de positivos: expresa la prevalencia aparente de enfermedad.

Prevalencia específica de la infección por sexo, categoría animal y establecimiento de origen (expresado según procedencia)

Se agruparon los animales en dos categorías: capones livianos y pesados. Como indicador relativo de edad se valieron de estas mismas categorías, asignándolos como jóvenes y adultos respectivamente.

Las dos técnicas fueron realizadas en doble ciego.

Sólo muy pocas pruebas nos brindan al mismo tiempo altos valores de sensibilidad y especificidad; siendo el hecho habitual que la sensibilidad y la especificidad se modifiquen en relación inversa. En el caso de toxoplasmosis, la técnica considerada como Gold Standart es el Dye Test, la cual posee los mayores valores de sensibilidad y especificidad, pero no ha sido posible practicarla y tomarla como parámetro ideal.

Los controles negativos fueron expresados en porcentajes. La concordancia entre ELISA y HAI fue determinada mediante la prueba estadística Kappa ( $K$ ). (Tarabla, 2000).

$$K = \frac{CO - CE}{1 - CE}$$

Donde:

$K$  = coeficiente kappa

Pr = probabilidad

CO (concordancia observada) = Pr [A (+) y B (+)] + Pr [A (-) y Pr B (-)] / n

CE (Concordancia esperada) =  $\frac{\text{Pr [A (+) x B (+)]} + \text{Pr [A (-) x Pr B (-)]}}{n^2}$

### Cálculos de Sensibilidad y Especificidad

Tabulación de los resultados de la serología

	HAI (+)	HAI (-)
ELISA (+)	<b>PV</b>	<b>FP</b>
ELISA (-)	<b>FN</b>	<b>NV</b>

Tabla N°2: Resultados de ELISA frente a HAI

La tabla anterior de doble entrada (Tabla N°2) simplemente nos permite evaluar los datos de sensibilidad y especificidad relativas para cada una de las técnicas y luego para las prevalencias totales, concordancias y específicas.

- *Cálculo de la sensibilidad relativa*

$$\text{Sensibilidad relativa} = \frac{\text{PV}}{\text{PV} + \text{FN}} \times 100$$

Donde: PV (verdaderos positivos): N° sueros reactivos a HAI y ELISA

FN (falsos negativos): N° sueros no reactivos a ELISA, pero reactivos a HAI.

- *Cálculo de la especificidad relativa*

$$\text{Especificidad relativa} = \frac{\text{NV}}{\text{NV} + \text{FP}} \times 100$$

Donde: NV (negativos verdaderos): N° sueros no reactivos a HAI ni al ELISA

FP (falsos positivos): N° sueros no reactivos a HAI pero reactivos al ELISA.

## IV.- RESULTADOS

### IV.1. – CALCULO DE PREVALENCIAS

En la Tabla N° 3 se identificó a todos los establecimientos muestreados asignándose una letra, la localidad y provincia de procedencia, así como el propietario del mismo. Se ponderó el número de animales, el sexo y la categoría de pertenencia (capones livianos o capones pesados).

Establ.	Localidad	Propietario	N° animales	Categoría	Sexo	
					M	H
A	San Genaro N SF	St...pa	15	capones	15	0
B	San Genaro N-SF	Ro....guez	15	capones	15	0
C	Totoras – SF	Pa....bi	9	capones	9	0
D	Arroyo Seco – SF	D...z	41	capones	9	32
E	Monte Buey M. Juárez – Cba	V....no	4	capones	4	0
F	Monte Buey M. Juárez-Cba.	Coop. Agric. Ganadera	19	capones	19	0
G	Monte Buey M. Juárez –Cba.	D.....z	17	capones pesados	7	10
H	Crespo – ER	Kr.....im	25	capón/cerdas	1	24
I	San Agustín - SF	G....a	10	capones	10	0
J	Monte Vera - SF	Beo....i	5	capones	0	5
K	Franck - SF	H.....en	18	capones	18	0

Tabla N° 3: Distribución de los establecimientos indicando la categoría de los animales muestreados.



En la Tabla N° 4, se consignó el número total de animales por establecimiento, confrontando el resultado de los positivos y negativos según la técnica, expresado en número y porcentajes.

	Establecimientos		Resultados HAI				Resultados ELISA			
	Identif.	N° anim	(+)	%	(-)	%	(+)	%	(-)	%
1	A	15	5	33,3 %	10	66,6%	8	53,4 %	7	46,6 %
2	B	15	2	13,33 %	13	86,6%	5	33,3 %	10	66,6 %
3	C	9	2	22,2 %	7	77,7%	2	22,2 %	7	77,7 %
4	D	41	16	39 %	25	60,9%	28	68,3 %	13	36,5
5	E	4	0	0	4	100 %	3	75 %	1	25 %
6	F	19	2	10,5 %	17	89,4 %	7	36,8 %	12	63,2 %
7	G	17	7	41,2 %	10	58,8 %	10	58,8 %	7	41,2 %
8	H	25	5	20 %	20	80 %	5	20 %	20	80 %
9	I	10	3	30 %	7	70 %	3	30 %	7	70 %
10	J	5	0	0	5	100 %	1	20 %	4	80 %
11	K	18	0	0	18	100 %	6	33,3 %	12	77,3 %

Tabla N° 4: Resultados serologías HAI y ELISA.

La totalidad de los establecimientos (independientemente de su procedencia y técnica empleada) presentaba al menos un animal positivo. Esta amplitud se estableció entre el 10 y el 68,3 % entre ambas técnicas serológicas empleadas.

#### IV.1. a.) PREVALENCIA TOTAL HAI

Mediante la prueba de HAI en la Tabla N°5, el 23,6% de los animales (42/178) fueron considerados reactivos a esta parasitosis, esto corresponde a casi uno de cada cuatro animales muestreados, sin discriminar por categoría o sexo.

Diagnóstico HAI	N°	%
Positivo	42	23,6
Negativo	136	76,4
Total	178	100.0

Tabla N° 5 Prevalencia de reactores a *Toxoplasma gondii*  
Prueba HAI

En este contexto, se determinó la situación sanitaria de los animales por positivos y negativos a ambas pruebas en la Tabla N° 6:

	<b>HAI</b>		Totales
	(+)	(-)	
ELISA (+)	39	39	79
(-)	3	97	100
	42	136	178

Tabla N° 6: Estado sanitario del total de los animales por HAI

- Determinamos la sensibilidad relativa a HAI:

$$\text{Se relat.} = \frac{a}{a + c} \times 100 = \frac{39}{39 + 3 (42)} \times 100 = 92,8\%$$

Caracterizamos así a la habilidad de esta prueba para determinar la proporción de enfermos reales dentro de los animales considerados como positivos.

- Sp relat. = E =  $\frac{d}{b + d} \times 100 = \frac{97}{39 + 97 (136)} \times 100 = 71,3 \%$

Habilidad de la prueba para determinar los verdaderos sanos, dentro de los negativos.

#### IV. 1. b) PREVALENCIA TOTAL ELISA

Mediante el test de ELISA, se demostró el 43,8 % de los animales (78/178) como reactores, tal como se aprecia en la Tabla N° 7:

Diagnóstico	N°	%
Positivo	78	43,8
Negativo	100	56,2
Total	178	100.0

Tabla N ° 7: Prevalencia de animales reactivos a *T.gondii*  
Prueba ELISA.

	<b>ELISA</b>		Totales
	(+)	(-)	
HAI (+)	39	3	42
(-)	39	97	136
	78	100	178

Tabla N ° 8: Estado sanitario del total de los animales  
Prueba ELISA.

Se determinó a continuación, la situación sanitaria de los animales estudiados, empleando los valores de la Tabla N° 8, en referencia a la técnica de ELISA.

$$\text{➤ Se relat.} = \frac{a}{a + c} \times 100 = \frac{39}{39 + 39 (78)} \times 100 = 50 \%$$

$$\text{➤ Sp relat.} = \frac{b}{b + d} \times 100 = \frac{3}{3 + 97 (100)} \times 100 = 97 \%$$

#### IV.1. c) PREVALENCIA TOTAL A AMBAS PRUEBAS

Considerando los resultados de ambas pruebas en forma simultánea, se obtuvo un nuevo cálculo de prevalencias, en donde los animales positivos fueron considerados como “CASOS” y los negativos estimados como “NO CASOS” o sanos:

Test 1	Test 2		Totales
	(+)	(-)	
(+)	39	3	42
(-)	39	97	136
Totales	78	100	178

Tabla N° 9: Resultados de los Test 1 y Test 2.  
PV: CASOS – NV: NO CASOS

En la Tabla N° 9, se señaló como PV (39) a las dos técnicas, por lo que se obtuvo de esta manera una prevalencia del  $21,9 \approx 22\%$  sobre el total de los animales muestreados, mientras que los NV (97) representó el  $54,5 \%$  de los mismos. Este grupo de animales fue seleccionado para los análisis de las prevalencias específicas.

#### IV.1. d) Cálculo de Concordancia

$$\text{Siendo CO} = (a + d) / n = 136 / 178 = 0,76$$

Este valor nos suministró la proporción de animales enfermos existentes en estado natural, independiente y anterior a la ejecución de la prueba (Cohen, 1960; Cochran, 2001). La Concordancia esperada (CE) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{CE} = \frac{(a+b) \times (a+c) + (c+d) \times (b+d)}{n^2}$$

$$\text{CE} = \frac{(42 \times 78) + (136 \times 100)}{178^2} = \frac{3276 + 13600}{31684} = \frac{16876}{31684} = 0,53$$

$$K = \frac{0,78 - 0,53}{1 - 0,53} = 0,5217 \approx 0,53$$

<i>Kappa</i>
0,53

kappa	Grado de acuerdo o Fuerza de concordancia
0,41 - 0,60	Moderado

Calculamos el grado de concordancia o acuerdo entre pruebas, siendo el  $K= 0,5$  por lo que el valor o fuerza de concordancia es considerado como moderado.

## IV.2.- PREVALENCIAS ESPECÍFICAS

### IV.2.a) PREVALENCIA POR GÉNERO

Extrayendo los valores a partir de la Tabla N° 9, en donde se especificaron como CASO a los PV a ambas pruebas, y como NO CASO a los NV; se discriminaron las proporciones según el género de los reactores. Los resultados no demostraron asociación entre la presencia de la enfermedad y el sexo de los animales. ( $p= 0,4443$ ).

Sexo	CASO	NO CASO	Total
Machos	25 <sub>(30%)</sub>	57	82
Hembras	14 <sub>(24%)</sub>	43	57
Total PV-NV	39 <sub>(28%)</sub>	100	139

Tabla N° 10: Frecuencia de reactores a ambas pruebas según el sexo

### IV. 2. b) PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR PROCEDENCIA

En la tabla que se presenta a continuación (Tabla N° 11) se agruparon los verdaderos positivos (PV) según la Provincia de procedencia de los animales, siendo complementado con el sexo de los mismos. Se pudo apreciar que Santa Fe agrupó la mayoría de las muestras, en segundo término estuvo la Provincia de Córdoba, y

finalmente se localizó a Entre Ríos con escasos 4 animales. La distinción de ambas pruebas diagnósticas, reveló la presencia de animales falsos positivos, llegándose a negativizar la respuesta en la Provincia de Entre Ríos, suprimiendo de esta manera, la disponibilidad de datos con valor estadístico.

Procedencia	PV - CASOS		total positivos	Total animales muestreados
	H	M		
Santa Fe	14	22	36 (31,8)	113
Córdoba	0	3	3 (7,6)	40
Entre Ríos	0	0	0	25
	14	25	39 (21,9)	178

Tabla N° 11: Frecuencia reactores a ambas pruebas según el sexo y procedencia

De los resultados finales por procedencia de las muestras (Tabla N° 11), se encontró que dentro del 21,9% de los positivos (39/178), Santa Fé presentó el 31,8 % de prevalencia total sobre su muestreo (36/113), pero estos valores representaron el 92,3 % sobre los CASOS o PV (36/39), Córdoba el 7,69% (3/39) mientras que Entre Ríos, no ofrecía reactores.

#### IV. 2.c) PREVALENCIA SEROLÓGICA POR CATEGORÍA DE ANIMALES

En la Tabla N°12, se aprecia la distribución de las categorías de capones livianos (CL) y capones pesados (CP) (menos y más de 150 kg respectivamente) según la reactividad serológica (casos y no casos).

Categoría	CASOS	NO CASO	Total animales muestreados
Livianos	27 <sub>(69)</sub>	134	161 <sub>(90)</sub>
Pesados	12 <sub>(70,6)</sub>	5	17
Totales	39 <sub>(PV)</sub>	139	178

Tabla N° 12: Clasificación de capones livianos y pesados según su respuesta serológica PV (CASOS)

Según lo presentado en la Tabla N°12, el 90% de los animales muestreados correspondió a los CL (161/178); correspondiendo al 69% de los reactores (CASOS) (27/39).

Otros resultados considerado del análisis, indicó la existencia de una **asociación** entre el **PESO** y **CASO/NO CASO**, la cual fue altamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Estos valores se correspondieron entre la categoría de pesados y sus reactores (12/17) demostrando que el 70,58 % eran positivos.

Inferimos de esta manera, una mayor positividad entre los pesados, la mayor edad y como consecuencia, un mayor tiempo de exposición al parásito.

Categoría	CL	CP	Total
Machos	20 <sub>(80%)</sub>	5	25 <sub>(64%)</sub>
Hembras	7	7	14
Total PV	27 <sub>(69%)</sub>	12	39 PV

Tabla N° 13 Distribución de los reactores considerados por categoría de faena y sexo.

En la Tabla N°13, el 69% de los animales positivos (PV) correspondió a los CL (27/39); y a su vez, donde el 80 % de los machos (20/27), demostró un mayor número de reactores.

Reflexionando sobre las categorías, estas representaron indirectamente a la edad de los animales y al peso final alcanzado. Los CL comprendieron a los machos castrados y a las hembras sin servicio menores al año de edad, y animales hasta 150 kg.; mientras que los segundos (CP); incluyeron a las hembras y padrillos que superaron el peso y la edad señalada.

Dentro de los **CL**, reaccionaron mayormente los **machos** (80 %) demostrando una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,05$ ).



## V- DISCUSIÓN

### V.1.- DE LA PREVALENCIA GENERAL

La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial cuya presentación depende de factores ligados al parásito o bien al hospedador. Para completar la tríada, se encuentra el medio ambiente, en donde conviven el agente y el hospedador, interactuando entre sí y con otras variables como son, las condiciones físicas del mismo: clima, topografía, flora, fauna, radiaciones y las condiciones socio económicas de la organización del medio, tales como: saneamiento, vivienda, trabajo, urbanización descontrolada (con la consiguiente marginalización de grupos de población), alimentación, cultura, hábitos y transporte, entre otros.

Un particular comportamiento epidemiológico ha sido demostrado en Argentina, con valores séricos que fluctuaron entre el 24% al 94,4% (Omata *et al.*, 1994). En este relevamiento efectuado en Santa Fe, se obtuvo el 25,5% de prevalencia (Tabla N° 11) (36/141), el cual ha resultado ser inferior a los informados por Pizzi *et al.*,(1987) con 38 % y Venturini *et al.*, (2004) con 37,1 %, lo que podría ser atribuido a cambios experimentados en la producción porcina, mayor tecnificación o simplemente, que las muestras procesadas a partir de las explotaciones no hayan sido lo suficientemente representativas, por lo que sus resultados deberían considerarse más un indicador de una situación local y no como reflejo de un status sanitario regional.

Según estudios realizados en otros países, (Smith *et al.*, 1992) las prácticas productivas establecerían diferentes respuestas, quienes, comparando la naturaleza de

las actividades, obtuvieron mayores porcentajes de cerdos positivos en establecimientos artesanales que en las de tipo industrial.

El análisis de la presencia de la enfermedad a *T. gondii* en el total de la muestra, no presentó una asociación entre la variable sexo y frecuencia (Tabla N°10) ( $p=0,4443$ ). Al respecto, diversos trabajos han encontrado tasas similares para machos y hembras (Balboa Castillo, 2008). Esto sugiere que en la distribución de la infección en cerdos según el sexo, tanto hembras como machos se encuentran expuestos a los mismos factores de riesgo para contraer la infección durante el ciclo de producción. Sin embargo, Assadi-Rad *et al.*, (1995) señalaron que las hembras en etapas reproductivas, conforman el grupo de mayor riesgo en la diseminación de *T. gondii*, esto podría deberse al estrés posparto y a la lactancia, convirtiéndose en el principal factor de propagación hacia los lechones lactantes, lo cual perpetúa la infección. En este último grupo etario, se observan las consecuencias más graves de la infección clínica, sin diferencias en la susceptibilidad al agente (Dubey, 2010).

La categoría promedio de faena de los cerdos es generalmente inferior al año de edad expresado como capones livianos (Tabla N°12), en donde se constató más del 90 % de los reactores. Cabe agregar que la población que se envía a los frigoríficos no representa un buen índice de la distribución etaria poblacional (Balboa Castillo, 2008).

Dentro de la variable peso, a pesar de la supremacía de los livianos, la categoría de capones pesados mostraron un mayor porcentaje de reactores con el 70,6% (12/17), demostrando así una asociación estadísticamente significativa entre el peso/edad y el índice de seropositividad ( $p < 0,0001$ ).

Estos resultados concordaron con los informes de Dubey *et al.*, (1995), quienes demostraron probabilidades superiores de infección debido al mayor tiempo de exposición y a la amplia variedad de fuentes o factores de riesgo a los que están expuestos (Aramini *et al.*, 1999; Smith, 1991; Venturini, 2000). Assadi-Rad *et al.*, (1995) coincidieron en señalar, que las tasas de infección en los cerdos aumentaban con la edad.

Al analizar las variables categoría de faena y sexo (Tabla N° 13), se observaron diferencias porcentuales a favor de los machos, con un 64% (25/39). Dentro de estos, el 80% (20/25) correspondieron a la categoría de capones livianos, demostrándose una asociación entre esta categoría y el sexo ( $p = 0,05$ ).

Observaron Dubey *et al.*, (1995) y Smith (1991) que la presentación de los reactores más destacados se concentraba mayormente entre los animales adultos y las hembras. Los resultados obtenidos coincidieron respecto de los adultos (asociándolos a los capones pesados) pero no con las hembras, sino por el contrario, los machos marcaron la diferencia. Se debe insistir en que la falta de conocimiento referido al manejo de los establecimientos, impiden dar una respuesta que no se base en especulaciones.

## **V.2.- DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

Los métodos serológicos desarrollados en la experiencia, correspondieron a técnicas que los expertos en el tema, les atribuyeron una adecuada capacidad discriminatoria (Blood y Radostits, 1992; Dubey and Beattie, 1988) para la

demostración de los objetivos planteados; no obstante, deberían profundizarse los ensayos a fin de recabar un mayor número de muestras, nuevas procedencias y además, registrar la frecuencia de falsos positivos.

Fueron seleccionados como enfermos, aquellos animales que tenían respuestas serológicas superiores a 1/32 siguiendo el criterio señalado por Dubey (2010) y Wyne de Martini y Martin (1977), quienes establecieron estos valores como compatibles con la enfermedad, pudiendo o no presentar sintomatología alguna.

Ambos métodos demostraron poseer gran confiabilidad y buena capacidad discriminatoria. Evaluando por separado la sensibilidad, la HAI mostró un 92,8 % frente al ELISA con el 50%, respecto de la especificidad del HAI 71,3 % y ELISA con 97 %.

Dubey (2010) señaló en sus experiencias con esta especie, haber tenido una sensibilidad del 29.4% en IHA y un 72.9 % para ELISA, mientras que la especificidad para los mismos tests fue calculado en 98,3 % HAI y un 85.9% para la técnica de ELISA.

Al respecto, Balboa Castillo (2008) mencionó sobre la publicación de numerosos estudios con una gran variedad de prevalencias, lo cual dificulta las comparaciones válidas, mientras que D'Angelino y Ishizuca (1986) atribuyen las diferencias a las técnicas empleadas, puesto que en su gran mayoría, habían desarrollado pruebas diferentes al ELISA, la cual posee una compleja estandarización de los antígenos, la uniformidad de las diluciones y el cotejo de los resultados.

Respecto del cálculo de concordancia o acuerdo entre pruebas en este trabajo se calculó un Kappa de 0,52; siendo considerado como de *acuerdo moderado*. Cerro *et al.*, (2009) realizaron una búsqueda de comparaciones entre estas técnicas, y obtuvieron valores de kappa de 0.26 y 0.36 lo cual es bajo o discreto, lo cual demuestra que las técnicas no pueden reemplazarse mutuamente.

El índice entre IFI y HAI se eleva a 0.73 en gatos, pero en porcinos estas relaciones se mantienen en 0.69 y 0.46, como en el presente estudio.

Waltman *et al.*, (1984) por su parte, sostienen que los resultados del ELISA ofrecen mayor consistencia y son más confiables que los ofrecidos por la hemaglutinación.

Todas estas consideraciones se refieren únicamente a la capacidad discriminatoria de una prueba. La decisión sobre qué prueba diagnóstica es más adecuada es una decisión compleja, puesto que intervienen factores como el costo de la prueba y obtención de las mismas, los muestreos deben ser representativos, la misma atención merece la evaluación de las categorías, la valoración de los falsos positivos y negativos, etc.

Hay que considerar que los resultados obtenidos son sólo estimaciones y están sometidos por lo tanto, a posibles errores de muestreo, por lo que habrá que efectuar contrastes estadísticos para determinar si pueden ser atribuibles o no al azar.

### **V.3- DE LAS EXPLOTACIONES**

Según los datos ofrecidos por la S.A.G.P. y A. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación) más de las dos terceras partes de los

establecimientos de porcicultura en la Provincia de Santa Fe, se encuentran dentro de las explotaciones de tipo extensivo, correspondiendo a pequeños y medianos productores (entre 50 y 150 has.) como actividad complementaria de la agricultura.

En la región central de la Provincia de Santa Fe, se ubica el 22,8% (Universo Porcino, 2005) de estas explotaciones, donde la producción está vinculada a las usinas lácteas, aprovechando el excedente de suero de queso durante la fabricación de los mismos, como parte de la alimentación en etapas de recría y terminación. El tipo de explotación más difundido se asemeja al semi industrial donde la población oscila entre 50 y 500 madres manejadas por el propietario y su familia o bien 1 ó 2 ayudantes. Estas empresas son sumamente vulnerables desde el punto de vista de las fluctuaciones en costos de insumos y servicios, así como de los altibajos del precio del cerdo en pie. Esta producción se encuentra entre el uso de tecnología primitiva y la de alta tecnificación. La resultante es muchas veces, el manejo de procesos tecnológicos distorsionados, mal entendidos y mal aplicados. (Ministerio de la Producción, 2008).

En vista de tal irregular y fluctuante panorama, sumado al desconocimiento de los tipos de explotación de procedencia, no es posible interpretar o justificar los resultados, puesto que el manejo es considerado como decisivo en las respuestas de los animales (Dubey *et al.*, 1995; Weigel *et al.*, 1999; Venturini *et al.*, 2004).

#### **V.4- SITUACIÓN SANITARIA ACTUAL**

La situación inmunológica de los porcinos examinados es interesante, dado que los establecimientos presentaron reactores entre el 10 al 68,3 % entre ambas técnicas

serológicas. Estos resultados serían sugerentes de un manejo relativamente deficitario por la cantidad de anticuerpos heterófilos, entre los cuales una quinta parte responde específicamente a esta parasitosis.

La toxoplasmosis alimentaria reviste un particular interés en materia de acciones preventivas, el cual estaría redimensionado a la luz del claro beneficio a largo plazo que ofrece el diagnóstico, considerando que en nuestro país la prevalencia de la infección toxoplásmica se estima en alrededor de 50% para la población de mujeres en edad reproductiva. Estas cifras globales nacionales coincidirían con la prevalencia estimada en diferentes estudios regionales, sin embargo, es importante destacar la gran variabilidad geográfica (Chiaretta, 2003; Venturini *et al.*, 2004) y de grupos socioeconómicos demostrados por muchos investigadores (Durlach, 2008).

Con el fin de conocer la prevalencia de toxoplasmosis en trabajadores de mataderos, pese a no ser considerada una enfermedad de tipo profesional, el Instituto Nacional de Salud de Colombia (Montealegre *et al.*, 2009) encontró que el 71.8% de los operadores eran positivos por Ig G, mientras que otras investigaciones desarrolladas en las mismas instituciones de San Pablo (Brasil) estas respuestas oscilaron del 72% al 90%. Si reflexionamos con estos valores como un reflejo del estado sanitario de los animales destinados a consumo, sería muy instructivo, poder estudiar este grupo poblacional como un nuevo indicador.

Todos los países deben enfrentar situaciones epidemiológicas complejas. Las enfermedades han estado presentes a lo largo de la historia mostrando comportamientos variables y, dependiendo de la implementación de medidas de control y políticas

sanitarias adecuadas, se podría instaurar la erradicación, o bien, se continuará con la evolución natural de las mismas.

Los hallazgos descritos en el presente estudio confirman la importancia de la carne de cerdo como integrante de la cadena epidemiológica de la enfermedad.

Se enfatiza como importante medida preventiva, efectuar una adecuada educación a la población sobre las características de esta zoonosis y los apropiados hábitos alimenticios.



## VI – CONCLUSIONES

Luego de finalizado el trabajo y según los resultados obtenidos, se pudieron señalar las siguientes conclusiones:

1) La investigación acerca de esta enfermedad, permitió demostrar que todos los establecimientos muestreados poseían al menos, un animal reactor a alguna de las técnicas serológicas empleadas.

2) La prevalencia general a partir del estudio efectuado en un frigorífico, fue del 21,9 % (39/178) lo cual no se corresponde con lo expresado en la hipótesis, donde se estimaba un valor que superaría al 35 %. Aún así, la situación de riesgo persiste tanto para los otros animales domésticos, como para las personas.

3) La prevalencia total demostrada en los animales procedentes de la Provincia de Santa Fe por HAI fue del 23,6 %, mientras que por ELISA se encontró un 43,8 % de reactores, el cual se corresponde con los informados por los referentes.

4) Es factible emplear la técnica de ELISA como prueba tamiz debido a su adecuado poder discriminatorio, buena correlación con HAI y gran especificidad.

5) Las condiciones particulares de manejo en las explotaciones porcinas determinan el comportamiento epidemiológico de la toxoplasmosis. Estas prevalencias confrontadas con las informadas en otros estudios, indican que la situación sanitaria de

esta especie de consumo debería ser tomada en cuenta. El número de establecimientos con animales positivos a la parasitosis fue del 72,7 % (8/11) indicando que la mayoría de los establecimientos estuvo de alguna manera, expuesto al parásito.

6) Finalmente, los resultados de este trabajo podrían establecer un contexto de referencia, para la continuidad de otros estudios referidos a técnicas de screening y cuantificar la situación epidemiológica real de esta enfermedad.

**VII – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ACHA P.N.; SZYFRES B. (2003) Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Parasitoses, 3rd Ed. PanAmerican Health Organization (PAHO), Washington, DC. 3: 34-38.
2. ANDERSON, S. (1979) *Toxoplasma gondii*. Principles and practice of infectious diseases. New York: John Wiley & Sons. p. 2127-37.
3. APPLEFORD, P.; SMITH, J. (1997). *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. Acta Trop. 65:97-104.
4. ARAMINI, J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J.P. (1999). *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. J Parasitol. 84: 438-40.
5. ARIAS, M. L.; CHINCHILLA, M.; REYES, L.; LINDER, E. (1996) Seroepidemiology of toxoplasmosis in human: possible transmission routes in Costa Rica. Rev Biol Trop. 44: 377-81.
6. ASSADI-RAD, A.; NEW, J.; PATTON, S. (1995) Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee. Vet. Parasitol. 57: 289-297.
7. BAHIA-OLIVEIRA, L.; JONES, J.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES C.; FERNANDO, O.; ADDISS, D. (2003) Altamente endémica, la toxoplasmosis transmitida por el agua en el norte de Rio de Janeiro, Brasil. Emerg Infect Dis. 9: 55-62.
8. BAKOS, E.; ZURBRIGGEN, M.; BENITEZ, G. de (1985) Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en ovinos de la Provincia de Corrientes por medio de la hemoaglutinación indirecta. Vet. Arg. 11. 734-739.

9. BALBOA CASTILLO, J.A. (2008) Evaluación serológica del *Toxoplasma gondii* en suinos mediante la prueba de ELISA en plantas faenadoras de la IX y XIV regiones de Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Medicina Preventiva.
10. BECKERS, C.; DUBREMETZ, J.; MERCEREAU, Y.; JOINER, K. (1994) Rhoptry protein RP 2 of *Toxoplasma gondii*. J. Cell. 127: 947-961.
11. BENVISSUTO, G.; MILESI, R.; PIZZI, H.; CARBALLADA, H (1985) Estudio serológico de toxoplasmosis en bovinos de la Provincia de Santa Fe, Argentina. Vet. Arg.19: 854-856.
12. BESSO, R.; PERALTA, L.; RENAULT, A; DASSO, L.; GHERARDI, S.; RONDELLI, F.; FRANCOIS, S.; ARESTEGUI, M.; GUALTIERI, C. (2002) Prevalencia de brucelosis, leptospirosis y toxoplasmosis en alumnos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Casilda. Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2003 Fac. de Ciencias Veterinarias, UNR. Casilda. Santa Fe. Argentina. Trabajo N°13.
13. BLOOD, D.; RADOSTITS, O. (1992) Medicina Veterinaria. Ed. Interam.España. 6ª ed. p 1083-1087.
14. BOWIE, W.; KING, A.; WERKER, D.; ISAAC-RENTON, J.; BELL, A.; ENG, S.; MARION, S. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet; 350: 173-7.
15. BRAUND, K.G. (2003) Inflammatory Diseases of the Central Nervous System. Clinical Neurology in Small Animals - Localization, Diagnosis and Treatment, K.G. Braund (Ed.) Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA. <http://www.ivis.org/>

16. BROWN, C.; HUNTER, C.; ESTES, R.; BECKMANN, E.; FORMAN, J.; DAVID, C.; REMINGTON, J.; MCLEOD, R. (1995). Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. *Immunology*. 85: 419-428.
17. BUXTON, D.; FINLAYSON, J. (1986) Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus, *J.Comp Pathol*. 96: 319-333.
18. BUXTON, D. (1998) Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res*. 29:289-310.
19. CASTRO, A.T.; GONGORA, A.; GONZALEZ, M.E. (2008) Seroprevalencia de anticuerpos a *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas de Villavicencio, Colombia. *Orinoquia*. 12: 91-100.
20. CERRO, L.; CHAVEZ, V; CASAS, A. (2009) Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en gatos de Lima Metropolitana y concordancia entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta. *Rev. investig. vet. Perú*. [online]. 20: 285-290. ISSN 1609-9117. Technical Tips on Line: [Http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172009000200020&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172009000200020&lng=es&nrm=iso).
21. CIUTAD, J.; JATABA, A. (2010). Proyectos de inversión: carne de cerdo. Servicio de Consultoria. Technical Tips on Line. [Http://www.porkconsulting.com/manuales/Proyectos.pdf](http://www.porkconsulting.com/manuales/Proyectos.pdf)

22. CHIAPPINO, M. L.; NICHOLS, B.; O'CONNOR, G. (1984). Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. J. Protozool. 31: 288-292.
23. CHIARETTA, A.; SBAFFO, A.; CRISTOFOLINI, A.; MOLINA, M. (2003) Estudio seroepidemiológico de la toxoplasmosis en niños de áreas de riesgo de la ciudad de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. Parasitol. Latinoam. 58: 112-117.
24. CHRISTIE, E.; PAPPAS, P.; DUBEY, J. (1978) Ultrastructure of excystment of *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Protozool. 25: 438-443.
25. COCHRANE COLLABORATION (2001) International Epidemiological Association. 4th Edition. Oxford; New York: Oxford University Press, <http://www.cochrane.org/>
26. COHEN, J. (1960) Un coeficiente de concordancia entre las escalas nominales. Educational and Psychological Measurement, 20: 37-46.
27. CONSENSO TOXOPLASMOSIS CONGENITA. CTC. ASOCIACION ARGENTINA DE ZOONOSIS (2005) Soc. Arg. Infectol. Instituto Zoonosis Luis Pasteur. Ciudad de Buenos Aires p 10.
28. CORNELISSEN, A.; OVERDULVE, J.; HOENDERBOOM, J. (1981) Separation of *Isospora (Toxoplasma) gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. Parasitol. 83: 103-108.
29. CORREA, C.; CEDEÑO, I.; DE ESCOBAR, C.; FUENTES, I. (2008) Increased urban seroprevalence of *T. gondii* infecting swine in Panamá. Vet. Parasitol. 153: 9-11

30. COOK, A.; GILBERT, R.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. & DUNN, D. (2000) Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Br. Med. J. 321: 142-147.
31. D'ANGELINO, J.L. (1983) Toxoplasmose suína: contribuição para o estudo epidemiológico. Tesis de Doctorado. Fac. Salud Pública, Univ. São Paulo, São Paulo. Brazil. II: 2 p.
32. D'ANGELINO, J.; ISHIZUKA, M. (1986) Toxoplasmose suína. Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. Bol. Of. Sanit. Panam. 100: 634-645.
33. DARDÉ, M.; BOUTEILLE, L.; LEBOUTET, L.; LOUBET, A.; PESTRE-ALEXANDER, M. (1989) *Toxoplasma gondii*: étude ultrastructurale des formations kystiques observées en culture de fibroblastes humains. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 64: 403-411.
34. DE LA ROSA, M.; BOLIVAR, J., PEREZ, H. (1999) Infección por *Toxoplasma gondii* en amerindios de la selva amazónica de Venezuela. Rev. MEDICINA (Buenos Aires). 59: 759-762. ISSN 0025-7680.
35. DE SANTIS, J.P. (2011) Los argentinos tienen el menor consumo de carne de los últimos 53 años. Technical Tips On Line. <http://fortunaweb.com.ar>. [Http://fortunaweb.com.ar/2011-09-13-64726-los-argentinos-tienen-el-menor-consumo-de-carne-de-los-ultimos-53-anos/](http://fortunaweb.com.ar/2011-09-13-64726-los-argentinos-tienen-el-menor-consumo-de-carne-de-los-ultimos-53-anos/)
36. DESMONTS, G.; COUVREUR, J. (1979) Congenital toxoplasmosis. A prospective study of the offspring of 542 women who acquired toxoplasmosis during pregnancy. Perinatal Medicine. Sixth European Congress. Stuttgart Germany. P 51-60.

37. DI LORENZO, C., VENTURINI, C., CASTELLANO, C., VENTURINI, L., UNZAGA, J., BACIGALUPE, D. (1997). Detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* y anti-*Toxoplasma gondii* en perros de área urbana. Rev. Med. Vet. 78: 325-326.
38. DUBEY, J.P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. (1970). Characteristics of a new fecal form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 56: 447-56.
39. DUBEY, J.; FRENKEL, J. (1972) Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J. Protozool. 19: 155-177.
40. DUBEY, J.; FRENKEL, J. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. J. Protozool. 23: 537-546.
41. DUBEY, J.P. (1977). *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals, In J. P. Kreier (ed.), Parasitic protozoa, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y. p. 101-237.
42. DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. (1988) Toxoplasmosis of animal and man. CRC Press. Inc. Boca Ratón. Florida. USA.
43. DUBEY, J.; JOHNSTONE, I.; MENRATH, V.; TOPPER, M. (1989) Congenital Toxoplasmosis in Abyssinian cats. Vet. Parasitol. 32: 261-264.
44. DUBEY, J.; THULLIEZ, P. (1989) Serological diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. JAVMA. 194: 1297-1299.
45. DUBEY, J.; FENNER, W. (1993) Clinical segmental myelitis associated with an unidentified *Toxoplasma* -like parasite in a cat. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 472-480.
46. DUBEY, J.P., WEIGEL, R.M., SIEGEL, A.M., THULLIEZ, P., KITRON, UD., MITCHELL, M.A., MANNELLI, A., MATEUS-PINILLA, N.E., SHEN, K,



KWOK, O.C.H. Y TODD, S. (1995). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81: 723-729.

47. DUBEY, J.; LINDSAY, D. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii*: Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiol. Reviews.* 11: 267-299.

48. DUBEY, J. P. (1998) Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol. International Journal for Parasitol.* 28:1019-1024.

49. DUBEY, J.P., THAYER, D.W., SPEER, CA. Y SHEN, S.K. (1998) Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int.J.Parasitol.* 28: 369-375.

50. DUBEY, J.; VENTURINI, M.; VENTURINI, L.; MC KINNEY, J.; PECORARO, M. (1999) Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet Parasitol.* 86: 59-62.

51. DUBEY, J.; GRAHAM, D.; BLACKSTON, C.; LEHMANN, T.; GENNARI, S.; RAGOZO, A.; NISHI, S.; SHEN, S.; KWOK, O.; HILL D.; THULLIEZ, P. (2002) Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings, *Int.J.Parasitol.* 32: 99-105.

52. DUBEY, J.; GRAHAM, D.; DA SILVA, D.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. (2003) *Toxoplasma gondii* Isolates of Free-Ranging Chickens From Rio de Janeiro, Brazil: Mouse Mortality, Genotype, and Oocyst Shedding by Cats. *Journal of Parasitology.* 89: 851-3.

53. DUBEY, J. (2004) Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126: 57-72.

54. DUBEY, J.P. (2010) *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Second Edition. CRC Press Taylor & Francis Group. USDA/ARS. Beltsville, Maryland, U.S.A. 313 p. ISBN 978-1-4200-9236-3.
55. DURLACH, R.; KAUFER, F.; CARRAL, L. (2003) Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas en la República Argentina. XI Congreso Panamericano de Infectología. Córdoba, p. 74.
56. DURLACH, R., KAUFER, F., CARRAL, L., FREULER, C., CERIOTTO, M., RODRIGUEZ, M., FREILIJ, H., ALTCHER, J., VAZQUEZ, R., CORAZZA, R., GUARNERA, E. (2008) Consenso Argentino de Toxoplasmosis congénita. Rev. MEDICINA. 68: 75-87. ISSN 0025-7680.
57. DURLACH, R.; MARTINO, P (2009) *Toxoplasma gondii*: infección en perros y gatos. Rev. Med. Vet. 29: 285. ISSN 1852-317X
58. FERGUSON, D.; BIRCH-ANDERSEN, A.; SIIM, J.; HUTCHISON, W. (1978) Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 86: 165- 167.
59. FERGUSON, D.; BIRCH-ANDERSEN, A.; SIIM, J.; HUTCHISON, W. (1979) An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 87:277-283.
60. FERGUSON, D.; HUTCHISON, W.; PETTERSEN, E. (1989) Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. Parasitol. Res. 75: 599-603.

61. FLORES, A. (1991) La toxoplasmosis: consideraciones económicas, técnicas y sanitarias. Hospital Centro Policlínico Veterinario, Malaja, España. Publicación: "Nuestra Cabaña". 230: 16-23. [Http://www.veterinaria.org/ajfa/art18.htm](http://www.veterinaria.org/ajfa/art18.htm)
62. FRENKEL, J. K. (1970) Pursuing *Toxoplasma*. J. Infect. Dis. 122:553-559.
63. FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.; MILLER, N.L. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats. Fecal stages identified as coccidian oocysts. Science. 167: 893-896.
64. FRENKEL, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. BioScience 23:343-352.
65. FRENKEL, J.; DUBEY, J.; HOFF, R. (1976). Loss of stages after continuous passage of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. J. Protozool. 23:421-424
66. FRENKEL, J.; FRIEDLANDER, S. (1951) Toxoplasmosis. Pathology of neonatal disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment. PHS publication 141. Government Printing Office, Washington, D.C.
67. GORODNER, J. (2002) Curso Virtual de Actualización Pediátrica. Patología regional del noreste argentino: toxoplasmosis. <http://www.doctorsoftware.com.ar>  
[http://www.doctorsoftware.com.ar/documentos/curso\\_toxoplasmosis\\_02.html](http://www.doctorsoftware.com.ar/documentos/curso_toxoplasmosis_02.html)
68. GROSS, U.; BOHNE, W. (1994) *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. J. Eukaryot. Microbiol. 41: 10S-11S.
69. GURY DOHMEN, F. E. (1995). Toxoplasmosis en perros y gatos de Buenos Aires. Rev.Med.Vet. (Buenos Aires). 76: 65-68.
70. HIRAMOTO, R.; MAYRBAURL-BORGES, M.; GALISTEO, A.; MEIRELES, L.; MACRE, M.; ANDRADE, H. (2001) Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. Rev. Saude. Publica. 35: 113-118.

71. ISAAC-RENTON, J.; BOWIE, W.R.; KING, A.; IRWIN, G.S.; ONG, C.S.; FUNG, C.P.; SHOKEIR, M.O.DUBEY, J.P. (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl. Environ.Microbiol.* 64: 2278-80.
72. JACOBS, L.; REMINGTON, J.; MELTON, M. (1960) The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 46: 11-21.
73. JEWELL, M.L.; FRENKEL, J.K.; JOHNSON, K.M.; REED, V.; RUIZ, A. (1972) Development of *Toxoplasma* oocysts in Neotropical Felidae. *Am J Trop Med Hyg*; 21: 512-7.
74. KANETO, C.; COSTA, A.; PAULILLO, A.; MORAES, F.; MURAKAMI, T.; MEIRELES, M. (1997) Experimental toxoplasmosis in broiler chicks, *Vet.Parasitol.* 69: 203-210.
75. LARSEN, W; FRENKEL, J.; AMARE, M. (1978) Immune competence in a patient with Hodkin's disease and relapsing toxoplasmosis infection. 6:84-91.
76. LEVADITI, C.; SCHOEN, R.; SANCHIS BAYARRI, V. (1928) L'encéphalomyélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 99:37-40.
77. LINDSAY, D.; TOIVIO-KINNUCAN, M.; BLAGBURN, B. (1993) Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J. Parasitol.* 79:289-292.
78. LINDSAY, D.; BLAGBURN, B.; DUBEY, J.P. (2002). Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet Parasitol*; 103:309-313.
79. MARDER, G.; SERAFINI, W.; ULON, S. (1990) Prevalencia de anticuerpos toxoplásmicos en personas y animales domésticos y salvajes. *Vet.Arg.* 7: 43-49.

80. MATSUBAYASHI, H.; AKAO, S. (1963) Morphological studies on the development of the *Toxoplasma* cyst. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 321-333.
81. MC HUGH, T.; HOLLIMAN, R.; BUTCHER, P. (1994) The *in vitro* model of tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Today. 10: 281-285.
82. MILLS, N.; FRENKEL, J. K; DUBEY, J. P. (1997) Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and in birds. J Parasitol. 58: 928-937.
83. MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN. GOBIERNO DE SANTA FE (2008) Cadena de la Carne Porcina. <http://www.santafe.gov.ar/>.  
<http://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/66091/320769/file/descargar.pdf>
84. MONTEALEGRE, I.; VALBUENA, Y.; CORTES, L.; FLÓREZ SÁNCHEZ, A. (2009) Seroprevalencia de la toxoplasmosis y factores relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos en trabajadores de plantas de beneficio animal en cinco ciudades capitales de Colombia. Nova - Publicación científica en Ciencias Biomédicas. ISSN: 1794-2470. 7:1-110.
85. OCAMPO, H. (2012). El consumo per cápita de carne porcina aumentó 15% en 2011. Los productores destacan la buena labor de la Mesa del Cerdo de INAC. Technical Tips On Line. <http://www.elobservador.com.uy/noticia/216583/el-consumo-per-capita-de-carne-porcina-aumento-15-en-2011/>
86. OMATA, Y.; DI LOREZO, C.; VENTURINI, C.; VENTURINI, L.; IGARASHI, I.; SAITO, I.; SUZUKI, N. (1994) Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. Vet. Parasitol. 51: 205-210.

87. ORTEGA, D. (2008) Informe Técnico científico: Investigación de uso del banco de sueros humanos y animales para determinar prevalencia de toxoplasmosis. Identificación de factores de riesgo. Secretaria de salud. Bogotá. Colombia. (C059/2007) P. 238.
88. PAVESIO, C.; CHIAPPINO, M.; SETZER, P.; NICHOLS, B. (1992) *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. Parasitol. Res. 78: 1-9.
89. PERETTI, L.; GONZALEZ, V.; MARCIPAR, I.; GUGLIOTTA, L. (2011) Látex funcionalizados y sensibilizados con proteínas recombinantes para detectar Toxoplasmosis por Inmunoaglutinación. XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Cordoba. Argentina. P 606.
90. PERFUMO, C. J.; BRANDETTI, E.; MENENDEZ, N. A.; PETRUCCELLI, M.A. (1978) Toxoplasmosis en conejos domesticos. Analecta Veterinaria. 10: 21-27.
91. PETERSEN, E. K. (1979) Destruction of *Toxoplasma gondii* by HCl solution. Acta Pathol. Microbiol. 87: 217-220.
92. PIEKARSKI, G; PELSTER, B.; WITTE, H. (1971) Endopolygeny in *Toxoplasma gondii*. Z. Parasitenkd. 36: 122-130.
93. PIZZI, H.; BENVISSUTO, G.; CARBALLADA, H. (1987) Estudio serológico de toxoplasmosis en porcinos de la Prov. de Santa Fe. Vet. Arg. 4: 138-139.
94. REMINGTON, J. S. (1970) Studies on toxoplasmosis in El Salvador. Prevalence and incidence of toxoplasmosis as measured by the Sabin-Feldman dye test. Trans R Soc Trop Med Hyg. 64: 252-67.

95. ROSSO, F.; AGUDELO, A. ISAZA, A.; GILBERTO MONTOYA, J. (2007) Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. Corporación Editora Médica del Valle. Colomb Med. 38: 316-337.
96. S.A.G.P. y A. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación. <http://www.minagri.gob.ar>
97. SCANDIZZO, H.; BERNSTEIN, J. (2008) Seroprevalencia de toxoplasmosis en embarazadas del partido de Florencio Varela, Buenos Aires. Argentina. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis – VI Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires. Argentina. P045. (B1888IQF).
98. SCHLUNDT, J.; TOYOFUKU, H.; CANSEN, J. (2004) Emerging food-borne zoonoses: Rev sci.tech. Off. Int. Epiz, 32: 514-533.
99. SEMINARIO “LAS ENFERMEDADES TRANSMISIBLES EN EL URUGUAY” (2001) Universidad de la Republica – Facultad de Medicina – Minsiterio de Salud. OPS- OMS HCP. HCV. Uruguay. - ISSN 1510 - 4850
100. SHARMA, S.; DUBEY, J. (1981) Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and trypsin solutions. Am. J. Vet. Res. 42: 128-130.
101. SMITH J.L. (1991) Foodborne toxoplasmosis. *Journal of Food Safety. Food & Nutrition Press. Inc. Trumbull, Conn.* 12: 17-57.
102. SMITH, K.E.; ZIMMERMAN, J.J.; PATTON, S.; BERAN, G.W.; HILL, H.T. (1992). The epidemiology of toxoplasmosis on Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. Vet. Parasitol. 42: 199-211.
103. SOULSBY, E. (1987) Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Ed. Interamericana. 7ª Ed. México. p 681-693.

104. SPEER, C.; DUBEY, J; BLIXT, J.; PROKOP, K. (1997) Time lapse video microscopy and ultrastructure of penetrating sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles, and the transformation of sporozoites to tachyzoites of the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 83: 565-574.
105. TARABLA, H. (2000). Epidemiología diagnóstica. Centro de Publicaciones. Secretaria de Extensión de la UNL. Santa Fe, UNL. Argentina. pp
106. TOMAVO, S.; FORTIER, B.; SOETE, M.; ANSEL, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. (1991) Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 59: 3750-3753.
107. TRABATTONI, E.; LAVARONI, O.; VERA, E.; GARCIA, N.; DALLA FONTANA, M. L.; ACHKAR, G.; ROSSI, A. (2008). Prevalencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* en alumnos de Ciencias Veterinarias – Revista Fave - UNL – Esperanza. 7: 83-90. ISSN 1666-938X.
108. UCCELLI, J.L. (2011) Publicación: PORCICULTURA. Importación de Carne Porcina: Consumo Carne Fresca. Presidente Asociación Argentina Productores de Porcinos (AAPP), Comunicado de Prensa, Buenos Aires. Technical Tips On Line. <http://www.engormix.com/MAporcicultura/frigorifico/articulos/importacion-carne-porcina-consumo-t3656/378-p0.htm>.
109. ULON, S. N.; MARDER, G. (1990) Tasas de infección toxoplásmica en el hombre y su relación con los animales domésticos en la ciudad de Corrientes. Vet. Arg. 68: 518-522.
110. Universo Porcino. El portal del cerdo. (2005) Producción Porcina. Provincia de Santa Fe. <http://www.aacporcinos.com.ar/>  
[http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/santa\\_fe\\_produccion\\_porcina.html](http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/santa_fe_produccion_porcina.html)
-



111. VAN DER WAAIJ, D. (1959) Formation, growth and multiplication of *Toxoplasma gondii* cysts in mouse brains. Trop. Geogr. Med. 11: 345-360.
112. VENTURINI, L.; OMATA, Y.; VENTURINI, M. (1992) Diagnóstico de Toxoplasmosis durante el período patente en un gato doméstico. Vet. Arg. 9: 528-531.
113. VENTURINI, M.; DI LORENZO, C.; CASTELLANO, M.; UNZAGA, J.; VENTURINI, L. (1995) Detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en gatos mediante las pruebas de Inmuno-fluorescencia y de aglutinación de látex. Vet. Arg. 12. 111: 48 – 50.
114. VENTURINI, L.; VENTURINI, M.; OMATA, Y.; DI LORENZO, C.; DE CAROLIS, G. (1997). *Toxoplasma gondii*: la respuesta inmune por Ig G durante el período patente en un gato doméstico infectado naturalmente. Rev. Med. Vet. 78: 259-260.
115. VENTURINI, M.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; MACHUCA, M.; PERFUMO, C.; DUBEY, J.P. (1999) Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stillborn piglets in Argentina. Vet Parasitol. 85: 331-4.
116. VENTURINI, M. (2000) Algunos aspectos de toxoplasmosis en Medicina Veterinaria. Red de Helminología para América Latina y El Caribe. FAO-INTA. <http://www.cnia.inta.gov.ar/helminto>
117. VENTURINI, M; BACIGALUPE, D; VENTURINI, L.; RAMBEAUD, M.; BASSO, W.; UNZAGA, J.; PERFUMO, C. (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.

118. VIVIER, E. (1970) Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de *Toxoplasma gondii* et considérations sur la notion d'endogenèse. C. R. Seances Acad. Sci. 271: 2123-2126.
119. WALSH, C.; HAMMOND, S.; ZAJAC, A.; LINDSAY, D. (1999) Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: Potential source of human toxoplasmosis. J. Eukaryot. Microbiol. 46: 73S-74S.
120. WALTMAN, W.; DREESEN, D.; PRICKETT, M.; BLUE, J.; OLIVER, D. (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine: interpreting assay results and comparing with other serological tests. Am. J. Vet. Res., 45: 1719-1725.
121. WEBSTER, J.P. (1994) Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. Parasitology. 108: 407-11.
122. WEIGEL, R.M.; DUBEY, J.P.; SIEGEL, A.M.; KITRON, U.D.; MANNELLI, A.; MITCHELL, M.A.; MATEUS-PINILLA, N.E.; THULLIEZ, P.; SHEN, S.K.; KWOW, O. (1995) Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. J.Parasitol. 81: 736-41.
123. WEIGEL, R.M.; DUBEY, J.P.; DYER, D.; SIEGEL, A. (1999) Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for resident and workers on swine farms in Illinois. Am.J.Trop.Med.Hyg. 60:793-8.
124. WYNNE de MARTINI, G.; MARTIN, A. (1977). Prueba de hemoaglutinación para toxoplasmosis en distintos sueros animales. Rev.Med.Vet. (Buenos Aires) 58: 437-439.

125. ZAPATA, M; REYES, L.; HOLST, I. (2005) Disminución en la prevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en adultos del valle central de Costa Rica. Parasitol. Latinoam. 60: 32–37.

## **VIII.-ANEXO TÉCNICAS Y SOLUCIONES**

### **FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA HAI**

El reactivo consiste en una suspensión de hematíes estabilizados, sensibilizados con antígeno purificado obtenido a partir *Toxoplasma gondii* cultivado en exudado peritoneal de ratón.

Estos hematíes reaccionan con los anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente, formando una malla homogénea en la policubeta (caso positivo).

Si los anticuerpos específicos están ausentes, los hematíes sedimentan formando un botón nítido en la policubeta (caso negativo).

El equipo para realizar Hemoaglutinación indirecta (HAI), proporciona el material para la rápida determinación de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*.

La Aglutinación emplea un antígeno que consiste en trofozoitos enteros formalinizados o fijados con acetona. La muestra de suero debe ser previamente tratada para eliminar las IgM. La lectura de los resultados da títulos muy altos. La Hemaglutinación indirecta emplea como soporte del antígeno hematíes tratados con glutaraldehído. El antígeno empleado es diferente según la marca productora (de membrana o citoplásmicos). Se basa en la medida de la afinidad (avidez) de los anticuerpos por su antígeno. Durante la fase inicial de su producción poseen una afinidad baja y a medida que transcurre el tiempo esta aumenta progresivamente. La sexta semana de la infección es el punto de inflexión en el cambio de la avidez. Con esta prueba se puede discriminar muy bien la infección reciente de la antigua, quizás mejor que con la determinación de IgM. Es muy sensible.

### **PROCEDIMIENTO.**

#### **I- TITULACION SIN 2-ME**

1) Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.

2) Tomar una alícuota de cada suero o controles a ensayar con microdilutores de 25 ul (uno para cada muestra) y colocar en los pocillos de la columna 1. Se utilizarán tantas hileras horizontales como sueros o controles deban procesarse.

3) Realizar diluciones a partir de la columna 1 (dilución 1/2), pasando los microdilutores a la columna 2 (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la columna 6 (dilución 1/64). Si se procesaran más de 8 sueros, se utilizarán las columnas 7 a 12, realizando las diluciones de la manera antes descrita.

4) Colocar en las columnas 1 y 2 (diluciones 1/2 y 1/4) una gota (25 ul) de GR no sensibilizados, para control de heterofilia. Hacer lo mismo en las columnas 7 y 8 en caso de ser empleadas.

5) En el resto de los pocillos, agregar una gota (25 ul) de Antígeno HAI.

6) Agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales, durante 30 segundos por lo menos.

7) Dejar en reposo, al resguardo de vibraciones, durante 90 minutos.

8) A partir de los 90 minutos, leer. Se puede aumentar la nitidez de la imagen, leyendo sobre un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco y traslúcido entre la policubeta y la fuente de luz.

## II- TITULACION CON 2-ME

1) Colocar una gota de suero o controles en cada uno de los pocillos de la columna 1 (y 7 si es necesario), empleando espátulas-gotero descartables (una por cada suero) en posición vertical.

2) Agregar una gota de 2-Mercaptoetanol al 1% a los mismos pocillos, utilizando una espátula-gotero descartable.

3) Sellar los pocillos con cinta adhesiva y agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales.

4) Incubar 30-60 minutos a 37°C o 90 minutos a temperatura ambiente.

5) Retirar la cinta adhesiva, pasar un trapo húmedo por la base de la policubeta y, con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Suero HAI en los pocillos restantes de las hileras utilizadas.

6) Realizar los pasos 3 al 8 descritos en la Titulación I.

## III- TECNICAS ALTERNATIVAS

Cuando se estudian sueros altamente reactivos o en caso de poblaciones con una elevada prevalencia de toxoplasmosis donde habitualmente se encuentran títulos superiores a 1/32 pueden emplearse algunas de las siguientes técnicas alternativas:

**Técnica alternativa 1:** Continuar con las diluciones hasta la columna 12 inclusive con lo que se obtiene una dilución final de 1/4.096.

**Técnica alternativa 2:** Colocar en un tubo "ad-hoc" 50 ul de suero y 350 ul de Diluyente de Sueros HAI (dilución 1/8). Tomar 25 ul de esta dilución y colocarla en la columna 1 de la policubeta. Proseguir según se describe en I, hasta la columna 6. De esta forma se obtiene una dilución final de 1/512.

#### IV- ABSORCION SOBRE GLOBULOS ROJOS NO SENSIBILIZADOS

En sueros que presenten heterofilia los anticuerpos heterófilos pueden absorberse sobre GR no sensibilizados de la siguiente forma: en un tubo de hemólisis con tapón colocar 50 ul de GR no sensibilizados provistos + 50 ul de suero en ensayo. Dejar la suspensión durante 30 minutos a 37oC agitando de tanto en tanto. Luego centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos. Del sobrenadante se toman 50 ul y se emplea como dilución 1/2, colocándola en la primera columna. Si se emplea en titulación con 2-ME esta columna corresponde a dilución 1/4.

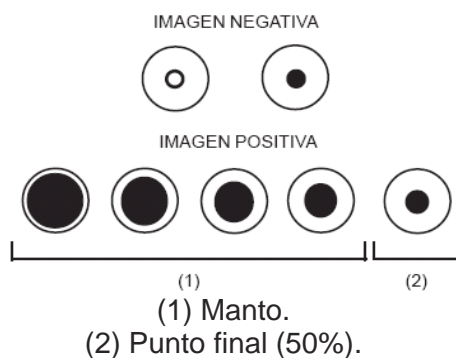
#### INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

##### Titulación sin 2-ME

Títulos  $\geq 1/16$  significan mayor probabilidad de infección toxoplásmica a fin de determinar una primoinfección reciente deben procesarse 2 muestras tomadas con un intervalo de 2-3 semanas. Un aumento de título mayor de 2 diluciones entre la 1ra y 2da muestra indican infección recientemente adquirida.

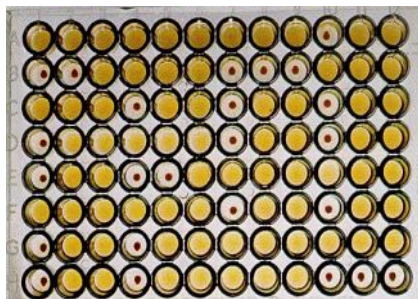
##### Titulación con 2-ME

La aparición de títulos bajos en la titulación sin 2-ME y reactividad con glóbulos rojos no sensibilizados que desaparece al efectuar la titulación con 2-ME y/o absorción con GR no sensibilizados, serían indicativos de la existencia de heterofilia. Por el contrario, títulos elevados sin el empleo de 2-ME que disminuyen considerablemente al utilizar 2-ME indicarían la presencia de IgM, característica de infección aguda. Los controles de heterofilia en este caso deben dar reacción negativa en el suero sin tratar o tras absorción con GR no sensibilizados.



**No Reactivo:** presencia de un sedimento en forma de botón  
O pequeño anillo de bordes regulares.

**Reactivo:** formación de una película o manto que cubre el  
50% o más del fondo de los pocillos.



LECTURA RESULTADOS: Policubeta mostrando diferentes resultados de la técnica.

### TECNICA DE ELISA - FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El presente kit se basa en el método inmunoenzimático (ELISA) y más precisamente es un método inmunoenzimático de tipo “captura” para la determinación cualitativa de las IgM específicas anti-Toxoplasma. Durante la primera incubación los anticuerpos anti-Toxoplasma de clase IgM eventualmente presentes en el suero, son capturados por los anticuerpos anti cadenas  $\mu$  de las IgM humanas, adheridos a la superficie de los pocillos.

El material que no se haya unido se elimina mediante lavado. En dos sucesivas incubaciones se hace reaccionar una mezcla de antígeno Toxoplasma-anticuerpo monoclonal anti-Toxoplasma biotilnado y streptavidina-HRPO con el complejo ya formado entre IgM específicas anti-Toxoplasma y anticuerpos anti cadenas  $\mu$ . Tras un nuevo lavado se añade la tetrametilbencidina (TMB) incolora que, al reaccionar con la peroxidasa presente, produce un compuesto coloreado. La reacción de desarrollo de color se para añadiendo  $H_2SO_4$  y la intensidad del color, medida en un espectrofotómetro a 450 nm y a 405 nm, es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgM anti-Toxoplasma presentes en las muestras y controles.

### **REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL KIT: PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD**

Los reactivos son suficientes para 96 pocillos.

El kit debe conservarse a 2-8°C.

La fecha de caducidad de cada reactivo está indicada en su etiqueta. Una vez abierto el kit es estable 2 meses a 2-8°C.

### **PROCEDIMIENTO OPERATIVO**

Los reactivos y las muestras séricas deben adquirir temperatura ambiente.

Agitar suavemente las muestras por inversión antes de utilizarlas.

**1.** Preparar los pocillos por duplicado para los Sueros de Control e individual para el Blanco y las Muestras.

2. Distribuir **100 µl** de Sueros de Control y Muestras ya diluidas, en los respectivos pocillos.

**Nota: No se diluyen los sueros de control.**

3. Dispensar **100 µl** de diluyente en los pocillos blanco.

4. Incubar a **37±2°C** durante **60±5 minutos** cubriendo la microplaca con la hoja adhesiva suministrada con el kit.

5. Lavar los pocillos **4 veces** con **350 µl** (por pocillo) de solución de lavado diluida.

6. Dispensar **100 µl** de Antígeno reconstituido en todos los pocillos.

7. Incubar a **37±2°C** durante **60±5 minutos** cubriendo la microplaca como se nota anteriormente.

8. Lavar los pocillos como en el punto 5.

9. Cargar todos los pocillos con **100 µl** del Conjugado Enzimático.

10. Incubar a **37±2°C** durante **30±2 minutos** cubriendo la microplaca.

11. Lavar los pocillos como en el punto 5.

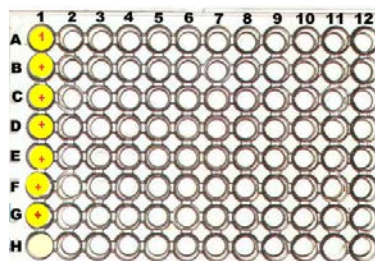
12. Dispensar con **100 µl** de Cromógeno en todos los pocillos.

13. Incubar a **37±2°C** durante **10 o 15 minutos a temperatura ambiente** (18- 25°C), al resguardo de la luz.

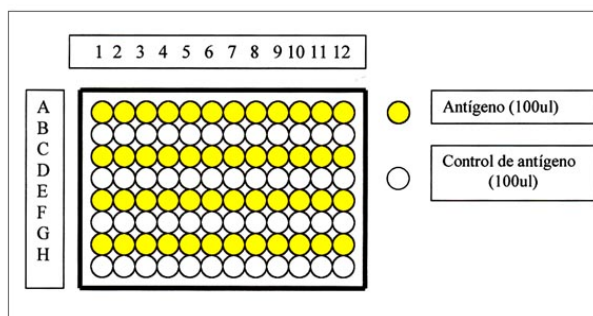
14. Dispensar **100 µl** de solución de parada en todos los pocillos.

15. Leer la densidad óptica a 450 nm, en los primeros 15 minutos después de terminado el ensayo en un espectrofotómetro con longitud de onda de referencia de 620 nm (haciendo el cero del instrumento con el blanco). En el caso de lectura fuera del rango (overflow), lea a 405 nm.

Fuente: K1TM – Toxoplasma igm



Revelado



Controles negativos y positivos





Lectura en espectrofotómetro (lectora de microplacas ELISA)  
e impresión de los resultados

Fuente: Biotech – Técnica ELISA - Toxoplasma gondii I™

### Fosfato 1X solución salina tamponada con Tween-20 (PBST)

Disolver en 800 ml de agua destilada

- 8 g de NaCl
- 0,2 g de KCl
- 1,44 g de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>
- 0,24 g de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>
- 2 ml de Tween-20

Ajustar el pH a 7,2

Ajustar el volumen a 1 litro con agua destilada adicional

Esterilizar en autoclave

Esta solución se utiliza en varios protocolos, más comúnmente como una solución de lavado en los ensayos ELISA.

### Solución PBS-BSA o Phosphate Buffered Saline with Bovine Serum

(1% Bovine Serum Albumin in PBS)

Albúmina de suero bovino (BSA)	1 g
Tamponada con fosfato salino pH, 7,4	100 ml

Disolver BSA en tampón PBS. Dividir en partes alícuotas y se almacena a -20 ° C.

Fuente original: Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998.

### Solución salina tamponada de Hank (HBSS)

Es una solución bastante complicada de elaborar por lo que se acostumbra comprarla. En primer lugar se elaboran las premezclas para luego conformar la solución final. Todas deben almacenarse a 4 ° C.

Solución de Hank (HBSS)

**Solución o premezcla 1**

1. Disolver el siguiente en 90 ml de agua destilada
  - 8,0 g de NaCl
  - 0,4 g de KCl
2. Completar hasta 100 ml con agua destilada

**Solución 2**

1. Disolver el siguiente en 90 ml de agua destilada
  - 0,358 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidro)
  - 0,60 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
2. Completar hasta 100 ml con agua destilada

**Solución 3**

1. Añadir 0,72 g de  $\text{CaCl}_2$  a 50 ml de agua destilada

**Solución 4**

1. Añadir 1,23 g de  $\text{MgSO}_4$  a 50 ml de agua destilada

**Solución 5**

1. Añadir 0,35 g de  $\text{NaHCO}_3$  a 10 ml de agua destilada

Reunir las soluciones en el siguiente orden:

10,0 ml Solución 1  
1,0 ml Solución 2  
1,0 ml Solución 3  
86,0 ml de agua destilada  
1,0 ml Solución 4

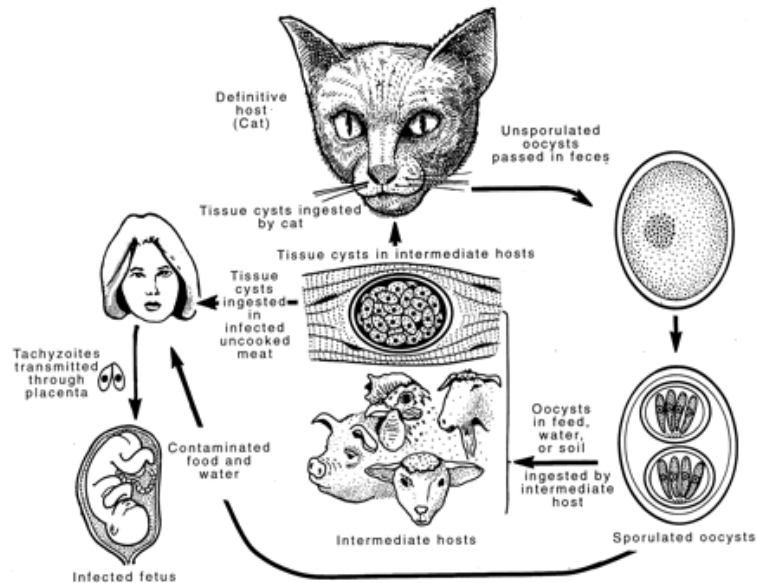
Solución salina tamponada de Hank (HBSS) (mezcle antes de usarlo)

Premix 9,9 ml de Hank

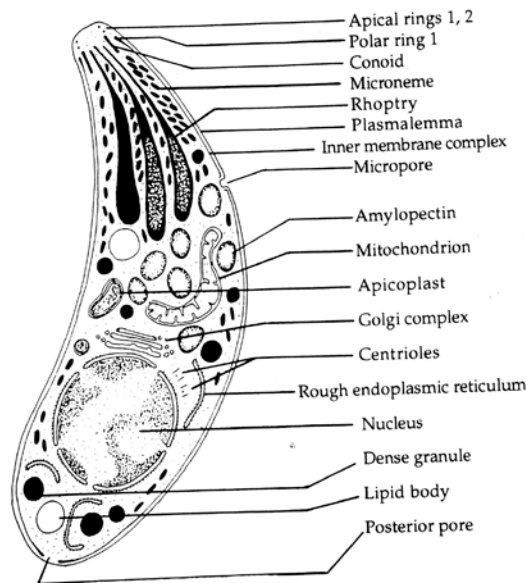
0,1 ml de Solución 5

Fuente: <http://labrat.jobscience.com>

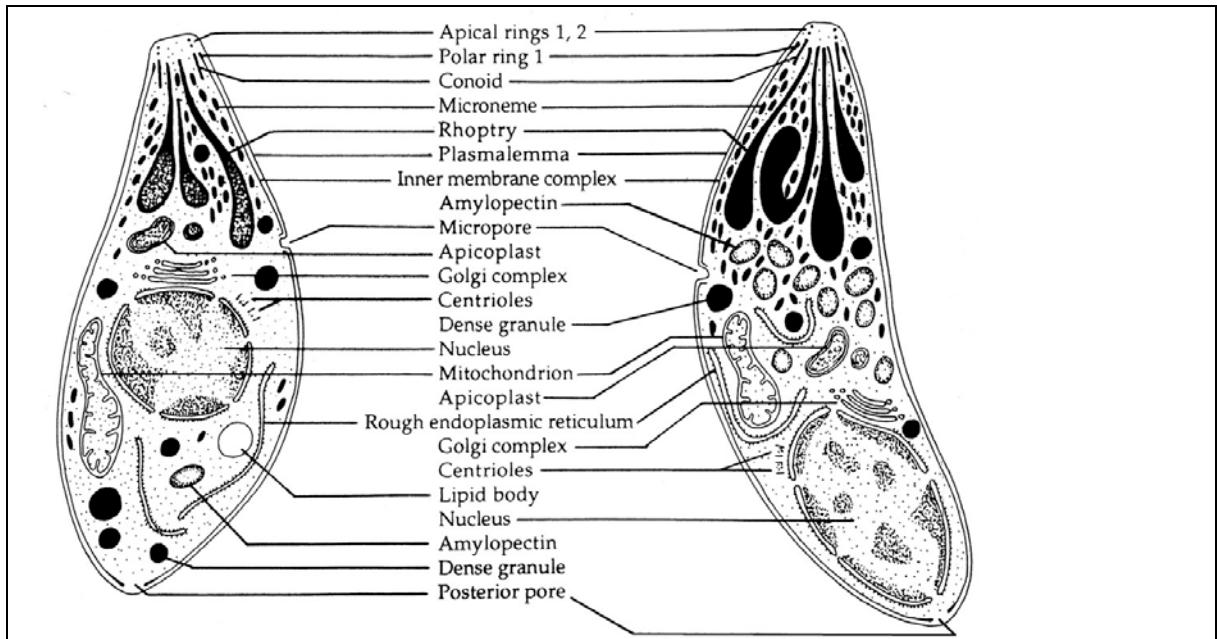
IX – ANEXO IMÁGENES



**Ilustración N° 5.-** Son tres los estadios infecciosos del *T. gondii*: los taquizoítos (en grupos o clones), los bradizoítos (en los quistes tisulares), y los esporozoítos (dentro de los ooquistes). Estos estadios se encuentran encadenados en un complejo ciclo de vida.

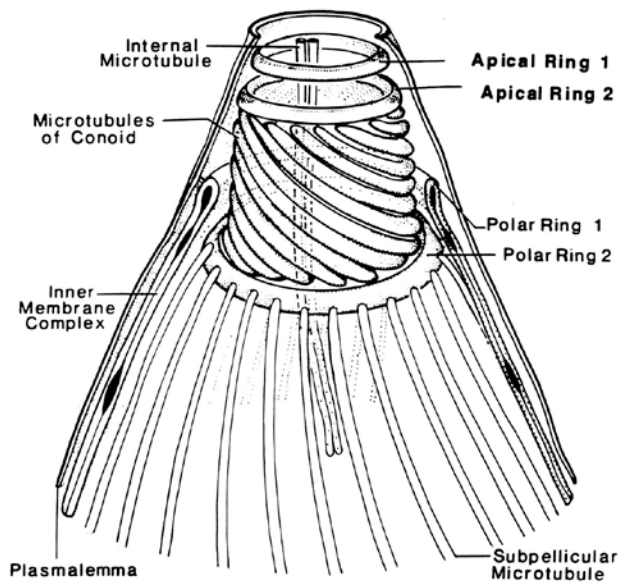


**Fig. 1. -** Esquema de un esporozoíto de *T. gondii*.  
(American Society of Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, <http://cmr.asm.org>)



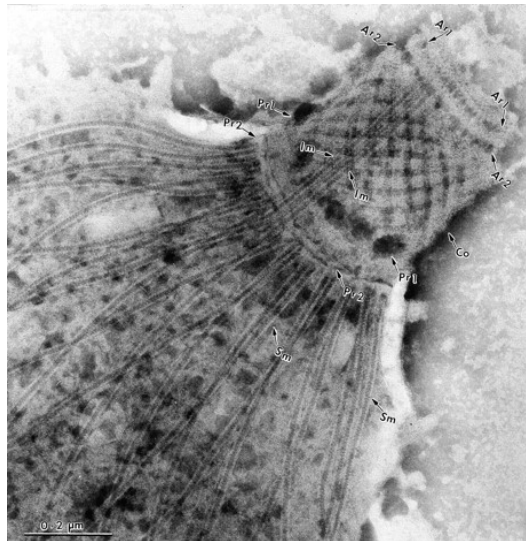
**Fig.2.-** Esquema de un taquizoíta (izquierda) y un bradizoíta (derecha) de *T. gondii*. Los dibujos son una composición en base a la imagen de microscopía electrónica.

American Society of Microbiology



**Fig.3.-** Representación esquemática del complejo apical del *T. gondii*.

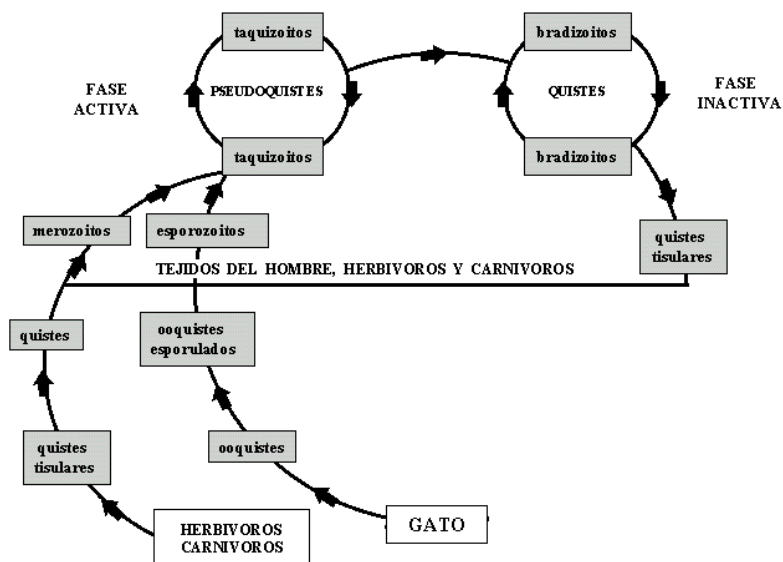
American Society of Microbiology



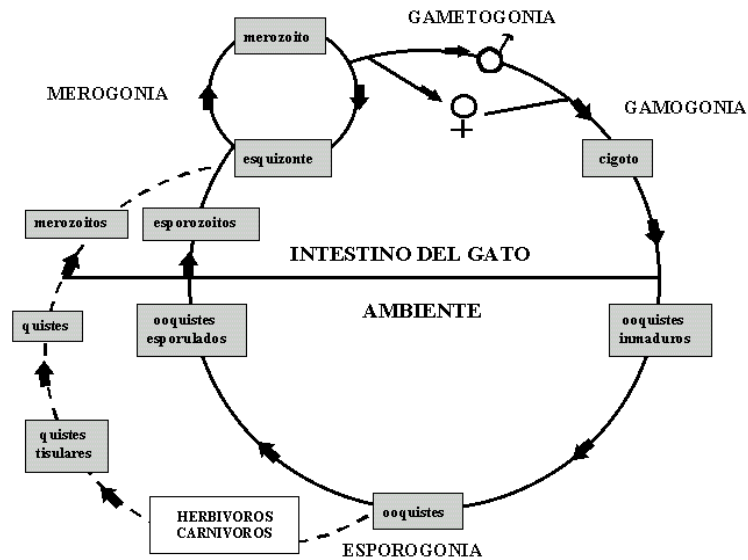
**Fig.4-** M.E. de un complejo apical con tinción negativa de taquizoítos. AR1 y AR2, anillos apical 1 y 2; Co, conoide formado por microtúbulos en espiral, Im, microtúbulos internos; Pr1, anillo polar1, Pr2, anillo polar 2; Sm, los microtúbulos sub peliculares.

American Society of Microbiology

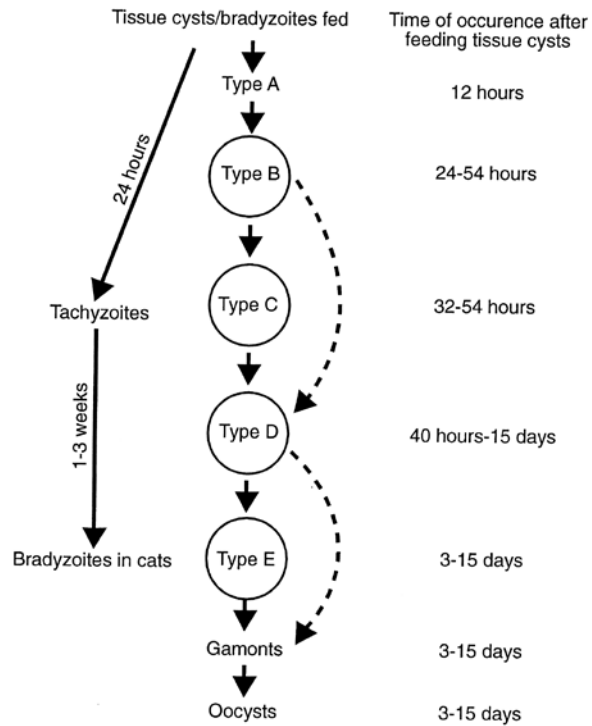
## TOXOPLASMOSIS



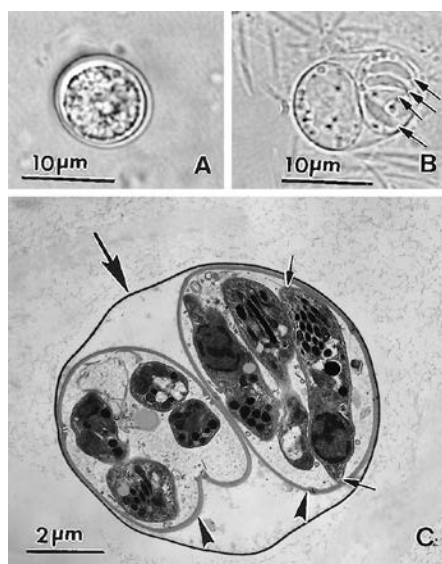
**Ilustración N° 6:** Ciclo dentro del hospedador intermedio y dentro del definitivo



**Ilustración N°7:** Etapas en los hospedadores / ambiente.

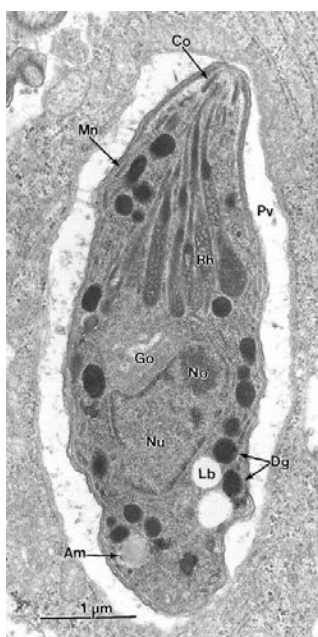


**Ilustración N° 8:** Tipos del *T. gondii* y tiempo de los diferentes estadios



**Fig.5.-** Oocistes de *T. gondii*. (A) oociste no esporulado. Masa central (esporonte) ocupa la mayoría del oociste. (B) oociste esporulado con dos esporocistes. Cuatro esporozoítos (flechas) son visibles en uno de los esporocistes. (C) fotografía electrónica de barrido de un oociste esporulado. Notar la pared delgada del oociste (flecha grande), los dos esporocistes (puntas de flecha), y los esporozoítos, uno de los cuales se corta longitudinalmente (flechas pequeñas).

American Society of Microbiology



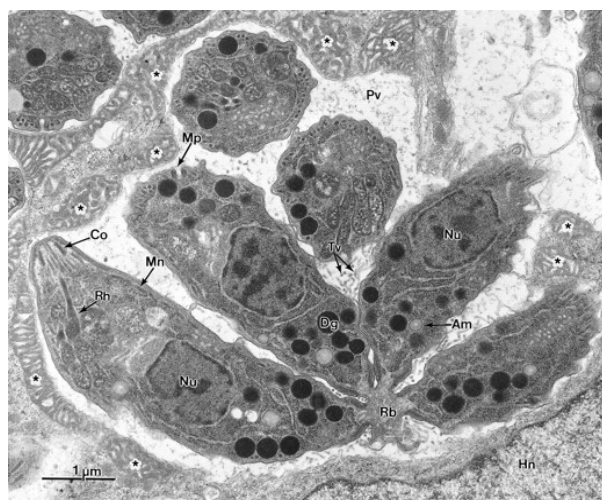
**Fig. 6.-** Esquema de un esporozoítos de *T. gondii*. Microfotografía electrónica de barrido de tachizoítos. Am, gránulos de amilopectina Co, conoide Dg, gránulos densos Go, complejo de Golgi Mn, micronemas No, nucléolo Nu, núcleo Pv, vacuola parasitófora Rh roptrias.

American Society of Microbiology.



**Fig. 7.-** Ciclo de endodiogenia dentro de un macrófago peritoneal formando dos taquizoítos hijos. Cd, conoide de taquizoítos en desarrollo; Co, conoide de la madre, Dg, gránulos electro densos, Ga, Golgi adjunto; Hm, mitocondria celular, Hn, núcleo celular; Id, complejo de la membrana interna de taquizoítos en desarrollo, Im, complejo interior membrana de la célula madre, Mn, micronemas, Nu, núcleos de los taquizoítos hijos; Pl, plasmalema de la célula madre, Pm, la membrana vacuolar del parásito; Pv, vacuola parasitófora, Rh, roptrias de taquizoítos hijos.

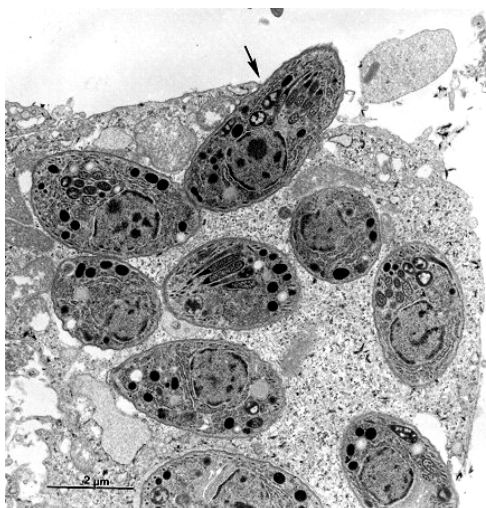
American Society of Microbiology.



**Fig. 8.-** ME de cuatro taquizoítos en las etapas finales de endodiogenia, todavía unidos por sus extremos posteriores a un cuerpo común residual (Rb), las mitocondrias de la célula huésped se encuentran cerca de la vacuola parasitófora (PV), que contiene membranas túbulo vesiculares (Tv). Am, gránulos de amilopectina, Co, conoide Dg, gránulos densos; Hn, el núcleo de la célula huésped Mn, micronemas Mp, microporos Un, núcleo, Rh, roptrias.

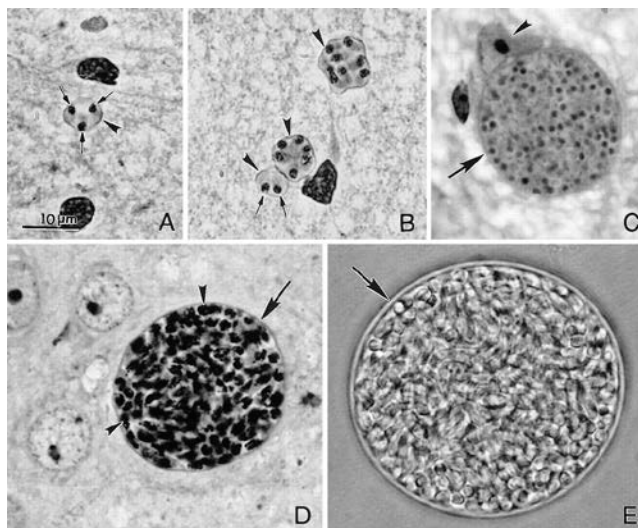
American Society of Microbiology.





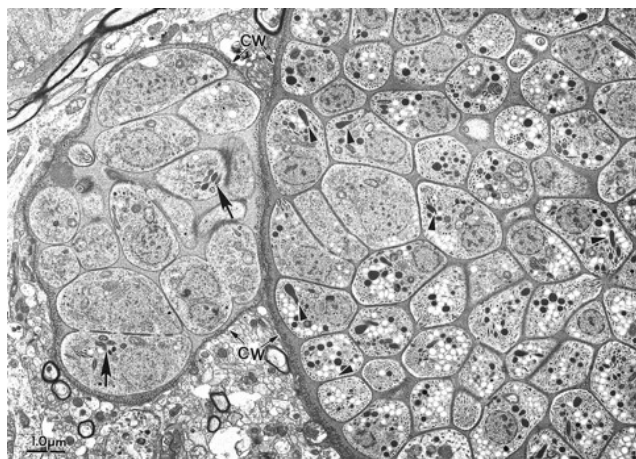
**Fig. 9.-** Imagen electrónica de barrido de un macrófago que contiene varios taquizoítos de *T. gondii*, uno de los cuales se escapa de los macrófagos en la parte superior de la micrografía (flecha). Los taquizoítos se encuentran libres en el citoplasma de los macrófagos.

American Society of Microbiology.



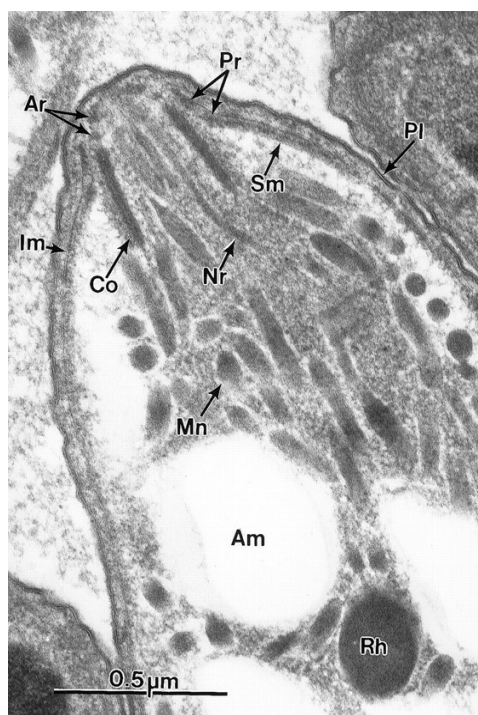
**Fig.10.-** Quistes tisulares de *T. gondii*. (A) Bradizoítos con núcleo terminal (flechas). Impregnación de plata y Giemsa. (B) Quistes tisulares con paredes bien definidas (flechas). (C) quiste intracelular. Núcleo de la célula huésped (cabeza de flecha). Hematoxilina y eosina. (D) quiste tisular con numerosos bradizoítos (puntas de flecha) encerrado en un quiste (flecha). (E) quiste libre en cerebro. Pared del quiste (flecha) con cientos de bradizoítos.

American Society of Microbiology.



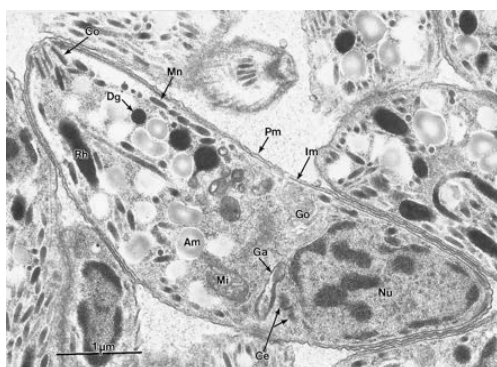
**Fig.11.-** ME de barrido de dos quistes de *T. gondii* en cerebro de ratón. El quiste tisular de la izquierda es más joven que el de la derecha debido a las diferencias en sus bradizoítos. Los de la derecha contienen más micronemas y amilopectina. El contenido de roptrias en los bradizoítos del quiste mayor son más densos (puntas de flecha), mientras que las de los bradizoítos en los tejidos más jóvenes son alveolares (flechas). La pared del quiste (CW) también es más ramificada y prominente en el quiste mayor que en el joven.

American Society of Microbiology.

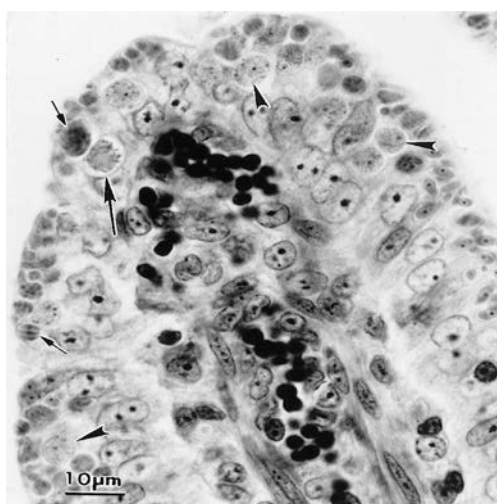


**Fig.12.-**Extremo anterior de un bradizoíto mostrando el complejo apical Am, amilopectina Am, anillos apicales Co, conoide Im, complejo de membrana interna Mn, micronemas Pl, plasmalema Pr, anillos polares Rh, roptrias Sm, microtúbulos subpeliculares.

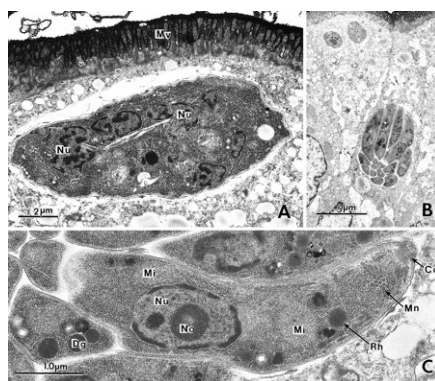
American Society of Microbiology.



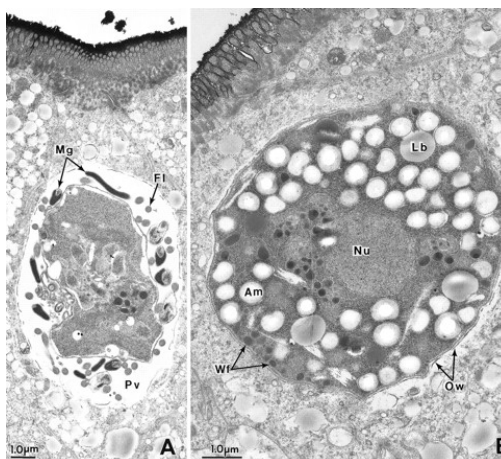
**Fig. 13.-** Bradizoito en quiste tisular Am, gránulos de amilopectina, Ce, centriolos, Co, conoide, Dg, gránulos electro densos, Ga, complejo apicoplasto, Go, complejo de Golgi, Im, membrana interna, Mi, mitocondria, Mn, micronemas; Nu núcleo; Pm, plasmalema, Rh, roptrias.  
American Society of Microbiology.



**Fig.14.-** Etapa enteroepitelial de *T gondii* en las vellosidades del intestino delgado de gato. Esquizontes (tipo D) (flechas pequeñas) y gamontes (puntas de flecha) masculinos (flecha grande) y femeninos.  
American Society of Microbiology.



**Fig.15.-** Imagen m. electrónica de barrido de tipo D. (A) Esquizontes *T. gondii* muestra varios núcleos (Nu). Mv, microvellosidades de los enterocitos. (B) esquizonte maduro. (C) Secciones longitudinales de los merozoítos. Co, conoide, Dg, gránulos densos, Mi, mitocondria, Mn, micronemas; No, nucléolo, Nu, el núcleo, Rh, roptrias.  
American Society of Microbiology.



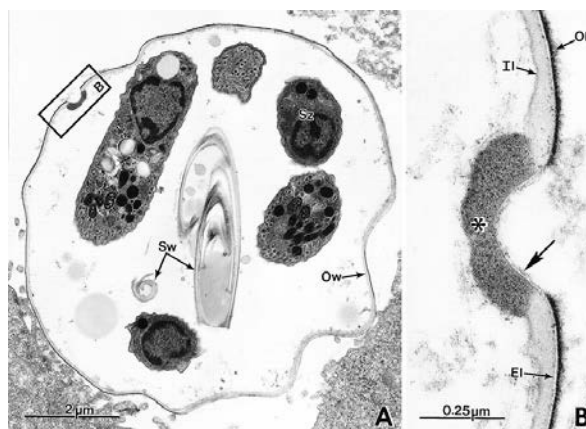
**Fig.16.** Gamontes de *T. gondii* (A) microgamonte maduro. Fl, flagelo de microgameto; Mg, el cuerpo de microgameto; Pv, vacuola parasitófora. (B) cigoto en la etapa inicial de formación de la pared de oocistes. Am, gránulos de amilopectina, Lb, el cuerpo de los lípidos, Nu, el núcleo del cigoto, Wf, la pared de oocistes en las primeras etapas de formación.

American Society of Microbiology.



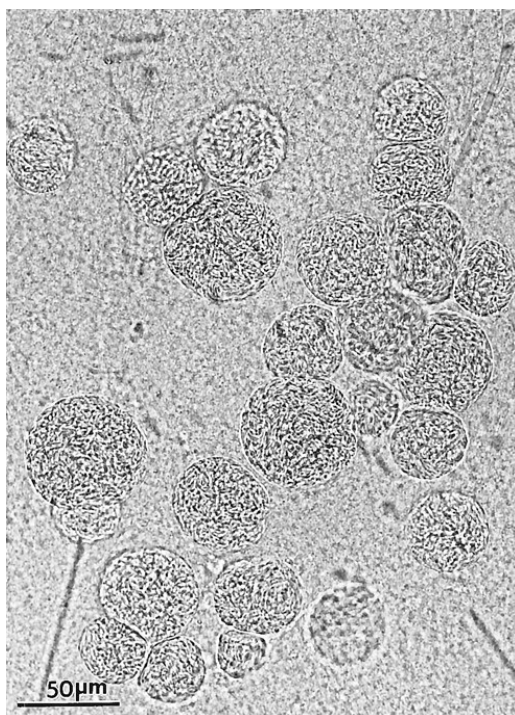
**Fig. 17.-** Imagen de microscopio electrónico de un oociste de *T. gondii* expuestos a fluidos (tripsina y sales biliares) mostrando esporocistos en etapa temprana de exquistación. El oociste está rodeado por un velo reticulado (Ov) y una pared de oocistes (OW). La pared esporocisto (Sw) consiste en una continua capa externa delgada y una capa interna formada por cuatro planchas curvas unidas por suturas (flechas) Durante la exquistación, el líquido actúa sobre los puntos de sutura, separa y enrolla las placas de la capa interna hacia adentro (doble flecha), con la liberación de los esporozoítos. Am, la amilopectina, conoide Co, Dg, gránulos electro-densos, Lb, cuerpo de lípidos, Mn, micronemas, Rh, roptrias.

American Society of Microbiology.



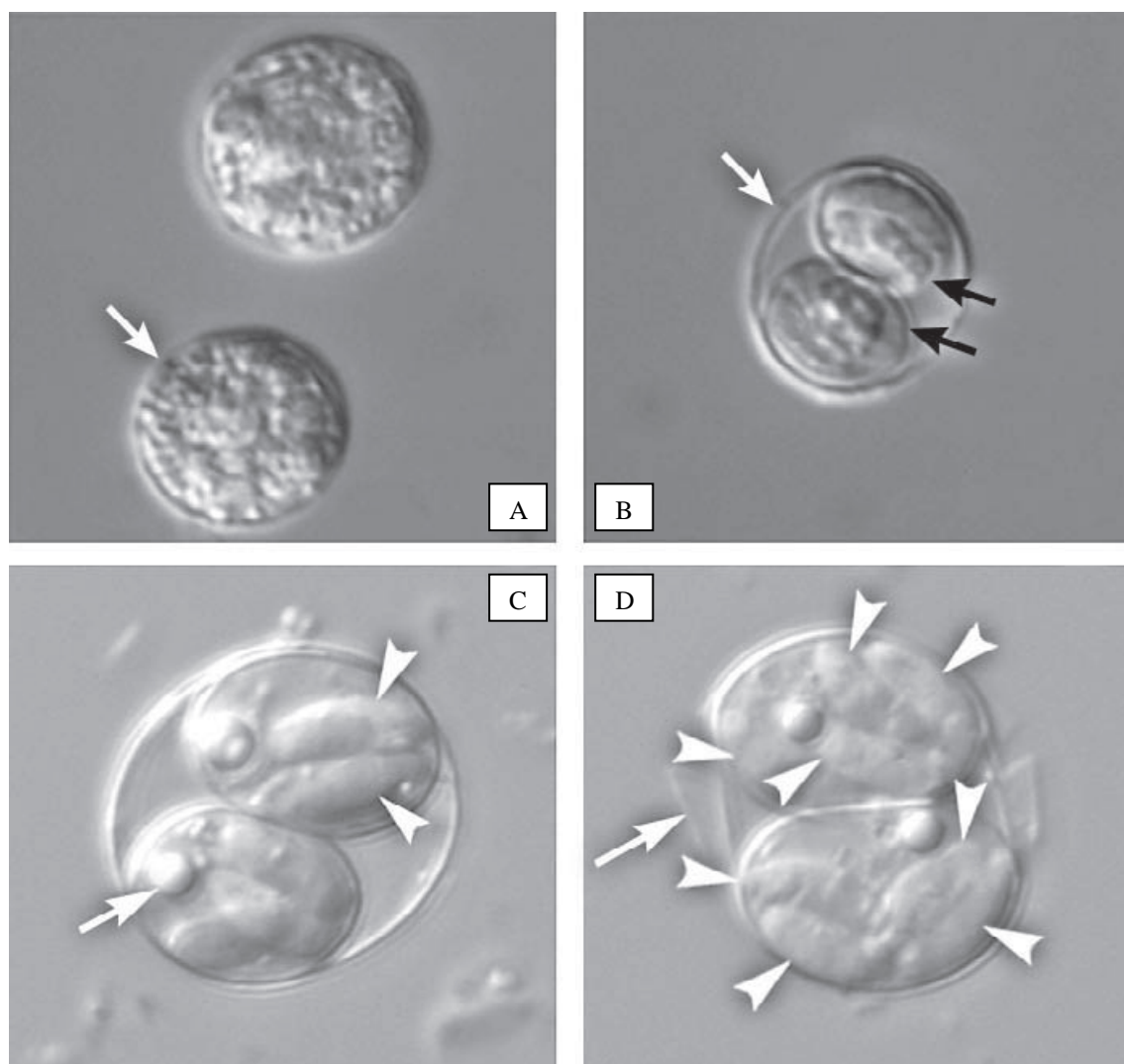
**Fig. 18.-** Imagen de un ooquiste esporulado de *T. gondii* (A) ooquiste en la última etapa de exquistación, mostrando varios esporozoítos libres (SZ) con las paredes de los esporocistos (SW). (B) micrópila (OW). (B) Se ven detalles de la pared del ooquiste y micrópila, la pared del ooquiste se compone de una combinación externa capa de electrones de alta densidad (OI) y una capa interna de electro lucida (II), separados por una línea clara (EI). En el micrópila, la capa externa de la pared del ooquiste es lúcida y delgada (flecha), la línea clara continua a través del micrópila, y la capa interna de la pared del ooquiste se vuelve un poco más gruesa cerca del micrópila y se continúa con el micrópila.

American Society of Microbiology.



**Fig. 19.-** Frotis de cerebro con conglomerados de quistes de *T. gondii*. Ratón asintomático.

American Society of Microbiology.



**Fig. N° 20.-** Ooquistes de *T. gondii*. A. ooquistes no esporulados. B. esporulación de ooquistes. Nota: la pared del ooquiste en flechas blancas y las paredes de esporocistos con flechas negras, y esporozoitos en desarrollo (asteriscos). C. ooquistes completamente esporulados con esporozoitos (puntas de flecha) y un cuerpo residual (flecha). D. ooquistes esporulados con el area de contacto aplanada por la presión, muestra los cuatro esporozoitos dentro de cada esporocistos. La pared exterior del ooquiste (flecha blanca) se encuentra parcialmente rota. Fotografía de Contraste: Cortesía Nomarskifase de A y B (Dr. Eric Villegas); y C y D cortesía del señor Fournet Valsin y la Dra. Dolores Hill. Tamaño aprox. Oocistos: 12 micras de longitud.

Fuente: Dubey, 2010