



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TÍTULO DEL TRABAJO:

**“Estudios serológicos, biológicos y moleculares de
Toxoplasma gondii y su relación con la transmisión transplacentaria
en infecciones naturales en cabras”**

AUTOR: María Laura Gos

DIRECTORES: Dra. María Cecilia Venturini

Dr. Gastón Andrés Moré

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Inmunoparasitología,

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. María Andrea Fiorentino

Dr. Rodrigo E.F. Sanabria

Dr. Ernesto J.A. Späth

2019

DEDICATORIA

A mis papás, que me enseñaron siempre con el ejemplo que el esfuerzo y el amor son necesarios para cosechar frutos en la vida, y gracias a ellos soy lo que soy hoy. Mi mamá, mi fiel compañera siempre a mi lado y mi papá, que brilla en el cielo y desde ahí me cuida.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), mi segundo hogar y a cada uno de sus integrantes que me acompañaron a lo largo de este camino. A Cecilia, mi directora, que me enseñó el verdadero sentido de pertenencia de un lugar, que me aconsejó y cuidó con mucho cariño, siempre ayudándome para que progrese en forma profesional pero también en lo personal. A Gastón, mi director, que estuvo a la par mío en todo momento, enseñándome con mucha paciencia y que fue mi sostén cuando pensaba que no iba a poder terminar con este desafío. A Lucía, que desde la amistad, siempre me guió y me aconsejó en el día a día de este trabajo. A todos los que forman y formaron el equipo del LAINPA: Juan, Andrea, Lais, Lorena, Magdalena, Mariana, Diego, Diana, Pablo, Elisa, Kevin, Sebastián, Selva e Isidoro, ya que todos colaboraron en este trabajo en distintos aspectos: ayuda técnica, sostén psicológico, sonrisas o buena predisposición. Gracias a todos ellos por fomentar los valores que a mi criterio son los más importantes que pueden existir en el trabajo: responsabilidad y compañerismo. A Orlando, gracias por tu ayuda en el muestreo, por tenerme mucha paciencia y enseñarme el manejo con las cabras, y por tu amistad. A Jorge Manazza, que me enseñó la importancia de devolver a la sociedad el conocimiento aprendido y poder ayudar a los demás. A los integrantes del INTA BALCARCE, que me ayudaron con la obtención de muestras y al equipo de patólogos que realizaron los estudios histopatológicos.

A mi familia y mis amigos, principalmente a mamá, Ale, Vero, Cintia, Julieta y todos mis sobrinos-ahijados, que siempre comprendieron sin juzgarme mis

ausencias por el tiempo dedicado al estudio y trabajo, y siempre acompañándome con amor. A Julián, por estar a mi lado todos los días y por hacer mi vida más feliz.

María Laura Gos

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

- Relevamiento sanitario en caprinos en una zona de peri-valle de la provincia de Río negro, Argentina. Martínez A, Bincaz J, Brihuega B, Sheridan M, Mozgovoj M, Parreño V, **Gos ML**, C.A. Robles CA. Revista Veterinaria Argentina. 2013; Vol XXX- N°303.
- Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats from two Argentinean provinces. **Gos ML**, Manazza JA, Späth EJA, Pardini L, Fiorentino MA, Unzaga JM, Moré G, Venturini MC. Open Veterinary Journal. 2017; 7(4): 319-322.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales relacionadas de modo indirecto al trabajo de tesis

- First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from an human placenta in Argentina. Pardini L, Carral LA, Bernstein B, **Gos ML**, Olejnik P, Unzaga JM, Kaufer FJ, Freuler CB, Durlach RA, Venturini MC. Parasitology International. 2014; 63: 470-472.
- *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goat abortions from Argentina. Unzaga JM, Moré G, Bacigalupe DR, Rambeaud M, Pardini L, Dellarupe A, De Felice L, **Gos ML**, Venturini MC. Parasitology International. 2014; 63: 865-867.
- *Toxoplasma gondii* isolates from chickens in an area with human toxoplasmic retinochoroiditis. Pardini L, Moré G, Rudzinski M, **Gos ML**, Campero LM,

- Meyer A, Bernstein M, Unzaga JM, Venturini MC. *Experimental Parasitology*. 2016; 166: 16-20.
- Microsatellite pattern analysis of *Neospora caninum* from a naturally infected goat fetus. Campero LM, **Gos ML**, Moore DP, Regidor-Cerrillo J, Unzaga JM, Moré G, Ortega-Mora LM, Venturini MC. *Veterinary Parasitology*. 2018; 255: 58-60.
 - Congenital human toxoplasmosis caused by non-clonal *Toxoplasma gondii* genotypes in Argentina. Pardini L, Bernstein M, Carral LA, Kaufer FJ, Dellarupe A, **Gos ML**, Campero LM, Moré G, Messina MT, Schneider MV, Freuler CB, Durlach RA, Unzaga JM, Venturini MC. *Parasitology International*. 2019; 68(1): 48-62.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AUC:** *area under curve* (área bajo la curva)
- **DO:** densidad óptica
- **ELISA:** enzimoimmunoensayo
- **ERC:** estándar relativo de comparación
- **FCV:** Facultad de Ciencias Veterinarias
- **g:** gramos
- **HD:** hospedador definitivo
- **HI:** hospedador intermediario
- **H/E:** hematoxilina-eosina
- **IB:** *Immunoblot*
- **IC:** intervalo de confianza
- **IDAs:** antígenos inmunodominantes
- **IFI:** inmunofluorescencia indirecta
- **Ig:** inmunoglobulina
- **HAI:** hemoaglutinación indirecta
- **K:** estadístico kappa
- **kDa:** kilodalton
- **l:** litro
- **LAT:** aglutinación indirecta en látex
- **M:** molar
- **MAT:** aglutinación directa modificada

- **min:** minute
- **ml:** mililitro
- **mm:** milímetro
- **N:** normal
- **NTC:** *no template control*
- **OIE:** oficina internacional de epizootias
- **OR:** odds ratio
- **pb:** pares de bases
- **PBS:** solución buffer de fosfatos
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PH:** potencial de hidrógeno (acidez o alcalinidad de un medio)
- **p.i.:** post-inoculación
- **PM:** peso molecular
- **PVDF:** fluoruro de polivinilideno
- **P30:** proteína de 30 kDa
- **RFLP:** *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)
- **ROC:** *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor)
- **RON:** proteínas de las roptrias de la región del cuello
- **ROP:** proteínas de las roptrias de la región del bulbo
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **SC:** subcutáneo

- **SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
- **Se:** sensibilidad
- **SNC:** sistema nervioso central
- **Sp:** especificidad
- **TC:** tambos caprinos
- **µg:** microgramos
- **µl:** microlitros
- **UNLP:** Universidad Nacional de La Plata
- **VP:** vacuola parasitófora

INDICE DE CONTENIDOS

TÍTULO: ESTUDIOS SEROLÓGICOS, BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE	
<i>TOXOPLASMA GONDII</i> Y SU RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN	
TRANSPLACENTARIA EN	
INFECCIONES NATURALES EN CABRAS.....	1
PALABRAS CLAVES	1
RESUMEN	1
TITLE: SEROLOGICAL, MOLECULAR AND BIOLOGICAL STUDIES OF <i>TOXOPLASMA</i>	
<i>GONDII</i> AND ITS RELATIONSHIP TO TRANSPLACENTAL TRANSMISSION IN	
NATURAL INFECTIONS IN GOATS.....	5
KEYWORDS	5
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Historia.....	9
1.2. Morfología de <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.3. Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	15
1.4. Genotipos de <i>T. gondii</i>	21
1.5. Importancia de la toxoplasmosis en humanos y animales	24
1.6. Vías de transmisión y signos clínicos en caprinos	25
1.7. Patogenia del aborto.....	28
1.8. Diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos	30
1.9. Prevalencia de la toxoplasmosis en caprinos	42
1.10. Prevención y aspectos zoonóticos.....	46

2. OBJETIVOS	53
Objetivos generales	53
Objetivos específicos	53
3. HIPÓTESIS	54
4. SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS PARA <i>T. GONDII</i> EN CAPRINOS DE ARGENTINA	55
4.1. Materiales y Métodos	55
4.1.1. Muestras.....	55
4.1.2. Estudios serológicos	64
4.1.3. Análisis estadísticos	66
4.2. Resultados	69
4.3. Discusión	80
5. VALIDACIÓN DEL ELISA TGSAG1 (P30) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN CAPRINOS	98
5.1. Materiales y Métodos	98
5.1.1. Prueba de IB y conformación del ERC.....	98
5.1.2. Prueba de ELISA TgSAG1 (P30) y análisis de datos.....	100
5.2. Resultados	102
5.2.1. <i>Immunoblot</i> y conformación del ERC	102
5.2.2. ELISA-P30 y análisis de datos	105
5.3. Discusión	107
6. TRANSMISIÓN VERTICAL, ABORTOS Y GENOTIPIFICACIÓN DE <i>T. GONDII</i>	116
6.1. Materiales y métodos	116

6.1.1. Muestras.....	116
6.1.2. Estudios serológicos	119
6.1.3. Bioensayo de <i>T. gondii</i> en ratones	119
6.1.4. Diagnóstico y caracterización molecular de <i>T. gondii</i>	120
6.1.5. Tasas de transmisión vertical.....	123
6.1.6. Diagnóstico diferencial de <i>Neospora caninum</i>	123
6.2. Resultados	123
6.3. Discusión	133
7. CONCLUSIONES.....	150
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
Anexos de Técnicas.....	200
Anexo 1: Cultivo de <i>T. gondii</i> en células VERO	200
Anexo 2: Preparación de antígeno para la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta	202
Anexo 3: Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta	203
Anexo 4: Elaboración de geles de poliacrilamida para SDS-PAGE (12,5 %)	205
Anexo 5: Elaboración y siembra del antígeno para la prueba de <i>Immunoblot</i> ...209	
Anexo 6: Inmunotransferencia del antígeno de <i>Immunoblot</i>	211
Anexo 7: Prueba de <i>Immunoblot</i>	213
Anexo 8: Prueba de ELISA-TgSAG1 (P30)	216
Anexo 9: Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	219
Anexo 10: Preparación de geles de agarosa y revelado de productos de PCR ..	222

Anexo 11: Técnica de PCR anidada (<i>nested</i>-PCR) seguida de cortes con enzimas de restricción (RFLP)	224
Anexo 12: Aislamiento de <i>T. gondii</i> en ratones.....	227

TÍTULO: ESTUDIOS SEROLÓGICOS, BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE TOXOPLASMA GONDII Y SU RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN TRANSPLACENTARIA EN INFECCIONES NATURALES EN CABRAS

PALABRAS CLAVES:

Toxoplasma gondii, cabras, seroprevalencia, ELISA-TgSAG1 (P30), genotipificación.

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario que se encuentra distribuido mundialmente y que afecta a un amplio rango de mamíferos y aves causando la enfermedad denominada toxoplasmosis. En pequeños rumiantes la toxoplasmosis es considerada una causa importante de problemas reproductivos. El signo más característico de esta infección en caprinos es la presencia de abortos y natimortos, aunque también puede producir muerte embrionaria, nacimiento de cabritos débiles o de animales clínicamente normales pero infectados.

En este trabajo se determinó la seroprevalencia de la toxoplasmosis caprina en Argentina a través de la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros de cabras (n= 4092) de 209 establecimientos por la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en las provincias de: Buenos Aires (n= 735), Córdoba (n= 2187), San Luis (n= 389), La Rioja (n= 237), Río Negro (n= 123), Catamarca (n= 219) y Salta (n= 202). Además se determinaron las diferencias entre los distintos sistemas de manejo semi-intensivo/intensivo (n= 1235) y extensivo (n= 2766). La

seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* hallada en el país fue del 39 % (1596/4092). Todas las provincias analizadas y el 76,1 % (159/209) de los establecimientos presentaron animales seropositivos a *T. gondii*. Las seroprevalencias fueron diferentes entre regiones, siendo las más altas en las provincias de Catamarca (71 %), Buenos Aires (63 %) y Río Negro (51,2 %), y las más bajas en Salta (27,7 %), La Rioja (22,4 %) y San Luis (19,8 %), mientras que Córdoba presentó una seroprevalencia intermedia (33,3 %) ($p < 0,0001$).

Se detectó una seroprevalencia del 56,8 % (701/1235) y del 30,9 % (864/2766) en establecimientos con manejo semi-intensivo/intensivo y extensivo, respectivamente. La seroprevalencia fue significativamente mayor en explotaciones lecheras con manejo semi-intensivo/intensivo ($p < 0,0001$; OR= 2,94). De acuerdo a lo resultados obtenidos es posible concluir que la toxoplasmosis caprina se encuentra ampliamente distribuida en el país y que las diferencias encontradas entre las distintas regiones de Argentina podrían deberse al sistema de producción de los animales, condiciones climáticas y/o características geográficas.

Se evaluó una prueba de ELISA con el antígeno nativo TgSAG1 (P30) de *T. gondii* (ELISA-P30) para el diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos. Se utilizaron 478 sueros de distintas provincias con resultados concordantes a las pruebas de IFI e *Immunoblot* como estándar relativo de comparación (ERC). El análisis por curva ROC determinó que el ELISA-P30 fue altamente preciso con un área bajo la curva (AUC) de 0,9788 y una concordancia casi perfecta ($k = 0,9381$) en relación al ERC. Se obtuvieron valores de 96 % y 98 % de sensibilidad y especificidad

respectivamente, con el valor de índice relativo de 0,2185 como *cutoff*. El ELISA-P30 se validó para la detección de anticuerpos anti- *T. gondii* en cabras naturalmente infectadas de nuestro país.

Se estudiaron tejidos de 54 fetos caprinos (que incluyeron abortos, natimortos y muertos perinatales), 35 placentas y 42 sueros de cabritos antes de ingerir calostro (sueros precalostrales) para determinar la transmisión vertical, la tasa de abortos y caracterizar molecularmente los genotipos de *T. gondii* presentes en infecciones naturales de cabras. Las muestras de suero y líquidos fetales se analizaron mediante la prueba de IFI. Los homogenatos de SNC de 11 fetos se inocularon por vía subcutánea en ratones para realizar el aislamiento. Los tejidos fetales, las placentas caprinas y los tejidos de ratones inoculados fueron analizados por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras positivas por PCR fueron sometidas a genotipificación por PCR anidada (*nested-PCR*) seguida por cortes con enzimas de restricción (RFLP) utilizando los marcadores moleculares nSAG 2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, PK1 y Apico. El 13 % (7/54) de los fetos analizados fueron positivos a *T. gondii*, en todos se detectó ADN del protozoo en tejidos, principalmente en SNC. En un feto se detectaron anticuerpos para *T. gondii*. El 17,6 % (6/34) de las placentas analizadas presentaron ADN de *T. gondii*. No se logró el aislamiento del parásito a partir de las muestras inoculadas. En este estudio la transmisión de la infección a los fetos no se relacionó con seroconversión en sueros de las madres. Los 42 sueros precalostrales evaluados fueron negativos a IFI, a pesar que el 85,7 % de los cabritos sangrados eran hijos de cabras seropositivas. En nuestro estudio

podimos confirmar que la transmisión transplacentaria de *T. gondii* ocurrió en el 13,3 % de las cabras con pérdidas reproductivas provenientes de 2 establecimientos de la provincia de Buenos Aires con altas seroprevalencias. La transmisión vertical de *T. gondii* manifestada por el nacimiento de cabritos asintomáticos infectados tendría una limitada participación en el mantenimiento de la infección en hatos caprinos con alta seroprevalencia.

Para la caracterización molecular de *T. gondii* se analizaron muestras de ADN de tejidos de 6 fetos y 3 placentas. Se obtuvieron genotipificaciones completas en tejidos de 2 de los casos de abortos, mientras que en el resto de las muestras se obtuvieron genotipificaciones parciales. El genotipo hallado en muestras de tres fetos (trillizos) fue atípico, con la mayoría de los marcadores tipo III, con excepción de C29-2 (tipo II), L358 y PK1 (ambos tipo I) y el otro genotipo presentó un patrón alélico tipo II y fue obtenido partir de una placenta con lesiones características. Los genotipos de *T. gondii* que afectaron a los caprinos en Argentina en su mayoría fueron atípicos con predominio de marcadores tipo III y se relacionaron con los genotipos detectados en otros hospedadores de la misma región. En la provincia de Buenos Aires fue factible detectar el genotipo II asociado a abortos en caprinos. Teniendo en cuenta que los sistemas de producción semi-intensivos/intensivos en nuestro país se dedican principalmente a la producción de leche y sus derivados, se recomienda tomar medidas para reducir la infección horizontal de los caprinos.

TITLE: SEROLOGICAL, MOLECULAR AND BIOLOGICAL STUDIES OF *TOXOPLASMA GONDII* AND ITS RELATIONSHIP TO TRANSPLACENTAL TRANSMISSION IN NATURAL INFECTIONS IN GOATS

KEYWORDS:

Toxoplasma gondii, goats, seroprevalence, ELISA-TgSAG1 (P30), genotyping.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite with a worldwide distribution that affects a wide range of mammals and birds, causing toxoplasmosis. In small ruminants toxoplasmosis is considered an important cause of reproductive disorders in many countries. The most common clinical signs of toxoplasmosis in goats are abortion and stillbirth. It can also cause embryonic death, neonatal death, birth of weak kids or clinically normal but infected kids.

In the present study, the seroprevalence of *T. gondii* in goats from Argentina was estimated by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT). Antibodies to *T. gondii* were determined in goat serum samples (n= 4092) belonging to 209 herds from Buenos Aires (n= 735), Córdoba (n= 2187), San Luis (n= 389), La Rioja (n= 237), Río Negro (n= 123), Catamarca (n= 219) and Salta (n= 202) provinces. Additionally, the differences between semi-intensive/intensive (n= 1235) and extensive (n= 2766) management conditions were determined. Overall, *T. gondii* seroprevalence was 39% (1596/4092). All provinces and 76.1 % (159/209) of herds had seropositive animals. Seroprevalence values varied between regions, being higher in Catamarca (71 %), Buenos Aires (63 %) and Río Negro (51.2 %)

and lower in Salta (27.7 %), La Rioja (22.4 %) and San Luis (19.8%), while Córdoba had an intermediate seroprevalence value (33.3%) ($p < 0.0001$). A seroprevalence of 56.8 % (701/1235) and 30.9 % (854/2766) was detected in farms with semi-intensive/intensive and extensive management systems, respectively. The seroprevalence was significantly higher in dairy farms with semi-intensive/intensive management conditions ($p < 0.0001$; OR = 2.94). According to these results, it is possible to conclude that caprine toxoplasmosis is widely distributed in the country and that differences among regions could be attributed to different animal production systems, weather conditions and/ or geographic characteristics.

An ELISA test using the TgSAG1 (P30) native antigen of *T. gondii* (P30-ELISA) was evaluated for the diagnosis of caprine toxoplasmosis. 478 goats serum samples from different provinces of Argentina testing either positive or negative by both IFAT and IB were used as relative standard of comparison (RSC). The Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis revealed that P30-ELISA was highly accurate with an area under curve (AUC) of 0.9788 and an almost perfect agreement ($k = 0.9381$) according to the RSC. Relative sensitivity and specificity of the P30-ELISA using a cut-off index value of 0.2185 were 96 % and 98 %, respectively. The P30-ELISA was validated for detection of antibodies against *T. gondii* in naturally infected goats in our country.

Fifty-four goat fetuses (from abortions, stillbirths and neonatal deaths), 35 caprine placentas and 42 sera from kids before ingesting colostrum were studied to determine vertical transmission, abortion rate and molecular characterization

of *T. gondii* genotypes in natural goat infections. Serum samples and fetal fluids were examined by IFAT. Brains from 11 fetuses were homogenized and inoculated subcutaneously into mice for isolation attempts.

Caprine fetal tissues, placentas and tissues from inoculated mice were analyzed by the polymerase chain reaction (PCR) for *T. gondii* detection. Positive *T. gondii* DNA samples were genotyped by nested polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using the amplified markers nSAG 2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, PK1 and Apico. Thirteen percent (7/54) of the analyzed fetuses were *T. gondii* positive, mainly in SNC. One fetus had antibodies against *T. gondii*. *Toxoplasma gondii* DNA was detected in 17.6% (6/34) of the placentas. Successful isolation of *T. gondii* from the inoculated samples was not achieved. In this study, seroconversion was not detected in mothers when fetal infection occurred. The 42 sera of kids before ingesting colostrum were negative by IFAT, although 85.7 % of the kids were born from seropositive goats. In our study, we confirmed that transplacental transmission of *T. gondii* occurred in 13.3 % of goats with reproductive losses, from 2 herds with high seroprevalences in Buenos Aires province. All cases where *T. gondii* vertical transmission was confirmed resulted in abortion, stillbirths or neonatal deaths. Vertical transmission of *T. gondii* in clinically normal kids seems to have little importance in maintaining the infection in herds with high seroprevalence. DNA samples from 6 fetal tissues and 3 placentas were used for molecular characterization of *T. gondii*. Complete genotyping was achieved in tissues from 2 cases of goat abortion, while the rest of the samples could be partially

genotyped. The genotype from three fetuses (triplets) was identified as atypical, with most markers showing a type III restriction pattern, except C29-2 (type II), L358 and PK1 (both type I), and another complete genotype from a placenta showed a type II allelic pattern in this study. The genotypes of *T. gondii* that infected goats in Argentina were mostly atypical with a predominance of type III markers and were related to the genotypes found in other hosts of the same region. In Buenos Aires province it was possible to find genotype II associated with goat abortions. In our country, semi-intensive/intensive production systems are mainly dedicated to the production of dairy products, therefore, it is highly recommended to follow the necessary control measures in order to reduce possible *T. gondii* horizontal infection in goats.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario que se encuentra distribuido mundialmente y que afecta a un amplio rango de mamíferos y aves causando la enfermedad denominada toxoplasmosis. Pertenece al Phylum Apicomplexa, familia Sarcocystidae (Beck *et al.*, 2009). Fue hallado por primera vez en el año 1908 por los científicos Charles Nicolle y Louis Manceaux que estudiaban *Leishmania* en un roedor (*gundi* común, *Ctenodactylus gundi*) en el norte de África y en el mismo año por Splendore en conejos de Brasil. El nombre *Toxoplasma gondii* fue propuesto por Nicolle y Manceaux debido a las características morfológicas del parásito (del latín *toxon*: arco, *plasma*: vida) y al nombre del hospedador en que fuera descrito por ellos (*gondii* por *Ctenodactylus gundi*) (Ferguson, 2009; Morrisette y Ajioka, 2009).

En el año 1939 se confirmó el primer caso de toxoplasmosis transplacentaria en humanos por Wolf, Cowen y Paige en un bebé que murió al mes del nacimiento en Nueva York, Estados Unidos. Porciones de su corteza cerebral fueron inoculadas intracerebralmente en conejos y ratones que luego desarrollaron encefalitis. *Toxoplasma gondii* fue demostrado en las lesiones de estos últimos y se logró realizar el pasaje a otros ratones (Dubey, 2009). Posteriormente, Sabin logró aislar el protozoo desde el encéfalo de un niño de 6 años con encefalitis fatal, denominando al aislado RH, en conmemoración de las iniciales del nombre del paciente (Sabin y Cincinnati, 1941).

La transmisión congénita del parásito fue descrita en animales, principalmente en ovinos por Hartley y Marshall en 1957 y en ratones que presentaron infección congénita repetida por Beverly en 1959.

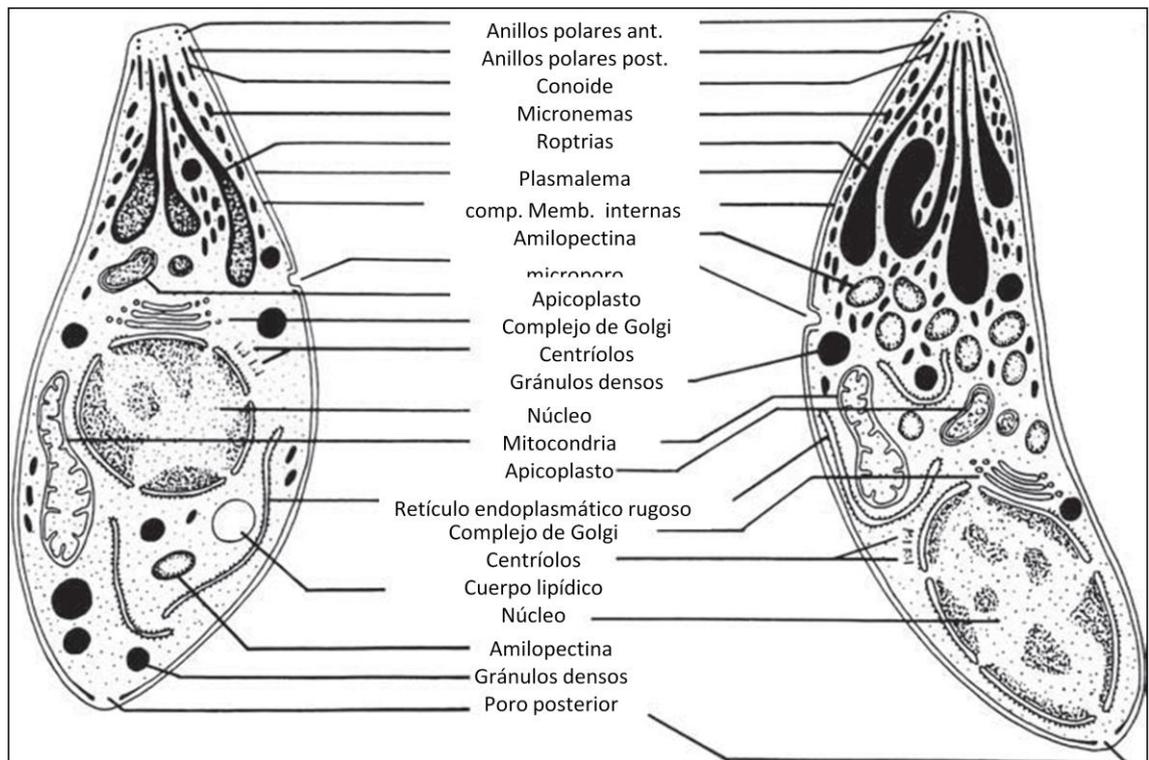
Más tarde, en la década del 60, fue descrita la transmisión horizontal del parásito. Primero se demostró la transmisión en humanos por el consumo de quistes en carnes mal cocidas y se determinó la importancia del carnivorismo en el ciclo, a través de distintos estudios realizados por Kean *et al.* (1969). Si bien esta forma de infección explicaba parte de la transmisión de *T. gondii*, aún no se podía determinar la amplia infección presente en animales herbívoros como así también en personas estrictamente vegetarianas, cuya prevalencia fue encontrada similar a la de personas no vegetarianas por Rawal en la India en el año 1959. Parte del misterio se resolvió por Hutchison en el año 1965 al realizar experimentos alimentando a felinos con quistes tisulares de *T. gondii* e inocular ratones con materia fecal de los felinos y observar que se inducía toxoplasmosis en los mismos. Esto llevó a que se comenzara a estudiar si existía otra forma infectante del parásito, hasta que finalmente en el año 1970 se descubrieron los ooquistes de *T. gondii* en la materia fecal de felinos en forma simultánea por varios grupos de trabajo (Dubey *et al.*, 1970a; 1970b). En ese mismo año, se conoció completamente el ciclo de vida de *T. gondii* al describirse la fase sexual del parásito en el intestino delgado del gato por Frenkel *et al.* (1970), y se realizó la caracterización morfológica y biológica de los ooquistes por Dubey *et al.* (1970b), diferenciándolos así de los ooquistes de otros coccidios. Se determinó que la contaminación ambiental con ooquistes era una fuente de infección para

las personas y animales (Dubey, 1996; Frenkel, 1973). Recién en el año 2006 se aislaron por primera vez ooquistes de *T. gondii* en agua potable almacenada en tanques de techos de escuelas y el hecho se vinculó epidemiológicamente a un brote de toxoplasmosis en Brasil (de Moura *et al.*, 2006).

1.2. Morfología de *T. gondii*

T. gondii es un parásito unicelular eucariota que presenta un extremo anterior agudo o conoidal y uno posterior redondeado. Ultraestructuralmente presenta un núcleo y un citoplasma con organoides que cumplen las distintas funciones vitales. En su interior tiene una mitocondria, microtúbulos subpeliculares, complejo de Golgi, ribosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, gránulos densos, gránulos de amilopectina y una organela similar a un plásmido denominado apicoplasto (Figura 1).

Figura 1. Ultraestructura del taquizoíto de *T. gondii* (modificado de Dubey, 2010).



En su extremo anterior presentan el denominado complejo apical que consiste en un grupo de organelas y estructuras microtubulares que permiten la adhesión penetración a la célula hospedadora (Dubey, 2010). Este complejo apical está constituido por anillos polares anteriores y posteriores, un conoide (estructura en forma de cono truncado formado por 6-8 microtúbulos enrollados en espiral dentro de los anillos polares) que puede girar, inclinarse, extenderse y retraerse al contactar con las células, roptrias de forma tubular o sacular que se extienden hacia la región posterior por dentro del conoide y secretan enzimas proteolíticas al exterior, micronemas (vesículas de 250 x 50 nm), gránulos densos (0,3 μm de diámetro) y microtúbulos subpelliculares que se originan del segundo

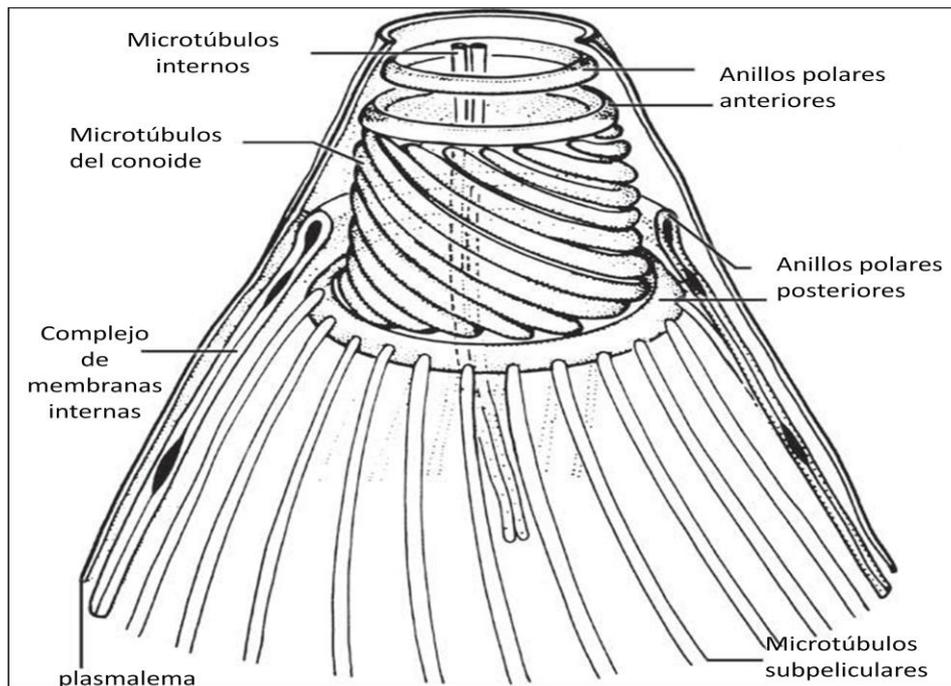
anillo polar y corren longitudinalmente a lo largo de la célula por debajo del complejo de membranas con una disposición en espiral (Dubey, 2010) (Figura 2).

Las funciones del complejo apical están relacionadas con la penetración a la célula hospedadora y con la formación de un ambiente intracelular adecuado para el crecimiento y desarrollo del parásito (Chiappino *et al.*, 1984; Nichols *et al.*, 1983; Saffer *et al.*, 1992). *Toxoplasma gondii* ingresa a la célula hospedadora por penetración activa de su membrana o por fagocitosis. Luego de ingresar, el parásito es rodeado por una membrana que deriva del plasmalema de la célula hospedadora y posteriormente secreta proteínas y produce una red tubular membranosa originando la vacuola parasitófora (VP) donde se aloja y comienza a replicarse (Sibley *et al.*, 1995).

Las estructuras del complejo apical se asocian a la presencia de gran cantidad de proteínas las cuales han sido identificadas y caracterizadas, debido a que tienen funciones específicas en el proceso de invasión celular y en la formación de la VP. Además, debido a que son de distinto peso molecular y la mayoría muy inmunogénicas, se utilizan para el desarrollo de distintas pruebas diagnósticas (Weis y Kim, 2007). Se han identificado las proteínas de las roptrias “ROP” (región del bulbo) y “RON” (región del cuello) de 44 kDa que son muy importantes en la invasión y formación de la VP; las proteínas de los gránulos densos, principalmente Gra1 (24 kDa), Gra2 (28,5 kDa), Gra4 (40 kDa) y Gra7 (29 kDa) que son secretadas dentro de la VP y colaboran con la creación de un medio ambiente favorable para la multiplicación del parásito en su interior y la formación del quiste tisular (Karsten *et al.*, 1998; Mercier *et al.*, 2005). Entre las

proteínas de superficie, que son las primeras en ponerse en contacto con las células en la invasión y productos de la respuesta inmune del hospedador, se encuentran SAG1 (P30) de 30 kDa, SAG2 de 22 kDa, SAG3 de 43 kDa (presente en taquizoítos y bradizoítos) y SRS3 de 35 kDa (Grimwood y Smith, 1995; Lekutis *et al.*, 2001). La proteína SAG1 ha sido descrita estructuralmente por Nagel y Boothroyd (1989) y es considerada un antígeno inmunodominante de *T. gondii* (Handman *et al.*, 1980; Lekutis *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 1985). Se detecta únicamente en los taquizoítos, siendo la proteína más abundante de la superficie de los mismos, donde se encuentra homogéneamente distribuida, además de encontrarse en la red tubular de la VP (Kasper, 1989; Manger *et al.*, 1998; McLeod *et al.*, 1991; Sibley *et al.*, 1986). También se ha comprobado que esta proteína cumple un rol fundamental durante la invasión celular del parásito (Grimwood y Smith, 1992; 1995; Mineo y Kasper, 1994). Se expresa en altos niveles en cepas virulentas de *T. gondii* como RH, por lo que se considera importante y relacionada con la virulencia (Windeck y Gross, 1996). Además ha sido utilizada para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis en numerosas especies (Hosseininejad *et al.*, 2009; Maksimov *et al.* 2011; Pardini *et al.*, 2012; Sager *et al.*, 2003).

Figura 2. Esquema del complejo apical de *T. gondii* (modificado de Dubey, 2010).



1.3. Ciclo biológico de *T. gondii*

Toxoplasma gondii posee un ciclo evolutivo indirecto facultativo donde los hospedadores definitivos (HD) son los felinos domésticos (*Felis silvestris catus*) y silvestres, mientras que los hospedadores intermediarios (HI) son todos los animales de sangre caliente: los mamíferos, entre ellos el hombre, e incluso mamíferos marinos y las aves (Dubey, 2010). *Toxoplasma gondii* presenta tres formas infectantes: los esporozoítos (en los ooquistes), los taquizoítos (estadios de multiplicación rápida) y los bradizoítos (estadios de multiplicación lenta) (Dubey *et al.*, 1998). Los ooquistes son eliminados con las heces de los hospedadores definitivos al medio ambiente, mientras que los taquizoítos y los

bradizoítos pueden encontrarse en los tejidos de todos los hospedadores (Dubey, 2010) (Figura 3).

Taquizoítos: Son los estadíos que se caracterizan por tener una rápida división intracelular, multiplicándose activamente en la fase aguda de la infección. Se localizan dentro de una VP en el citoplasma de diferentes tipos celulares. Presentan una forma similar a un gajo de naranja o de medialuna, con el extremo posterior romo y el anterior agudo donde se localiza el complejo apical. Su tamaño es de aproximadamente 6 μm de longitud x 2 μm de ancho, dependiendo del estado de división, con un núcleo de posición central.

Bradizoítos: Representan la forma de multiplicación lenta que desarrollan dentro de quistes tisulares. Miden aproximadamente 7 μm de longitud x 1,5 μm de ancho y se diferencian de los taquizoítos en que son más delgados, tienen menor cantidad de roptrias, más gránulos de amilopectina P.A.S. (Acido peryódico de Schiff) positivos y el núcleo es de localización terminal o subterminal. Los quistes tisulares son redondos u ovoides y su tamaño varía considerablemente entre 5 y 100 μm , dependiendo del número de bradizoítos que alojen en su interior. Los quistes de *T. gondii* poseen una pared elástica y delgada (< 0,5 μm). Se localizan preferentemente en el tejido nervioso (cerebro, médula, nervios y retina) y en menor medida en hígado y pulmones, donde son de forma esferoidal, y en el músculo esquelético y cardíaco donde tienden a ser más elongados, ya que toman la forma de la célula que los contiene (Tenter *et al.*, 2000). Los quistes pueden permanecer durante toda la vida en algunos hospedadores intermediarios. Se cree que la pared del quiste se rompe

periódicamente, reactivando a una multiplicación asexual rápida formando taquizoítos (Dubey, 1998a). Los bradizoítos son menos susceptibles a la destrucción por acción de las de las enzimas proteolíticas que los taquizoítos, lo que permite la transmisión horizontal por carnivorismo (Tenter *et al.*, 2000). Los quistes tisulares constituyen la etapa final del ciclo de vida en los HI (Tenter, 2009).

Esporozoítos: Son las formas parasitarias que se encuentran en el interior de los ooquistes. Los esporozoítos son similares a los taquizoítos, excepto en que presentan abundantes micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina. Miden 8 μm de longitud x 2 μm de ancho y el núcleo es de ubicación subterminal. Los ooquistes son esféricos y miden aproximadamente 10 x 12 μm . Cuando esporulan son subesféricos a elipsoidales, con dimensiones de 11 x 13 μm , conteniendo dos esporocistos en su interior con 4 esporozoítos cada uno.

Los tres estadios son infectantes tanto para los HI como para los HD que pueden adquirir la infección por dos vías: horizontal, a través de la ingestión de ooquistes esporulados desde el medio ambiente o por ingestión de quistes tisulares contenidos en carne cruda o poco cocida o en vísceras de los hospedadores intermediarios, o vertical, por pasaje de taquizoítos por placenta al feto (Buxton y Losson, 2007; Dubey, 1998a; Dubey, 2010). En algunos animales también se ha determinado el pasaje de taquizoítos por la leche de la madre a la cría (Camossi *et al.*, 2011; Hiramoto *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 1999). Así, *T. gondii* puede transmitirse desde HD a HI, desde HI a HD, como también entre hospedadores definitivos (en ausencia de hospedadores intermediarios) y entre

hospedadores intermediarios (en ausencia de hospedadores definitivos) (Tenter *et al.*, 2000).

Cuando un HD ingiere una forma infectante los protozoos desarrollan un ciclo intestinal que incluye una fase de multiplicación asexual (esquizogonia) y una fase de multiplicación sexual (gametogonia) que concluye con la formación de ooquistes. Estos ooquistes son eliminados junto con las heces de los felinos en forma inmadura y en el ambiente, bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad se produce la maduración de los ooquistes convirtiéndose en infectantes (esporogonia), formándose los esporozoítos en su interior. Estos ooquistes pueden permanecer viables por períodos de hasta 18 meses contaminando el suelo y las fuentes de agua y son infectantes tanto para HI como HD (de Moura *et al.*, 2006; Dumètre y Dardé, 2003; Lélou *et al.*, 2012).

Los felinos eliminan ooquistes luego de ingerir cualquiera de los tres estadios infectantes: taquizoítos, bradizoítos o esporozoítos, lo que se relaciona con la duración del período de prepatencia. La eliminación de ooquistes se produce en 3 a 10 días luego de la ingestión de quistes tisulares, mientras que el período prepatente es mayor a 18 días luego de ingerir ooquistes, independientemente de la dosis (Dubey, 1996; Dubey, 2001). El período de prepatencia luego de ingerir taquizoítos también es mayor a 18 días, pero se observó que en algunos gatos alimentados con taquizoítos el período prepatente fue de 11 a 17 días, probablemente relacionado a la ingestión de etapas de transición entre taquizoítos y bradizoítos (Dubey, 2005). Menos del 50 % de los felinos eliminan ooquistes al ingerir ooquistes o taquizoítos, mientras que cerca

del total de ellos eliminan ooquistes luego de ingerir quistes tisulares (Dubey, 1996; Dubey, 2001; Dubey, 2002; Dubey, 2005). Sólo se conoce con detalle lo que ocurre en los felinos luego de la ingestión de los quistes tisulares con bradizoítos; la pared del quiste se disuelve por las enzimas digestivas y los bradizoítos liberados penetran en las células epiteliales del intestino delgado e inician el desarrollo de varias generaciones del parásito hasta que la fase sexual se inicia dos días después con la formación de gametas. No se sabe que ocurre luego de la ingestión de ooquistes esporulados por en el gato, pero se supone que los esporozoítos inician una fase de multiplicación asexual como en los HI en los tejidos extraintestinales, donde primero se convierten en taquizoítos y posteriormente se convierten en bradizoítos, y en el curso de esta infección, algunos parásitos regresan al epitelio intestinal para iniciar la fase sexual del ciclo. En el caso de la ingestión de taquizoítos es más probable que la infección se produzca por penetración de la mucosa bucal y faríngea, ya que son menos resistentes a las enzimas digestivas y al ácido estomacal que los bradizoítos (Dubey, 2002; Dubey, 2005). Sin embargo, existen estudios donde los taquizoítos han sobrevivido luego de la administración por tubo estomacal (Dubey, 1998b; Dubey, 2005). La infección de los felinos cursa generalmente de forma asintomática y la transmisión vertical en ellos ocurre con poca frecuencia (Dubey, 2010). Los gatos generalmente eliminan grandes cantidades de ooquistes luego de una primera infección con *T. gondii*, pudiendo eliminar más de 100 millones de ooquistes al ambiente (Dubey, 1996). Hasta hace tiempo se consideraba que no volvían a eliminar ooquistes luego de una reinfección, sin

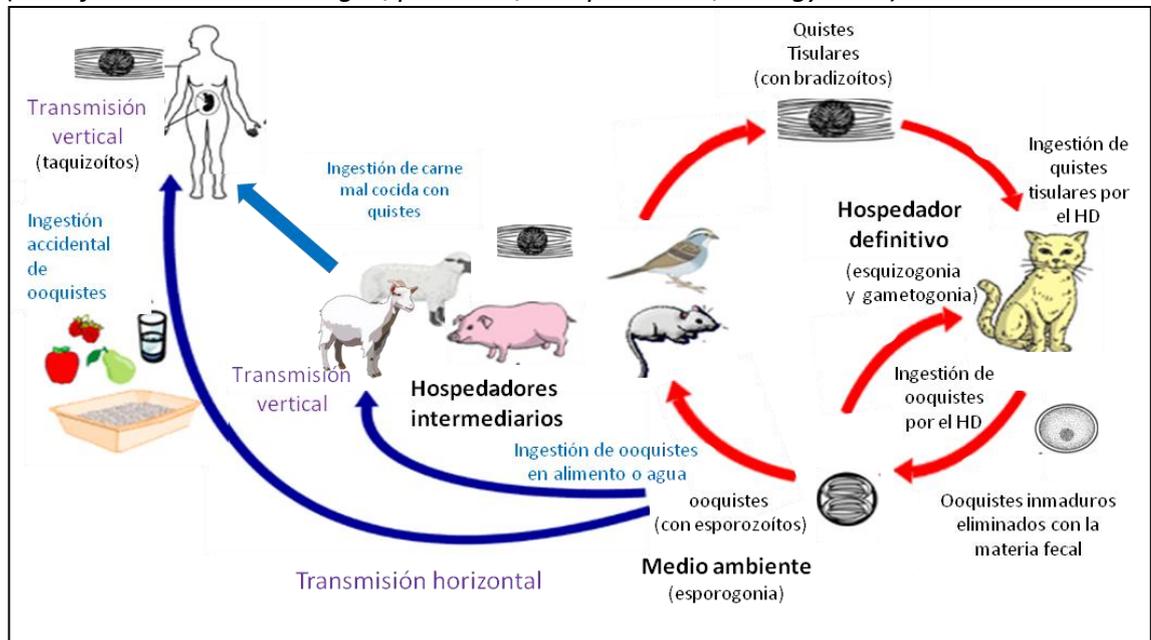
embargo, más recientemente se ha demostrado que pueden volver a hacerlo (Dubey, 2010). En algunos casos también se ha observado que algunos gatos vuelven a eliminar ooquistes aún sin reinfección (Dubey, 1995). Experimentalmente se ha determinado que la eliminación de ooquistes se vuelve a producir cuando existe coinfección con otros coccideos, como *Isoospora* spp. y en gatos a los que se les administraron corticoides (Dubey, 1995; Dubey, 2010).

En los HI se produce un ciclo extraintestinal con multiplicación del parásito en distintas células del organismo, luego de la ingestión de carne cruda, carne mal cocida o presas con quistes, o bien por la ingestión de ooquistes que contaminan aguas y alimentos. Cuando el HI ingiere las formas infectantes, éstas se liberan en el intestino, y se dirigen a distintas células donde se dividen. En este momento de invasión hay dos etapas: una de multiplicación asexual rápida, con formación de taquizoítos; y otra de multiplicación asexual lenta con formación de bradizoítos en quistes tisulares; así las carnes de las especies utilizadas para el consumo, son fuentes de infección si contienen quistes de *T. gondii* y se ingieren crudas o mal cocidas. El ciclo producido por la ingestión de ooquistes se ha estudiado en ratones, comprobándose que los esporozoítos penetran los enterocitos y llegan a la lámina propia donde se multiplican en células del endotelio vascular, fibroblastos, macrófagos y leucocitos; a las 12 horas p.i. se transforman en taquizoítos y en 6 días p.i. se forman los bradizoítos y los quistes tisulares. El ciclo inducido por la ingestión de quistes con bradizoítos por los HI sería similar al ciclo por ingestión de ooquistes, pero se ha demostrado que los bradizoítos son menos infecciosos que los esporozoítos para los ratones, ya que

la formación de taquizoítos se produce a los 2 días p.i. (Dubey *et al.*, 1997). Los felinos además de albergar el ciclo intestinal de *T. gondii* (HD), pueden comportarse como HI desarrollando un ciclo extraintestinal (Dubey, 2010). Sin embargo, el ciclo de *T. gondii* está más adaptado a la transmisión por carnivorismo en los gatos mientras que la transmisión por ooquistes es más eficiente en los HI (Dubey, 1996). (Figura 3).

Figura 3. Ciclo biológico de *T. gondii*.

(Modificado de www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html)



1.4. Genotipos de *T. gondii*

La estructura poblacional de *T. gondii* es muy compleja y presenta patrones geográficos distintos (Lehmann *et al.*, 2006). En los últimos años se ha avanzado sobre el estudio molecular de este parásito lográndose un mayor conocimiento de sus características y su comportamiento biológico. La mayoría

de los aislamientos de *T. gondii* de Europa y América del Norte han sido caracterizados por técnicas moleculares en tres genotipos típicos conocidos como tipo I, II y III que difieren notablemente en patogenicidad (Howe y Sibley, 1995; Sibley *et al.*, 2002), y se sugirió la distribución clonal del parásito, detectándose un predominio del tipo II (Lehmann *et al.*, 2006). A pesar de que estos genotipos presentan diferencias genéticas menores al 1 %, los mismos presentan diferencias fenotípicas importantes en virulencia para el ratón. Los genotipos tipo I, representadas por la cepa de referencia RH, son de alta patogenicidad para el ratón produciendo infecciones letales, ya que la inoculación de un único protozoo en un ratón causa su muerte en 8-12 días p.i., mientras que los de tipo II y III son menos virulentas en el modelo ratón (Sibley *et al.*, 2002). Sin embargo, en los últimos tiempos, una gran variabilidad genética ha sido determinada basada en la utilización de nuevos marcadores para su caracterización molecular, detectándose genotipos atípicos en otras regiones, principalmente en América del Sur; Asia y África (Ajzenberg *et al.*, 2002; Ajzenberg *et al.*, 2004; Dubey y Su, 2009; Dubey *et al.*, 2012; Herrmann *et al.*, 2012; Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2006). La diversidad genética hallada indica que es necesario realizar estudios para determinar la virulencia, patogenicidad y comportamiento *in vitro* de estos nuevos genotipos, ya que algunos de ellos han demostrado tener alta virulencia en las especies de las que fueron aisladas (Khan *et al.*, 2006). Conocer su relación con la presentación de la enfermedad en las distintas regiones y el comportamiento en las distintas especies animales, permitiría desarrollar nuevas estrategias de

diagnóstico y prevención (Beck *et al.*, 2009). Es importante conocer la variedad de genotipos que circulan en Argentina dado que podrían estar relacionados con casos clínicos en humanos y en animales (Bernstein *et al.*, 2018; Pardini *et al.*, 2016; Pardini *et al.*, 2019).

En cabras, los primeros aislamientos de *T. gondii* fueron obtenidos en Brasil por Spósito Filha *et al.* (1983) desde diafragmas de 3 de 95 cabras, y más tarde por Cavalcante *et al.* (2007) desde corazón de 2 de 169 cabras y por Ragozo *et al.* (2009) desde *pools* de cerebro, corazón, masetero y diafragma de 12 de 143 cabras destinadas a consumo humano. En los últimos años también se obtuvieron aislamientos a partir de tejidos de cabras destinadas a consumo en distintos países (Clementino Andrade *et al.*, 2013; Gebremedhin *et al.*, 2014a; Kalambhe *et al.*, 2017; Kyan *et al.*; 2012; Paştiu *et al.*, 2015; Rêgo *et al.*, 2017; Satbidge *et al.*, 2016). Otros aislamientos se obtuvieron a partir de abortos caprinos (de Oliveira *et al.*, 2018; Silva Filho *et al.*, 2008). También se han realizado estudios de caracterización molecular en sangre, leche y órganos de cabras (Hamilton *et al.*, 2015; Mancianti *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2015; Spišák *et al.*, 2010). Estudios realizados en Brasil y Argentina e incluso en Estados Unidos, han demostrado una diversidad genética importante también entre los aislamientos de cabras, con predominio de genotipos atípicos en muchos de los casos, tanto provenientes de material de abortos (Unzaga *et al.*, 2014) como de tejidos destinados al consumo humano (Clementino Andrade *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2011; Ragozo *et al.*, 2010; Rêgo *et al.*, 2017).

1.5. Importancia de la toxoplasmosis en humanos y animales

La toxoplasmosis es reconocida como una importante zoonosis y se considera que un tercio de la población humana mundial se encuentra infectada. La infección en el hombre puede cursar en forma subclínica, pero si ésta se produce durante el embarazo puede causar lesiones oculares y cerebrales de intensidad variable en los fetos; y el desarrollo de encefalitis en pacientes inmunosuprimidos (Weiss y Dubey, 2009).

En los animales, *T. gondii* presenta grados variables de patogenicidad según la especie determinando distintas presentaciones clínicas. Así se ha demostrado que algunos animales silvestres son altamente susceptibles al contraer la infección (Dubey, 2010), reportándose casos fatales en suricatas, canguros y monos de parques zoológicos (Basso *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2009; Moré *et al.*, 2010). Dentro de las especies de producción, los bovinos parecen ser poco susceptibles a la enfermedad y la ingestión de carne bovina aún no se considera una fuente de infección relevante en humanos aunque la seroprevalencia en esta especie suele ser elevada (Dubey, 2010; Moré *et al.*, 2008). En las aves domésticas la infección cursa de forma subclínica, pero el estudio en las aves de traspatio es importante debido a que pueden considerarse como centinelas de la contaminación ambiental por ooquistes en una región, lo que permite relacionar los genotipos hallados en ellas con los que podrían estar presentes en la población humana en la misma zona (Dubey, 2010; Moré *et al.*, 2012; Pardini *et al.*, 2016). En cerdos, la toxoplasmosis generalmente cursa en forma subclínica ocasionando en algunos casos natimortos o nacimiento de

animales débiles y la posibilidad de infección en ellos se relaciona con las condiciones de explotación, siendo mayor en los que se mantienen en forma extensiva (Venturini *et al.*, 1999; Venturini *et al.*, 2004). En pequeños rumiantes la toxoplasmosis es considerada una causa importante de problemas reproductivos en muchos países (Borde *et al.*, 2006; Buxton *et al.*, 2007; Chanton-Greutmann *et al.*, 2002; Duncanson *et al.*, 2001; Moeller *et al.*, 2001; Silva Filho *et al.*, 2008; van den Brom *et al.*, 2012; van Engelen *et al.*, 2014). En cabras los primeros en reportar la enfermedad fueron Feldman y Miller (1956) en un rebaño de Nueva York en Estados Unidos. Más tarde se describieron casos de infecciones naturales de toxoplasmosis asociadas a pérdidas reproductivas en cabras en Australia (Munday y Mason 1979) y en Estados Unidos (Dubey, 1981b; Dubey *et al.*, 1986). Los primeros estudios experimentales que permitieron conocer más de las características de esta enfermedad y de la importancia de la transmisión congénita en cabras fueron realizados en la década del 80 (Dubey, 1981a; 1982; 1988; 1989; Dubey *et al.*, 1980; 1985).

1.6. Vías de transmisión y signos clínicos en caprinos

Por mucho tiempo se consideró que la ingestión de pastura contaminada con ooquistes esporulados era la manera más significativa de infección para los pequeños rumiantes y luego se determinó la posibilidad de la transmisión vertical o transplacentaria de la que, sin embargo, se desconoce su relevancia en el mantenimiento de la enfermedad (Buxton y Losson, 2007; Dubey, 2010; Trees y Williams, 2005). Duncanson *et al.* (2001) determinaron que la vía vertical sería

la principal en el mantenimiento de la infección en un rebaño de ovinos que se mantuvo libre de gatos durante varios años. Hide *et al.* (2009) determinaron que la transmisión congénita ocurrió en el 66 % de las preñeces en un grupo de ovinos. Buxton *et al.* (2006) sugieren que la importancia de esta vía podría depender del genotipo de *T. gondii* implicado y recalcan la necesidad de evaluar su implicancia en la transmisión. Se especula que la transmisión vertical también podría ocurrir a través de la leche de la madre a la cría (Camossi *et al.*, 2011).

Dubey (1989) realizó estudios de infección experimental en cabras preñadas con distintas dosis de ooquistes (10, 100, 1000 y 10000) de una cepa virulenta, determinando que la signología se relacionaba con la dosis administrada. Todas las cabras presentaron fiebre entre los 2 y 5 días p.i.; las cabras infectadas con 100 o más ooquistes presentaron letargia, disminución del apetito, disnea y algunas de ellas diarrea; mientras que la mayoría de las cabras infectadas con 1000 o más ooquistes murieron entre los 7 y 20 días p.i. Todas las cabras infectadas que no murieron, abortaron o tuvieron cabritos infectados independientemente de la dosis recibida (Dubey, 1981a, Dubey *et al.*, 1980). Los signos de anorexia, fiebre y letargia en la primer semana posterior a la inoculación y la presencia de abortos, fueron también reportados por otros autores que realizaron infecciones experimentales en cabras adultas (Abou Zeid *et al.* 2010; Nishi *et al.*, 2001). Juránková *et al.* (2013) inocularon cabritos de 64-68 días con ooquistes, demostrando que todos comenzaron con anorexia y fiebre a los 6-7 días p.i., 5 de ellos tuvieron diarrea y 3 episodios de tos durante 5-7 días, sin presentar alteraciones bioquímicas ni sanguíneas.

Aunque las cabras parecieran presentar más signos clínicos en infecciones experimentales que otras especies (Dubey, 2010), la infección natural en cabras no gestantes transcurre generalmente en forma asintomática (Buxton y Losson, 2007; Dubey, 2010). El signo más característico en infecciones naturales por *T. gondii* en caprinos es la presencia de abortos y natimortos, aunque también se puede producir muerte embrionaria o nacimiento de cabritos débiles o de animales clínicamente normales pero infectados (Borde *et al.*, 2006; de Oliveira *et al.*, 2018; Masala *et al.*, 2003; Masala *et al.* 2007; Moreno *et al.*, 2012; Pescador *et al.*, 2007; Unzaga *et al.*, 2014).

Se ha sugerido que en los caprinos podría ocurrir la recrudescencia de una infección crónica durante la preñez, con eficiencia similar a lo que ocurre en bovinos infectados con *Neospora caninum*, basándose en infecciones experimentales donde los abortos se repetían, aún sin reinfección durante la preñez (Dubey, 1982). Esto difiere con lo que ocurre en ovinos en los que el pasaje de taquizoítos a través de la placenta se produce si hay primoinfección durante la preñez y el desarrollo de una efectiva respuesta inmunitaria previene los abortos en las subsiguientes infecciones (Buxton y Losson, 2007; Innes *et al.*, 2007; Rodger *et al.*, 2006). Sin embargo, más recientemente se ha sugerido que la transmisión de *T. gondii* en sucesivas gestaciones en ovinos es más común que lo que se creía (Buxton *et al.*, 2007; Duncanson *et al.*, 2001; Morley *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005). La vía vertical ha sido descrita de dos formas bien diferenciadas en bovinos infectados con *N. caninum*, parásito protozoario relacionado a *T. gondii* (Innes *et al.*, 2005). Se describe como transmisión

transplacentaria “exógena” a la transmisión al feto durante la infección aguda de la madre (primoinfección durante la gestación) y como transmisión transplacentaria “endógena” cuando el feto se infecta debido a una reactivación de una infección crónica latente de la madre. Este fenómeno de recrudescencia o reactivación ocurriría debido a los cambios inmunológicos que ocurren durante la gestación (Innes *et al.*, 2005; Innes *et al.*, 2007; Trees y Williams, 2005). Recientemente se demostró la transmisión transplacentaria endógena de *N. caninum* en ovinos (González-Warleta *et al.*, 2018).

1.7. Patogenia del aborto

La ocurrencia del aborto caprino por *T. gondii* depende del momento de la gestación en que se produce la transmisión del parásito al feto. Experimentalmente se determinó que cabras infectadas con *T. gondii* a los 51, 68 y 79 días de gestación tuvieron fetos reabsorbidos o retenidos; y de 14 cabras infectadas entre los 83 y 130 días de gestación, 1 presentó un aborto, 10 tuvieron cabritos nacidos muertos y 3 tuvieron cabritos nacidos vivos pero infectados (Dubey, 1981a). Abou Zeid *et al.* (2010) inocularon 12 cabras preñadas vía oral con ooquistes en distintos momentos de la gestación, observando que las cabras con 1-2 meses de gestación tuvieron reabsorción fetal, las cabras de 3 meses de gestación presentaron abortos a los 28 y 40 días p.i. y las cabras de más de 4 meses de gestación tuvieron cabritos viables.

Luego de la infección de una cabra preñada, la parasitemia se produce entre los 4 y 8 días p.i., *T. gondii* invade la placenta entre los 9 y 11 días p.i. y llega a los tejidos fetales 2 o 3 días después (Dubey, 1988; Dubey *et al.*, 1980). Se

ha demostrado que este parásito se distribuye ampliamente en tejidos de cabritos congénitamente infectados. De un total de 20 cabritos se aisló *T. gondii* a partir de cerebro, corazón y pulmones de 18 de ellos, de médula espinal en 15, de hígado en 14, de diafragma en 12 y de bazo y riñón en 10 (Dubey, 2010).

Las cabras pueden abortar antes de la segunda semana p.i. probablemente debido a la pirexia, mientras que el aborto en etapas posteriores ocurriría debido al daño placentario y/o de tejidos fetales. La multiplicación de *T. gondii* en los cotiledones placentarios produce daño local directo y necrosis progresiva de los mismos, lo cual podría originar la muerte fetal por insuficiente provisión de oxígeno y nutrientes (Buxton *et al.*, 1982; Dubey, 1988). Si el daño placentario no es tan marcado, y si la infección transplacentaria ocurre en la gestación temprana (menos de 50 días), se produce la muerte embrionaria y reabsorción fetal, debido a que el sistema inmune del feto es rudimentario y por lo tanto, no es capaz de montar una respuesta eficaz para controlar la multiplicación del parásito (Buxton y Losson, 2007). En etapas de la gestación más avanzada los efectos de la infección dependerán de la eficacia de la respuesta inmune del feto para lograr vencerla. Puede ocurrir muerte fetal, con aborto y momificación, más frecuentemente cuando la infección ocurre a la mitad de la gestación (70-90 días) y el nacimiento de cabritos muertos, cabritos débiles o cabritos sanos en la gestación tardía (más de 110 días), aunque algunos pueden nacer viables pero infectados (de Oliveira *et al.*, 2018; Dubey, 1981b; Dubey, 1982; Duncanson *et al.*, 2001; Moeller, 2001; Pescador *et al.*, 2007). Se ha

mencionado como frecuente en gestaciones múltiples, el nacimiento de un cabrito nacido muerto que puede estar acompañado por el nacimiento de uno nacido débil o un feto momificado (Buxton y Losson, 2007). En muchos casos se observan lesiones de la placenta. Es característica la presencia de áreas de necrosis, a veces calcificadas, en los cotiledones placentarios, que se observan macroscópicamente como focos blanquecinos de aproximadamente 3 mm de diámetro, mientras que las áreas intercotiledonarias no presentan lesiones o solamente presentan una leve congestión (Dubey, 1988; Buxton y Losson, 2007; Unzaga *et al.*, 2014; van den Brom *et al.*, 2012).

1.8. Diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos

La presencia de *T. gondii* puede determinarse con métodos de diagnósticos directos e indirectos (Dubey, 2010):

Métodos directos: son aquellos que permiten detectar la presencia del parásito o de su ADN. Si bien estos métodos permiten realizar el diagnóstico definitivo de la infección, la mayoría sólo son posibles de realizar como parte del diagnóstico *post mortem*. Se incluyen las técnicas parasitológicas, histopatológicas y moleculares (para detectar al parásito en tejidos o fluidos).

-Presencia de signos clínicos compatibles: La presencia de abortos es el signo más característico de la enfermedad en las cabras. El hallazgo de fetos momificados y de lesiones características en los cotiledones placentarios orienta al diagnóstico, pero no permiten realizar el diagnóstico definitivo, ya que estos

signos pueden presentarse en una variedad de enfermedades o bien estar ausentes en algunos casos de infección por *T. gondii* (Buxton y Losson, 2007).

-Presencia de lesiones histopatológicas compatibles: Es posible determinar lesiones microscópicas en cortes histopatológicos de placenta, cerebro, hígado, pulmón y corazón de los fetos. A veces pueden detectarse quistes tisulares y taquizoítos asociados a las lesiones. En el sistema nervioso central es frecuente encontrar lesiones necróticas asociadas a la infección (Caldeira *et al.*, 2011; Moeller, 2001; Nurse y Lenghaus, 1986; Pescador *et al.*, 2007, van den Brom *et al.*, 2012). Se describe como característica la meningoencefalitis multifocal no supurativa con gliosis, vasculitis y necrosis, con predominio de infiltrados de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos (Moeller, 2001; Pescador *et al.*, 2007; Slosárková *et al.*, 1999). También puede encontrarse leucomalacia como lesión secundaria en el cerebro fetal, debido a la anoxia causada por la progresiva necrosis multifocal de los cotiledones (Buxton *et al.*, 1982; Buxton y Finlayson, 1986). Algunos trabajos clasifican las lesiones del sistema nervioso central como “características” cuando se encuentran focos necróticos multifocales, rodeados de células inflamatorias o focos múltiples de infiltrados no supurativos, y lesiones “compatibles” cuando se encuentran lesiones más leves, con escasos focos gliales o gliosis difusa sin áreas necróticas (Moreno *et al.*, 2012; Pereyra- Bueno *et al.*, 2004). En las placentas se observan focos de necrosis coagulativa en los cotiledones placentarios afectados, que se mineralizan con el tiempo; la inflamación asociada es no supurativa, con presencia de células mononucleares, y en algunos casos de infección temprana

pueden encontrarse parásitos en la periferia de las áreas necróticas (Buxton *et al.*, 1982; Moeller, 2001; Pereyra- Bueno *et al.*, 2004, van den Brom *et al.*, 2012). En los pulmones, corazón e hígado se pueden observar lesiones de necrosis coagulativa focales asociadas a inflamación no supurativa dependiendo de la edad fetal (Pescador *et al.*, 2007; Buxton y Losson, 2007) o bien sólo infiltrados mononucleares (Caldeira *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012; Pereyra- Bueno *et al.*, 2004; van den Brom *et al.*, 2012). Las lesiones histopatológicas ocasionadas por *T. gondii* son similares a las presentes en abortos producidos por *N. caninum*, por lo que es necesaria la confirmación del agente etiológico a través de otras técnicas más específicas (Moeller, 2001; Moreno *et al.*, 2012; Pescador *et al.*, 2007).

-Identificación de los parásitos por Inmunohistoquímica: La inmunohistoquímica permite la detección del parásito en cortes de tejidos de animales infectados mediante la utilización de anticuerpos específicos y confirma el diagnóstico de la infección. Además, permite relacionar la presencia del parásito con las lesiones histopatológicas (Buxton y Losson, 2007). Se utiliza para la detección de quistes o taquizoítos en tejidos fijados con formol (Chanton - Greutmann *et al.*, 2002; Pescador *et al.*, 2007; Moeller, 2001, van den Brom *et al.*, 2012).

-Aislamiento de los parásitos: El aislamiento se puede realizar inoculando diferentes cepas de ratones de laboratorio con material proveniente de órganos de animales infectados. Los tejidos más recomendados para la inoculación son: cerebro, pulmón e hígado de animales que han sufrido la infección. También

puede inocularse material de abortos, aunque es difícil obtener resultados exitosos, sobre todo si los tejidos se encuentran muy autolizados. Los órganos se homogenizan con solución fisiológica y antibióticos (penicilina-estreptomicina). A los 7-10 días p.i. se determina la presencia de taquizoítos realizando un lavado peritoneal en los ratones inoculados y si el animal muere en el transcurso de la infección se determina la presencia de taquizoítos en pulmón o quistes en el sistema nervioso central mediante observación en fresco al microscopio óptico. Los quistes tisulares pueden encontrarse a partir de las 4-6 semanas p.i. En el caso de no encontrarse el parásito, se debe determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en el suero del animal inoculado. La mayoría de los ratones presentan anticuerpos anti-*T. gondii* dentro de los 30 días p.i. pero ocasionalmente hasta los 2 meses, por lo que es recomendable continuar con la observación durante ese período (Dubey, 2010). A partir de los quistes tisulares, o más frecuentemente a partir de los taquizoítos obtenidos por lavado peritoneal o de los pulmones, pueden infectarse cultivos celulares que se mantienen hasta observar el crecimiento del parásito (Dubey, 2010).

-Identificación de *T. gondii* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La técnica de PCR puede utilizarse para verificar la presencia de este parásito en los tejidos a través de la identificación de fragmentos de ADN específicos, lo que a su vez permite diferenciarlo de otros protozoos utilizando *primers* específicos (Howe *et al.*, 1995; Sibley *et al.*, 2002). Puede llevarse a cabo a partir de muestras de diversos tejidos de animales infectados, e incluso de fetos y tejidos autolizados (Buxton y Losson, 2007). La desventaja de esta prueba

son los resultados falsos negativos, especialmente si se utiliza para la extracción de ADN una limitada cantidad de material. *Toxoplasma gondii* puede detectarse por PCR usando distintos marcadores, como los que permiten la amplificación de la secuencia del gen B1 (Burg *et al.*, 1989); la subunidad ribosomal RNA (Tenter *et al.*, 1994), la secuencia ITS1 (Hurtado *et al.*, 2001) y el fragmento repetitivo de 529 pb (Homan *et al.*, 2000). La técnica de PCR se ha utilizado como diagnóstico en la detección del parásito en fetos abortados y tejidos de pequeños rumiantes (Amdouni *et al.*, 2017; Asgari *et al.*, 2011; Duncanson *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2015; Kalambhe *et al.*, 2017; Masala *et al.*, 2003; Sreekumar *et al.*, 2004). La *nested* PCR seguida por cortes con enzimas de restricción (RFLP-PCR) es una de las técnicas más frecuentemente utilizada para determinar el genotipo de *T. gondii* presente en tejidos caprinos (Cavalcante *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2015; Ragozo *et al.*, 2010; Rêgo *et al.*, 2017). La caracterización molecular de *T. gondii* permite mejorar el diagnóstico y es una herramienta importante para diferenciar genotipos en relación con su virulencia y determinar fuentes de infección (Su *et al.*, 2006).

Métodos indirectos: Se basan en la detección de anticuerpos anti- *T. gondii* generados por la infección en suero sanguíneo, líquidos fetales y leche, a través del uso de distintas pruebas inmunoserológicas. En cabras se pueden utilizar para determinación de la prevalencia de la enfermedad en los rebaños y para el diagnóstico del aborto (Borde *et al.*, 2006; Silva Filho *et al.*, 2008). La detección de anticuerpos específicos en una única muestra de suero establece que el animal ha estado infectado en algún momento en el pasado. El aumento

en el título de anticuerpos (seroconversión positiva) determinado en 3-4 semanas después de la detección en la primera muestra indica una infección aguda (Dubey, 2010; Juránková *et al.*, 2013; Vitor *et al.*, 1999).

En el caso de abortos, la determinación de anticuerpos anti-*T. gondii* en una única muestra de suero de la madre abortada no es determinante para el diagnóstico del mismo, mientras que la identificación de anticuerpos específicos en los líquidos fetales confirma la infección fetal (Dubey, *et al.*, 1986; Marques *et al.*, 2012). Se debe tener en cuenta que la presencia de anticuerpos dependerá de la edad del feto y del grado de desarrollo de su sistema inmune (Duncanson *et al.*, 2001; Tizard, 2009). Por esa razón, la serología fetal negativa no siempre indica ausencia de infección. También se sugiere tomar muestras de sueros de una misma cantidad de animales que abortaron y que no abortaron para poder detectar asociaciones entre presencia de abortos y títulos de anticuerpos como se recomienda para el diagnóstico del aborto por *N. caninum* en bovinos (Campero *et al.*, 2017). Para establecer el nacimiento de animales infectados congénitamente, pero clínicamente sanos, es posible detectar la presencia de anticuerpos específicos en suero de cabritos previo a mamar el calostro, ya que su presencia indica que existió infección transplacentaria y (Dubey *et al.*, 1985; 1986). Los anticuerpos adquiridos en forma pasiva a través del calostro declinan a los 3 meses de edad y desaparecen aproximadamente a los 5 meses de edad; por lo que, los anticuerpos específicos en caprinos mayores de 6 meses indicarían infección (Dubey, 2010; Rahman *et al.*, 2015).

Las pruebas indirectas más utilizadas en caprinos son la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la prueba de aglutinación modificada (MAT), la aglutinación indirecta y enzimoimmunoensayo (ELISA) (Buxton y Losson, 2007; Dubey, 2010). La prueba de *Immunoblot* (IB) también se ha utilizado en algunos casos en pequeños rumiantes (Conde *et al.*, 2001; Wastling *et al.*, 1994). Estas pruebas presentan distinta sensibilidad y especificidad según las características del antígeno utilizado. Algunas de las pruebas utilizan como antígeno taquizoítos enteros, por lo que los epitopes superficiales son los que están expuestos; en otras pruebas se utilizan taquizoítos fragmentados por diferentes métodos, en los cuales están mayormente expuestos los epitopes citoplasmáticos (Buxton y Losson, 2007). Las características de cada una de ellas se describen a continuación:

-Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): Es una prueba muy utilizada en los pequeños rumiantes para el diagnóstico de la toxoplasmosis (Dubey, 2010; Munday y Corbould, 1971). Se utiliza como antígeno taquizoítos enteros inactivados, fijados a un portaobjetos que se enfrenta al suero problema. Para revelar la unión se utiliza un conjugado o anticuerpo secundario unido a una sustancia fluorescente o fluorocromo, que al ser excitada por luz ultravioleta emite un haz de luz que se visualiza con un microscopio de epifluorescencia. Es importante tener en cuenta que, si bien el antígeno puede utilizarse para el diagnóstico en cualquier especie, como conjugado se debe utilizar anti-inmunoglobulina especie específica. Los conjugados de anti-Ig G o Ig M caprina marcados con isotiocianato de fluoresceína están disponibles

comercialmente. La interpretación de sus resultados requiere de personal entrenado debido a que su lectura presenta cierto grado de subjetividad y la técnica consume mucho tiempo si se analiza un gran número de muestras. El título de corte utilizado en esta prueba dependerá del objetivo del estudio que se realice y del laboratorio (Buxton y Losson, 2007; Opel *et al.*, 1991).

-Prueba de Aglutinación Directa Modificada (MAT): El desarrollo de una prueba de aglutinación directa ha sido muy importante para el diagnóstico de la toxoplasmosis en humanos y en animales, ya que para realizarla no se requiere de equipos especiales ni conjugados (Dubey, 2010). La prueba original fue mejorada por Desmonts y Remington (1980) y posteriormente por Dubey y Desmonts (1987) que la llamaron prueba de aglutinación modificada (MAT). En esta prueba los taquizoítos naturalmente particulados aglutinan directamente frente a la presencia de anticuerpos específicos en el suero problema. La prueba se realiza en una policubeta de fondo en U donde se realizan las diluciones de suero. Es una prueba de fácil realización e interpretación ya que la unión antígeno-anticuerpo se observa a simple vista y puede utilizarse en distintas especies, ya que no usa un conjugado especie-específico para su revelado (Buxton y Losson, 2007). El suero se puede tratar con 2-mercaptoetanol que actúa sobre la inmunoglobulina M sérica, lo que permite diferenciar infecciones agudas de crónicas al detectar únicamente las Ig G, por lo que a veces puede no detectar animales que se encuentran durante las etapas tempranas de la infección (Dubey *et al.*, 1987). También requiere de mayores cantidades de taquizoítos y de suero para que la reacción sea visible a ojo desnudo. La prueba

es sencilla de realizar y de leer, se puede utilizar para diagnosticar toxoplasmosis tanto en forma individual como en un gran número de muestras (Buxton y Losson, 2007). Resultados de MAT positivos se han relacionado a casos de aislamientos caprinos (Dubey *et al.*, 2011; Ragozo *et al.*, 2009) y Da Silva *et al.* (2002) determinó que el MAT tiene buena concordancia en relación a la IFI para el diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos.

-Aglutinación Indirecta: En esta prueba las fracciones antigénicas son adsorbidas a partículas utilizando como soporte glóbulos rojos (hemoaglutinación indirecta) (HAI) o partículas de látex (aglutinación en látex) (LAT). Existen kits comerciales que se han utilizado en cabras (Bawm *et al.*, 2016; Figueredo *et al.*, 2001; Jittapalapong *et al.*, 2005; Opel *et al.*, 1991; Rahman *et al.*, 2014; Samad *et al.*, 1993). Si bien pueden utilizarse para estudios de prevalencia serológica, no son aconsejables para el diagnóstico y seguimiento serológico ya que presentan menor sensibilidad en cabras en relación a otras pruebas (Figueredo *et al.*, 2001; Patton *et al.*, 1990). Por otra parte se debe tener en cuenta que varias de estas pruebas comerciales de aglutinación indirecta son producidas para la detección de anticuerpos en humanos, por lo que no es aconsejable su uso en animales sin haberlas validado en la especie correspondiente.

-Enzimoimmunoensayo (ELISA): Esta prueba es ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos para toxoplasmosis en pequeños rumiantes y ha tomado relevancia en los últimos años debido a su objetividad en la lectura y a la cantidad de muestras que es posible procesar simultáneamente. Como la IFI,

el ELISA es específico para cada especie y puede distinguir entre tipos de inmunoglobulina (Ig G o Ig M) detectada (Buxton y Losson, 2007). Es apropiada para la serología de rutina y para los estudios epidemiológicos (Vitor *et al.*, 1999). En esta prueba la unión antígeno-anticuerpo se revela por un conjugado especie-específico unido a una enzima que, al reaccionar con su sustrato específico en presencia de un cromógeno, produce una reacción coloreada. Es una prueba que permite la detección de cantidades pequeñas de complejos antígeno-anticuerpo. La lectura de la reacción se hace con un espectrofotómetro (lector de ELISA) que mide las densidades ópticas de la reacción de color (DO), por lo que permite una lectura objetiva de los resultados. La prueba de ELISA tiene sensibilidad variable, de acuerdo al tratamiento del antígeno. Los conjugados, sustratos y kits completos están disponibles comercialmente (Bartova y Sadlak, 2012; Deng *et al.*, 2016; Iovu *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2018). Los ELISAs pueden realizarse con extracto soluble de *T. gondii* (García *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 2014; Medeiros *et al.*, 2014; van der Puije *et al.*, 2000) o con taquizoítos enteros que se colocan en placas de microtitulación (Figueiredo *et al.*, 2001). Los ELISAs utilizados para el diagnóstico de la toxoplasmosis en cabras han determinado valores similares a los encontrados por IFI (Carneiro *et al.*, 2009; Czopowicz *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2001; Fortes *et al.*, 2018; García *et al.*, 2012; van der Puije *et al.*, 2000).

Para mejorar la especificidad del ELISA para *T. gondii* se han desarrollado ELISAs con antígenos recombinantes, pero en algunos casos han demostrado una sensibilidad más baja que otros métodos utilizados en animales (Gamble *et al.*,

2000; Pardini, 2011; Sager et. al, 2003). También se han desarrolla ELISAs con antígenos específicos de *T. gondii* purificados por afinidad, como el antígeno de superficie P30 o SAG1 (Lekutis *et al.*, 2001) que demostraron tener buena sensibilidad y especificidad (Sager *et al.*, 2003). Estudios realizados por Hosseinejad *et al.* (2009) utilizaron la proteína nativa TgSAG1 de PM 30 Kda de *T. gondii* para la detección de anticuerpos en perros, y Maksimov *et al.* (2011) en patos y gansos. Esta prueba ha demostrado una sensibilidad del 94,5 % y especificidad del 93,6 % en sueros de perros (Hosseinejad *et al.*, 2009). También se ha estandarizado su utilización en cerdos en nuestro medio (Pardini *et al.*, 2012) y actualmente proponemos su utilización en otras especies domésticas, especialmente en pequeños rumiantes. También existen ELISAs adaptados para detectar el aumento de la avidéz de la Ig G que permiten estimar el momento de la infección. Esta avidéz puede ser medida y usada para indicar si una infección por *T. gondii* es reciente o crónica (Buxton y Losson, 2007). Estos tests se basan en que a medida que la respuesta inmune madura luego de producida la infección, los anticuerpos aumentan su avidéz (afinidad funcional) por el antígeno. Los anticuerpos producidos en forma temprana de menor afinidad forman enlaces lábiles en la unión antígeno-anticuerpo que pueden disociarse incluyendo una incubación con urea de manera que los valores de avidéz altos descartarían infecciones recientes (Sager *et al.*, 2003; Basso *et al.*, 2017). Los ELISAs de avidéz han sido utilizadas en el diagnóstico de toxoplasmosis en humanos desde hace ya tiempo (Lappalainen y Hedman, 2004). En animales, un ELISA-P30 de avidéz ha dado buenos resultados en el diagnóstico de la

toxoplasmosis en ovinos (Sager *et al.*, 2003) al igual que un kit de ELISA comercial modificado en cerdos (Basso *et al.*, 2017). También se reporta su uso en cabras en trabajos de Brasil como complemento de otras pruebas (Carneiro *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2013). Bahia *et al.* (1995) determinaron que soluciones con alta concentración de urea permitieron discriminar entre infecciones agudas y crónicas en cabras, y que los valores de avidéz aumentan a los 100 días p.i. en esta especie.

-Immunoblot (IB): En esta prueba la unión antígeno-anticuerpo se produce sobre una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF) donde previamente se han transferido las proteínas de *T. gondii*, luego de realizar una corrida electroforética de las mismas en un gel de poliacrilamida. Las diferentes fracciones antigénicas o antígenos inmunodominantes (IDAs) se enfrentan con los sueros problemas. Luego se utiliza un conjugado formado por un suero anti-Ig especie específico unido a la enzima peroxidasa, que actúa sobre un sustrato en presencia de un cromógeno, produciendo un cambio de color. El reconocimiento de los antígenos de acuerdo a su peso molecular a los que se les ha unido el suero problema confirma la infección (Buxton y Losson, 2007). La prueba de IB también permite detectar anticuerpos específicos en los sueros de animales, pero no se utiliza como prueba de rutina debido a que es una técnica muy laboriosa. Puede usarse como prueba confirmatoria y para descartar reacciones cruzadas en sueros que dan resultados distintos por otras pruebas serológicas (Buxton y Losson, 2007). Esta prueba ha sido utilizada también en pequeños rumiantes para estudiar la respuesta inmune en infecciones

experimentales con *T. gondii* en caprinos (Conde *et al.*, 2001) y frente a la vacunación en ovinos (Wastling *et al.*, 1994).

1.9. Prevalencia de la toxoplasmosis en caprinos

En la mayoría de los estudios que comparan la presencia de anticuerpos para *T. gondii* entre distintas especies animales, se observó que los pequeños rumiantes presentan mayores seroprevalencias que los bovinos (Chikweto *et al.*, 2011; Gondim *et al.*, 1999; Meireles *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2014; Sharif *et al.*, 2007; Tilahun *et al.*, 2018).

Los estudios de seroprevalencia de toxoplasmosis caprina se han realizado desde hace tiempo, detectándose tasas de infección muy variables en los distintos países (Dubey, 2010). Los datos más recientes de seroprevalencias en cabras estudiadas en el mundo se detallan en la tabla 1, donde se observa que varían entre el 4,6 y el 73,3 %, determinándose los valores más altos en Serbia (Djokic *et al.*, 2014).

Tabla 1. Seroprevalencia de *T. gondii* en cabras en distintos países.

País (Referencia)	Prueba utilizada	Título de corte	Nº de cabras	% seropositivas
Serbia (Djokic <i>et al.</i> , 2014)	MAT	25	431	73,3 %
Rep. Checa (Bartova y Sedlak, 2012)	ELISA	PP 50%	251	66 %
Bangladesh (Rahman <i>et al.</i> , 2014)	LAT	32	146	61 %
Bulgaria (Prelezov <i>et al.</i> , 2008)	HAI	80	364	59,8 %
Egipto (Barakat <i>et al.</i> , 2009)	HAI	80	306	59,4 %
Países del Caribe (Hamilton <i>et al.</i> , 2014)	ELISA	ND	442	52,9 %
Rumania (Iovu <i>et al.</i> , 2012)	ELISA	PP 30%	735	52,8 %
España (Díaz <i>et al.</i> , 2016)	MAT	ND	638	48 %
Rusia (Shuralev <i>et al.</i> , 2018)	LAT	32	216	43,9 %
Pakistán (Ahmed <i>et al.</i> , 2016)	ELISA	ND	530	42,8 %
China (Zhou <i>et al.</i> , 2018)	ELISA	PP 30%	332	42,5 %
Italia (Gazzonis <i>et al.</i> , 2015)	IFI	64	474	41,7 %
India (Bharati <i>et al.</i> , 2003)	MAT	64	165	41,2 %
Malasia (Chandrawathani <i>et al.</i> , 2008)	IFI	200	200	35,5 %
Uganda (Bisson <i>et al.</i> , 2000)	ELISA	PP 25%	784	31 %
México (Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2011)	MAT	25	562	31 %
Grecia (Tzanidakis <i>et al.</i> , 2012)	ELISA	I 0,0429	541	30,7 %
Irán (Sharif <i>et al.</i> , 2007)	IFI	16	400	30 %
Tailandia (Jittapalapong <i>et al.</i> , 2005)	LAT	64	631	27,9 %
Etiopía (Tilahun <i>et al.</i> , 2018)	ELISA	PP 50%	410	27,6 %
Ghana (van der Puije <i>et al.</i> , 2000)	ELISA	OD 0,45	526	26,8 %
Brasil (Calvacante <i>et al.</i> , 2008)	ELISA	IR \geq 1	2362	25,1 %
Nueva Zelanda (Opel <i>et al.</i> , 1991)	LAT	64	298	24,8 %
Tanzania (Swai y Kaaya, 2013)	LAT	16	337	19,3 %
Portugal (Lopes <i>et al.</i> , 2013)	MAT	20	184	18,5 %
Noruega (Stormoen <i>et al.</i> , 2012)	MAT	40	2188	17 %
Holanda (Deng <i>et al.</i> , 2016)	ELISA	PP 50%	1664	13,3 %
Birmania (Bawm <i>et al.</i> , 2016)	LAT	64	281	11,4 %
Estados Unidos (Yaglom <i>et al.</i> , 2014)	LAT	32	367	6,8 %
Corea (Jung <i>et al.</i> , 2014)	ELISA	PP 30%	610	5,1 %
Nigeria (Kamani <i>et al.</i> , 2010)	ELISA	ND	372	4,6 %

IFI: Inmunofluorescencia indirecta; MAT: aglutinación directa modificada; LAT: aglutinación indirecta en látex; HAI: hemoaglutinación indirecta; ND: no descripto; PP: porcentaje de positividad; OD: densidad óptica; I: índice relativo al control positivo; IR: índice relativo al promedio de los controles negativos.

En América del Sur la toxoplasmosis en caprinos ha sido ampliamente estudiada en Brasil, donde se determinaron los valores de seroprevalencias más altas en la región nordeste, que es donde se concentra la mayor parte de la cría de caprinos: 40,4 - 47,6 % en Pernambuco (Bispo *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2003), 37 - 47,1 % en Rio Grande del Norte (Medeiros *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2013) y 39 % en Alagoas (Anderlini *et al.*, 2008). También se describen seroprevalencias menores del 28,9 % en Bahía (Gondim *et al.*, 1999), 25,1 % en Ceará (Cavalcante *et al.*, 2008) y en Paraíba se observó que la seroprevalencia disminuyó del 24,5 % a 18,1 % (de Sousa *et al.*, 2012; Faria *et al.*, 2007). En la región sudeste la seroprevalencia fue del 29,1 % en Río de Janeiro (Luciano *et al.*, 2011), en Minas Gerais se observó un aumento del 19,5 % al 45,8 % (Carneiro *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2001), mientras que en Sao Paulo los valores fueron del 14,5 % hasta el 28,7 % (Figliuolo *et al.*, 2004; Mainardi *et al.*, 2003; Meireles *et al.*, 2003). En la región sur se encontraron seroprevalencias de 30 % - 44,7 % en Paraná (Fortes *et al.*, 2018; García *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2007; Sella *et al.*, 1994) y del 30 % en Rio Grande del Sur (Maciel, 2005). En el estado de Goiás de la región centro-oeste del país se determinó una seroprevalencia del 43,1 % (Linhares *et al.*, 1999).

La variación regional en las seroprevalencias descritas puede deberse a diferencias en la población estudiada y a la presencia de diferentes factores de riesgo de infección (Tenter *et al.*, 2000). También influyen en los resultados las pruebas serológicas y los títulos de corte utilizados (Dubey, 2010; Sharif *et al.*,

2015). Se ha observado que existen diferencias en estudios de un mismo país dependiendo del número de animales analizados y de la región geográfica estudiada (Díaz *et al.*, 2016; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Gebremedhin *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Zewdu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2018)

Muchos trabajos analizaron los factores de riesgo asociados con la infección por *T. gondii* en cabras. La edad de los animales es el factor más estudiado, demostrándose en la mayoría de los estudios que el número de animales seropositivos aumenta con la edad de los mismos (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011; Anderlini *et al.*, 2011; Iovu *et al.*, 2012; Jittapalapong *et al.*, 2005; Kamani *et al.*, 2010; Opel *et al.*, 1991; Ramzan *et al.*, 2009; Teshale *et al.*, 2007; Tilahun *et al.*, 2018). Otros factores estudiados han sido el sexo de los animales, la raza, el sistema de crianza, manejo y prácticas sanitarias de las cabras (Bisson *et al.*, 2000; Gazzonis *et al.*, 2015; Gebremedhin *et al.*, 2013; Jittapalapong *et al.*, 2005; Tzanidakis *et al.*, 2012). La presencia de gatos y el clima húmedo han sido detectados como factores de riesgo relevantes para la toxoplasmosis caprina (Anderlini *et al.*, 2011; Bawm *et al.*, 2016; Cavalcante *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2016; Díaz *et al.*, 2016; Neto *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2003; Zi-hui *et al.*, 2015).

Los estudios poblacionales en los que se han realizado la detección de *T. gondii* proveniente de material de aborto de cabras son escasos, lo cual podría relacionarse con la dificultad de obtenerlos. Moeller (2001) confirmó por lesiones histopatológicas que *T. gondii* fue la causa del 3,3 % de 211 abortos caprinos en California, Estados Unidos, y van den Brom *et al.* (2012) del 5,9 % de 170 fetos analizados en Holanda. Moreno *et al.* (2012) detectaron ADN de *T.*

gondii en el 3,8 % de 26 fetos caprinos en España. En Italia Masala *et al.* (2003) encontraron ADN de *T. gondii* en el 6,4 % de 356 tejidos fetales caprinos y más tarde hallaron ADN en el 13 % de 23 fetos caprinos y el 25 % de 8 placentas (Masala *et al.*, 2007). También *T. gondii* fue hallado en el 15 % de 144 fetos caprinos en Suiza (Chanton –Greutmann *et al.*, 2002) y en el 17 % de 24 fetos caprinos en Holanda (van Engelen *et al.*, 2014).

En nuestro país los datos serológicos sobre la toxoplasmosis en cabras son escasos (Venturini *et al.*, 1993), así como la relación de la prevalencia de esta enfermedad en cabras con diferentes condiciones de manejo y con la frecuencia en la aparición de abortos; sin embargo, se ha descrito el aislamiento de *T. gondii* a partir de material proveniente de un aborto caprino que fue recientemente identificado genéticamente como atípico (Unzaga *et al.*, 2014).

1.10. Prevención y aspectos zoonóticos

Se ha indicado que la toxoplasmosis es una de las zoonosis parasitarias más importantes debido a su alta incidencia en humanos (EFSA, 2007). La mayoría de las infecciones en las personas se adquiere en forma postnatal y los diferentes estadios del protozoo son infectantes para humanos (Tenter, 2009). Los taquizoítos de *T. gondii* cumplen un rol importante en la transmisión vertical o congénita pasando al feto a través de la placenta. El consumo de tejidos que contengan taquizoítos podría originar la infección (Tenter, 2009). Los taquizoítos se han encontrado en leche de varias especies, incluidas las cabras, ovejas y bovinos (Camossi *et al.*, 2011; Dubey *et al.*, 1980; Hiramoto *et al.*, 2001;

Mancianti *et al.*, 2013), pero sólo el consumo de leche de cabra no pasteurizada ha sido asociada a casos de toxoplasmosis humana (Chiari *et al.*, 1984; Riemann *et al.*, 1975; Sacks *et al.*, 1982; Skinner *et al.*, 1990; Walsh *et al.*, 1999). Más recientemente la excreción de *T. gondii* en leche se reportó en cabras infectadas experimentalmente (Dubey *et al.*, 2014) y se han realizado en los últimos tiempos estudios moleculares en leche caprina proveniente de cabras con infección natural (Amaria *et al.*, 2016; Bezerra *et al.*, 2015; Cisak *et al.*, 2017; da Silva *et al.*, 2015; Mancianti *et al.*, 2013; Saad *et al.*, 2018; Spišák *et al.*, 2010; Sroka *et al.*, 2017; Tavassoli *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los taquizoítos pueden eliminarse por leche en forma intermitente y que pueden sobrevivir al proceso de elaboración de queso fresco (Dubey *et al.*, 2014). También se determinó que existe correlación entre la seropositividad de las cabras y la presencia de ADN de *T. gondii* en sus leches (Spišák *et al.*, 2010). Sin embargo, no se puede descartar que cualquier tipo de leche podría ser fuente de infección si se consume cruda (Tenter, 2009) y se ha sugerido que la leche podría ser un factor de riesgo potencial para la transmisión horizontal de *T. gondii* en las personas (Paul, 1998). Los taquizoítos son sensibles a las enzimas proteolíticas y son usualmente destruidos por la secreción gástrica, pero se ha demostrado que pueden sobrevivir por un período corto de tiempo (2 horas) en soluciones ácidas de pepsina, y que administraciones orales de altas dosis de taquizoítos pueden causar toxoplasmosis en ratones y gatos (Dubey, 1998b). También se sugirió que los taquizoítos podrían penetrar a través de la mucosa oral y llegar así a la circulación sanguínea o linfática antes de ser destruidos en el estómago

(Riemann *et al.*, 1975; Sacks *et al.*, 1982). Los taquizoítos son destruidos por el calor y el proceso de pasteurización, por eso se recomienda pasteurizar o hervir la leche previo a su consumo. Esto es particularmente importante cuando va a ser consumida por niños, debido a que poseen una menor concentración de enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal y son más susceptibles así a contraer toxoplasmosis por esta vía. En los adultos, la infección por taquizoítos podría estar asociado a comidas de lenta digestión que elevan el pH del estómago durante varias horas (Tenter, 2009).

La mayoría de los casos de transmisión horizontal a los humanos se produce por la ingestión de quistes en carnes o vísceras de animales que actúan como HI y por ingestión de ooquistes en alimentos o agua de bebida (Tenter, 2009). Los bradizoítos contenidos en los quistes son más resistentes a las enzimas digestivas que los taquizoítos y aunque son menos resistentes a las condiciones ambientales que los ooquistes (Dubey, 1998a; 1998b), pueden sobrevivir a los cambios de temperatura y permanecer infecciosos en carcasas refrigeradas (1-4°C) o en carne picada hasta 3 semanas (Dubey *et al.*, 1990). Se ha visto que sobreviven a la congelación (entre -1 a -8°C) durante más de una semana (Kotula *et al.*, 1991) pero la mayoría de los quistes se destruyen a temperaturas de congelación menores a -12°C, aunque ocasionalmente algunos de ellos pueden seguir siendo infecciosos (Guo *et al.*, 2015; Kuticic y Wikerhauser, 1996). Por el contrario, los quistes tisulares son inactivados por el calor a una temperatura de 67°C y la supervivencia a temperaturas más bajas de cocción depende de la duración de la misma (Dubey, 2000; Guo *et al.*, 2015;

Kotula *et al.*, 1991). En condiciones de laboratorio se determinó que los quistes permanecen viables a 60°C durante aproximadamente 4 minutos y a 50°C durante aproximadamente 10 minutos (Dubey *et al.*, 1990). Algunos estudios determinaron que los quistes tisulares son eliminados por procedimientos de curado con sal o ahumado, por lo que se ha sugerido que la carne procesada es una fuente poco probable de infección para las personas (Dubey, 1997; Guo *et al.*, 2015; Lundén y Uggla, 1992). Sin embargo, el tiempo de supervivencia de los mismos varía mucho según la concentración de sal y la temperatura de almacenamiento (Dubey, 1997). En condiciones de laboratorio se observó que son eliminados en soluciones de cloruro de sodio al 6 % en todas las temperaturas examinadas (4-20°C), pero han sobrevivido en soluciones con menor concentración de sal durante varias semanas (Dubey, 1997). Neumayerová *et al.* (2014) también comprobaron que los quistes sobreviven en carne envasada al vacío. Para evitar la transmisión horizontal de *T. gondii* por quistes es importante que la carne, vísceras o derivados no sean consumidas en forma cruda o poco cocida, que la cocción alcance una temperatura mayor a 67°C durante un período prolongado, y que la misma sea pareja en todo el corte, ya que algunos quistes tisulares permanecerán infecciosos si la cocción es desigual. Algo similar ocurriría si se utilizan procedimientos de cocción como las ondas del microondas (Lundén y Uggla, 1992). A pesar que la congelación por sí misma no es un método altamente seguro, la congelación profunda de la carne (a -12°C o menos) antes de su cocción puede reducir el riesgo de infección (Guo *et al.*, 2015). También se recomienda que la carne cruda no sea probada hasta la

cocción total y se debe tener cuidado en la manipulación previa de la carne cruda (Cook *et al.*, 2000; Paul, 1998). Se debe evitar la contaminación cruzada manteniendo una correcta higiene en la cocina y los utensilios de cocina usados para la preparación de las carnes deben limpiarse con agua caliente y detergente inmediatamente después de su uso para destruir los quistes tisulares y los taquizoítos (Jacobs *et al.*, 1960). La presencia de quistes tisulares en los HI es variable según la especie animal, por lo tanto no todos los animales utilizados para el consumo humano tienen la misma importancia para la salud pública aunque estén infectados con *T. gondii* (Guo *et al.*, 2016). Muchas veces la seropositividad en los animales de consumo no refleja necesariamente el riesgo que poseen para sus consumidores (Tenter, 2009). Por ejemplo, en los bovinos, aunque la seroprevalencia para *T. gondii* en ellos sea alta raramente contienen quistes en sus tejidos (Moré *et al.*, 2008), mientras que se determinó que sí existe correlación entre la seropositividad en cabras y la presencia de quistes en su carne (Dubey *et al.*, 2011). Los quistes se han encontrado con mayor frecuencia en tejidos de porcinos, ovejas y cabras, considerándose las carnes de estos animales como una fuente importante de infección para los humanos, principalmente en los países o regiones donde se consumen regularmente (Guo *et al.*, 2016; Hill y Dubey, 2013; Kijlstra y Jongert, 2008; Tenter, 2009).

En el caso de la ingestión de ooquistes, se debe tener en cuenta que los mismos se vuelven infecciosos entre 1 a 5 días luego de la eliminación al medio ambiente y bajo determinadas condiciones ambientales, como suficiente aireación, elevada humedad y temperaturas cálidas (Dubey, 1996). Los ooquistes

son muy resistentes en el ambiente, pudiendo sobrevivir menos tiempo en condiciones frías y secas, mientras que pueden permanecer infectantes en suelo y arena húmeda hasta 18 meses (Dubey, 1996; Lélou *et al.*, 2012). En condiciones de laboratorio, los ooquistes esporulados sobrevivieron a 4°C hasta 54 meses y congelados a -10°C por 106 días (Dubey, 1998c). Sin embargo, murieron por calor a 55-60°C en 1-2 minutos (Dubey, 1998c). La membrana de los ooquistes esporulados es muy impermeable, por lo que también son muy resistentes a los desinfectantes (Dubey, 1996). Los ooquistes se diseminan en el medio ambiente a través del viento, la lluvia, aguas superficiales y por el arrastre del agua de riego (Buxton *et al.*, 2007; Dubey, 2010). Además pueden propagarse a través de lombrices de tierra e invertebrados coprófagos, y algunos insectos pueden actuar como hospedadores de transporte (Frenkel *et al.*, 1995). El mayor riesgo de infección a través de ooquistes en las personas ocurriría por ingestión de frutas y vegetales crudos incorrectamente lavados, recomendándose el lavado por arrastre con agua preferentemente caliente (> 70°C) (Tenter *et al.*, 2000). También las personas pueden infectarse con ooquistes por contacto con el suelo contaminado, por ejemplo, al realizar trabajos de jardinería o en el caso de los niños al ingerir tierra o arena contaminada (Cook *et al.*, 2000; Tenter *et al.*, 2000). Tanto el lavado de los vegetales como las tareas de jardinería deben realizarse utilizando guantes, sobre todo en personas embarazadas e inmunosuprimidas (Tenter *et al.*, 2000). En las mujeres embarazadas también se recomienda evitar el consumo de vegetales crudos si no se conoce como se realizó el proceso de lavado y su procedencia (Tenter *et al.*, 2000). El contacto

directo con los gatos domésticos no implicaría un riesgo para adquirir la infección debido a que los ooquistes no son infecciosos al momento de su eliminación. Igualmente, se recomienda que los gatos mantenidos como mascotas estén bien alimentados y castrados para evitar los hábitos de caza de roedores o aves y evitar así la exposición al parásito. Las heces de las bandejas sanitarias deben ser removidas diariamente para evitar que los ooquistes esporulen. La limpieza de las bandejas y utensilios usados debe realizarse también con agua caliente (> 70°C) y utilizando guantes. Estas tareas preferentemente no deberían ser realizadas por individuos inmunocomprometidos ni mujeres embarazadas.

Para reducir las infecciones por *T. gondii* en cabras y en otros animales destinados al consumo, es necesario implementar medidas de manejo que incluyan el control del número de gatos en las explotaciones, limitar el acceso de los felinos a los lugares de almacenamiento de comida y a las fuentes de agua como también su acceso a los comederos y bebederos (Bawm *et al.*, 2016; Cavalcante *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2016; Neto *et al.*, 2008). Además, se sugiere evitar que los felinos consuman placentas durante la época de parición de las cabras (Anderlini *et al.*, 2008). También es recomendable mantener las explotaciones libres de roedores y aves que podrían ser fuente de infección para los felinos (Tenter, 2009).

2. OBJETIVOS

Objetivos generales

-Avanzar en el conocimiento de la respuesta inmune y comportamiento biológico de las infecciones naturales por *Toxoplasma gondii* en cabras, para la generación de nuevas metodologías de diagnóstico y estrategias de control.

Objetivos específicos primarios

-Detectar anticuerpos para *Toxoplasma gondii* en sueros de cabras infectadas naturalmente mediante Inmunofluorescencia indirecta, *Immunoblot* y ELISA con la proteína nativa Tg SAG1 (P30).

-Validar en nuestro medio el uso del ELISA TgSAG1 (P30) para el diagnóstico de la toxoplasmosis caprina.

-Detectar tasas de transmisión vertical y aborto por *T. gondii* en cabras y asociarlas al *status* serológico.

-Caracterizar molecularmente los genotipos de *T. gondii* presentes en infecciones naturales de caprinos a partir de placentas y fetos abortados.

Objetivos específicos secundarios

-Aislar cepas de *T. gondii* provenientes de tejidos caprinos o fetos infectados naturalmente.

-Caracterizar molecularmente las cepas de *T. gondii* aisladas.

3. HIPÓTESIS RELEVANTES

-La seroprevalencia de infecciones por *T. gondii* en cabras es variable en diferentes regiones de Argentina y puede asociarse a las pautas de manejo de las explotaciones.

-La proteína nativa TgSAG1 (P30) utilizada en una prueba diagnóstica de ELISA estandarizada en el país, permite detectar caprinos infectados por *T. gondii* con alta sensibilidad y especificidad.

-Se detectan tasas de transmisión vertical y aborto de *T. gondii* en rodeos caprinos con seroprevalencias superiores al 40 %.

-Los genotipos de *T. gondii* que afectan las cabras de Argentina son diferentes a los obtenidos en otros países, lo que se asocia a diferencias en presentación clínica y tasas de transmisión para la toxoplasmosis caprina.

Los apartados de materiales y métodos, resultados y discusión se presentan en 3 capítulos diferentes para una mejor comprensión del desarrollo general de este trabajo. Los encabezados se relacionan con los objetivos específicos y se denominaron:

- **Seroprevalencia de anticuerpos para *T. gondii* en caprinos de Argentina**
- **Validación del ELISA TgSAG1 (P30) para el diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos**
- **Transmisión vertical, abortos y genotipificación de *T. gondii***

4. SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS PARA *T. GONDII* EN CAPRINOS DE ARGENTINA

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Muestras

Para determinar la seroprevalencia de la toxoplasmosis caprina en Argentina se realizó la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros de cabras (n= 4092) a partir de muestras obtenidas en 209 establecimientos de distintas regiones del país. Las provincias y muestras analizadas fueron las siguientes:

Buenos Aires:

La provincia de Buenos Aires cuenta con unas 7.591 cabezas caprinas (INDEC CNA, 2002) y pertenece a la eco-región de la llanura pampeana con un clima templado-húmedo. Las lluvias son abundantes y varían entre 600 a 1100 mm anuales, distribuidas durante todo el año. Las temperaturas medias de verano se encuentran entre los 20 y 25°C y las de invierno entre los 5 y 12°C con un promedio anual de 15-18°C (Burkart *et al.*, 1999). Para el estudio de la toxoplasmosis caprina se obtuvieron un total de 735 sueros de los 17 rebaños caprinos lecheros registrados en la provincia en el año 2012, pertenecientes a productores, escuelas agropecuarias y universidades, localizados en 12 partidos. Las muestras fueron recolectadas como parte de un programa de control de la brucelosis caprina del Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia y se obtuvieron dentro del marco del proyecto del INTA Balcarce titulado “Control de

los problemas de salud que afectan las majadas de leche ovina y caprina”. Los establecimientos tenían un manejo semi-intensivo/intensivo, dedicado principalmente a la producción de lácteos y de forma secundaria a la venta de cabritos. Todos los establecimientos tenían cabras de raza Saanen excepto un establecimiento que tenía cabras de raza Anglo Nubian y cruza. El tamaño promedio de los hatos fue de 110 cabras (rango 12-322). De cada establecimiento fueron muestreadas 50 cabras al azar, mientras que aquellos establecimientos que presentaban menos animales fueron muestreados en su totalidad. Las muestras correspondieron a 720 hembras y 15 machos adultos, pero se desconocen los datos de edad individual y de presencia de abortos en estos rebaños. Todas las cabras eran seronegativas para brucelosis (Manazza *et al.*, 2012a). Posteriormente, se seleccionaron al azar hasta 10 muestras seropositivas para toxoplasmosis de cada establecimiento (n= 163, porque 2 establecimientos tenían menos muestras seropositivas) para realizar el análisis de distribución de títulos.

Córdoba:

La provincia de Córdoba cuenta con 151.265 caprinos (INDEC CNA, 2002). El estudio se realizó en los departamentos de Cruz del Eje, Minas y Pocho, ubicados en la región noroeste de la provincia que contiene el 75 % de la población caprina de la misma (Sánchez, 2013). Los departamentos analizados pertenecen a la eco-región del Chaco Árido y presenta una temperatura media anual de 18°C y una amplitud térmica de 14°C. El déficit hídrico es muy elevado durante todo el año con precipitaciones inferiores a los 500 mm anuales

(Sánchez, 2013). Estos tres departamentos se encuentran atravesados por las Sierras de Comechingones y las Sierras Grandes que los dividen en dos zonas: la zona del Valle de Traslasierra con escasas precipitaciones de tipo estacional, con vertientes estacionales y vegetación xerófila, con montes de mediana altura y de transición a los llanos de La Rioja y degradados por la tala excesiva; y la zona serrana que es más húmeda y fría, con numerosas vertientes y vegetación más variable. La producción caprina en esta región se lleva a cabo en su mayoría por pequeños productores de escasos recursos económicos con unidades de producción pequeñas (de 10 a 150 cabras) y actividad diversificada, donde las cabras realizan un pastoreo extensivo en montes xerofíticos degradados y/o pastura natural. El producto principal es la producción de carne de cabrito mamón de 8 a 10 kilos de peso vivo y de 30 a 60 días de edad (Sánchez, 2013). Existen productores que reciben intervención de programas provinciales que realizan además una suplementación estratégica en invierno para incrementar la producción láctea y aumentar sus ingresos, obteniendo “leche residual” a través del ordeño de cabras de tipo criollo, que se realiza después del destete del cabrito durante un período de 60 a 90 días. También existen algunas producciones lecheras nuevas que realizan un pastoreo semi-intensivo sobre pasturas naturales e implantadas, con suplementación de hembras gestantes y lactantes y crianza artificial de chivitos (Secretaría de Agroindustria, 2002).

Para este estudio se obtuvieron 2187 sueros de cabras adultas pertenecientes a 76 establecimientos de los 3 departamentos mencionados. Los sueros se obtuvieron dentro del marco del proyecto del INTA Balcarce titulado

“Control de los problemas de salud que afectan las majadas de leche ovina y caprina”. Del total de muestras, 2037 se obtuvieron de 73 establecimientos de pequeños productores con cabras de raza criolla criadas en sistemas extensivos. La distribución de muestras fue la siguiente: Cruz del Eje: n= 766, 26 establecimientos; Pocho: n= 675, 23 establecimientos y Minas: n= 596, 24 establecimientos. El tamaño promedio de los hatos fue de 30 cabras (rango 4-86). De los establecimientos se muestrearon al azar 30 animales, mientras que aquellos establecimientos que presentaban menos animales fueron muestreados en su totalidad. Además 150 muestras fueron tomadas de 3 productores caprinos lecheros comerciales con manejo semi-intensivo/intensivo con cabras de razas Saanen que estaban localizados en los departamentos de Cruz del Eje (n= 86, 1 establecimiento) y Pocho (n= 64, 2 establecimientos). En estos tres establecimientos se tomaron muestras de sangre de todos los animales. No se obtuvieron datos de edad individual ni sexo de las cabras, ni datos de abortos. Todas las cabras fueron seronegativas para brucelosis (Manazza *et al.*, 2012b).

San Luis:

Como parte de un relevamiento sanitario en caprinos de la provincia de San Luis realizado por el Ministerio del Campo del Gobierno de la Provincia, iniciado en el año 2013, se realizó un estudio de diagnóstico serológico de toxoplasmosis en el departamento de Belgrano de esta provincia. San Luis cuenta con unas 87.847 cabras que se encuentran distribuidas principalmente en los departamentos del norte (INDEC CNA, 2002). Esta región se caracteriza por poseer dos grandes sierras: la de San Luis y la de Comechingones. El clima es

templado con marcada amplitud térmica entre el día y la noche, con heladas frecuentes y lluvias estivales que varían desde 150 mm al oeste a 600 mm anuales al este (Rossanigo *et al.*, 1999). El departamento de Belgrano es el tercero en existencias caprinas de la provincia, con un total de 12.440 animales (INDEC CNA, 2002). La producción es realizada principalmente en explotaciones familiares pequeñas, con majadas entre 30 a 200 cabras de tipo criollo, y en sistemas extensivos orientados a producir cabritos mamonos (Rossanigo *et al.*, 1999). En general las cabras deben obtener de la pastura natural y del monte la totalidad de su alimentación anual, ya que no se les brinda ningún tipo de suplementación. Las cabras salen a pastorear a primera hora de la mañana, alejándose en busca de alimento sin respetar alambrados y propiedades y regresando solas a los corrales a última hora de la tarde. Muy pocas veces son guiadas por perros "cabreros".

Para el estudio serológico de toxoplasmosis se utilizaron muestras de 389 animales de 78 establecimientos recolectadas por el Ministerio del Campo de la Provincia (5 muestras tomadas al azar por establecimiento, menos en un establecimiento que tenía 4 cabras). Todos los establecimientos realizaban un manejo extensivo de las cabras con corrales de encierre nocturnos, a excepción de 4 establecimientos dedicados a la producción de leche y quesos con manejo semi-intensivo/intensivo. De los animales muestreados, 368 eran cabras hembras y 21 eran machos. Además, 44 establecimientos presentaron abortos y 38 presentaron antecedentes de brucelosis. No se obtuvieron datos de las razas ni edad de las cabras.

La Rioja:

Las existencias caprinas de la provincia de La Rioja son aproximadamente 226.987 cabezas (INDEC CNA, 2002), y el 84 % de las cabras se concentran en la región de Los Llanos. Esta región se extiende en forma de planicie árida en la mitad sur de la provincia y pertenecen a la eco-región del Chaco Árido, con precipitaciones de tipo monzónicas, que disminuyen de este a oeste de 400 mm a 150 mm anuales (Burkart *et al.*, 1999). La región se caracteriza por presentar un alto déficit hídrico ya que los promedios de lluvias presentan una alta variabilidad tanto intra como interanual y se infiltran rápidamente en el terreno; además no existen cuencas fluviales superficiales de curso permanente durante todo el año y se produce una importante evaporación causada por las altas temperaturas estivales y por la frecuencia de los vientos durante todo el año (Vera *et al.*, 2016). En cuanto a la producción caprina el 80 % de los hatos pertenecen a pequeños productores con 60-70 animales y solo el 11,2 % del total de los productores poseen únicamente cabras. Se caracterizan por la mano de obra familiar, escasos ingresos y autoconsumo. La cría está orientada casi exclusivamente a la producción de cabrito mamón de 30-50 días de edad. La alimentación de los animales se realiza por pastoreo extensivo del monte conformado por un arbustal xerófilo continuo, con árboles aislados y un estrato herbáceo discontinuo conformado principalmente por gramíneas. En la mayoría de los casos existe en cada hato la presencia de un perro que actúa como pastor. Los animales se encierran diariamente en corrales precarios construidos con materiales de la zona, un techo de ramada y un pequeño corral de aparte de

cabritos. Debido a la presencia de cierres perimetrales precarios y la escasa superficie para pastoreo de los animales, las cabras se alimentan durante el día en tierras que exceden los límites de sus propietarios e incluso muchas veces recorren grandes distancias en búsqueda de forraje para cubrir sus necesidades nutricionales. El hato sale por la mañana a pastorear, por lapsos de tiempo variables y regresan al atardecer, generalmente guiados por un perro “cabrero” y se encierran para que durante la noche permanezcan en estos corrales. Este manejo permite que en “época de cabritos”, estos sean protegidos de los depredadores y reciban los cuidados alimenticios necesarios para mantener su categoría de mamón ya que permanecen en los corrales el tiempo que la majada está pastoreando (Vera *et al.*, 2016).

Las muestras para el estudio de toxoplasmosis caprina se obtuvieron del Departamento de Chamental situado en la región de Los Llanos, en el marco de cooperación con INTA EEA de La Rioja. El Departamento de Chamental cuenta con aproximadamente 11.252 cabras (INDEC CNA, 2002). Se analizaron 237 sueros caprinos provenientes de 16 productores de los parajes Los Bordos y Los Molles, Saladillo y Tala Verde, Esquina del Norte, San Antonio y Las Breas. Todas las cabras eran seronegativas para brucelosis y pertenecían a pequeños productores con un tamaño de hato promedio de 15 animales (rango 4-23), dedicados a la cría extensiva de cabras criollas/cruzas y que detectaron abortos en sus animales durante el año 2014. Se sangraron la totalidad de las cabras de cada establecimiento. Del total de animales muestreados, 136 tuvieron antecedentes de problemas reproductivos (abortos y natimortos). Además, en 154 cabras de 9

productores se realizaron dos muestreos pareados con diferencia de 30 días que se procesaron por IFI a título final para determinar si existió seroconversión de títulos de anticuerpos en relación a los abortos. Todas las cabras sangradas eran hembras.

Río Negro:

La provincia de Río Negro cuenta con un total de 119.975 existencias caprinas (INDEC CNA, 2002). En esta provincia la actividad se basa en la producción de pelo (mohair) obtenido de cabras de raza Angora criadas en sistemas extensivos ubicados principalmente en la zona sur de la provincia. Sin embargo, existen zonas del norte y este de la provincia donde la producción se basa en la cría del caprino criollo y sus cruzas, siendo el chivito para consumo el principal producto obtenido (Martínez *et al.*, 2013).

Los estudios de seroprevalencia de toxoplasmosis caprina se realizaron en Cinco Saltos, partido de General Roca, como parte de un estudio realizado por INTA Bariloche, donde la producción se basa en la cría del caprino criollo y sus cruzas. Esta ciudad se encuentra en la región del Alto Valle del Río Negro de la eco-región de la Estepa Patagónica, y presenta un clima con temperaturas medias de 10 a 14°C, fuertes vientos del oeste y precipitaciones menores a 250 mm de promedio anual y heladas durante todo el año (Burkart *et al.*, 1999). La ciudad se encuentra en el margen del curso inferior del Río Neuquén, por lo que la zona presenta arroyos que sirven de agua de bebida para los animales y permite el desarrollo de la agricultura. Los productores caprinos carecen de territorio delimitados y el pastoreo se realiza sobre terrenos fiscales donde

conviven hatos de diferentes productores sujetos a distintas realidades nutricionales, reproductivas y sanitarias que limitan la eficiencia del manejo que pueda realizar cualquier productor en forma aislada (Martínez *et al.*, 2013).

Para el estudio de toxoplasmosis se muestrearon 123 caprinos pertenecientes a 16 pequeños productores dedicados a la cría extensiva, que tenían hasta 11 animales y que manifestaron presencia de abortos reiterados. El tamaño hato promedio fue de 8 cabras (rango: 1-11). Se sangraron todos los animales, los cuales eran 94 hembras y 29 machos.

Catamarca:

La provincia de Catamarca cuenta con aproximadamente 206.717 caprinos (INDEC CNA, 2002). Para este estudio se analizaron 219 animales provenientes de un tambo en la localidad de Santa Cruz de la provincia de Catamarca (EEA INTA Catamarca) con manejo semi-intensivo. Esta localidad pertenece al departamento Valle Viejo en la región centro de la provincia con clima árido de Sierras y Bolsones. La región recibe escasas precipitaciones, entre 200 y 400 mm anuales que se concentran en los meses de verano, el clima es benigno con temperaturas medias anuales de 20°C, registrándose marcas de hasta 45°C en el verano (Burkart *et al.*, 1999). Como fuentes de agua esta localidad cuenta con el Río Santa Cruz, originario del Río Paclín, donde parte de sus aguas son encausadas en un canal que las transporta hacia los campos antes de confluir en el Río del Valle (www.atlas.catamarca.gob.ar).

Salta:

La provincia de Salta presenta 197.347 cabras (INDEC CNA, 2002). Se utilizaron muestras de suero de 202 caprinos que pertenecían a 5 establecimientos. Uno de los establecimientos fue el tambo experimental del INTA de Salta, que contaba con 111 cabras de raza de base Saanen en sistema semi-intensivo, y todas las cabras fueron muestreadas. Este tambo se encuentra en la localidad de Cerrillos perteneciente a la zona del Valle de Lerma, con un clima cálido-subhúmedo, con precipitaciones anuales promedio de 900-1000 mm que se concentran durante el verano, mientras que existe una marcada estación seca durante los meses fríos. Las temperaturas promedio de verano son de 23°C y las de invierno de 15°C (Burkart *et al.*, 1999). No se obtuvieron más datos del resto de los animales y establecimientos.

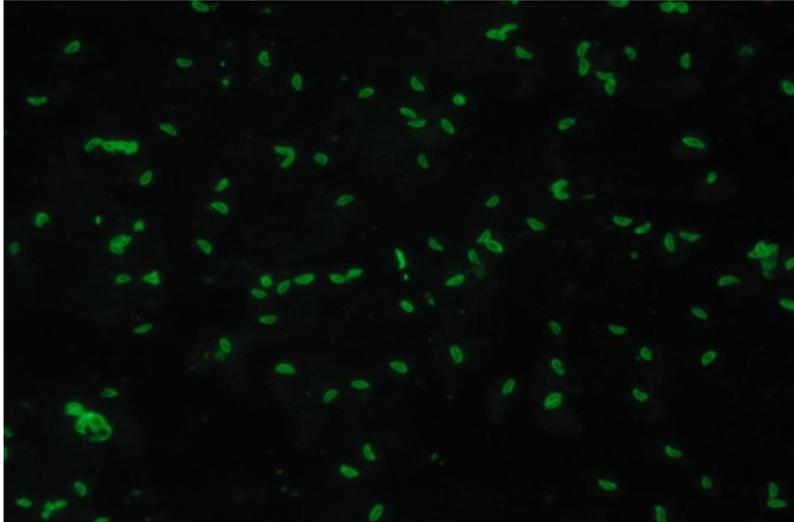
4.1.2. Estudios serológicos

Los sueros caprinos fueron guardados a -20°C hasta el momento del procesamiento. La detección de anticuerpos anti-*T. gondii* fue realizada mediante la prueba de IFI (Unzaga *et al.*, 2014). Se utilizaron taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* fijados a portaobjetos de 15 áreas (MP Biomedicals, Santa Ana, EE.UU) como antígeno, obtenidos de cultivo en células VERO (Anexos 1 y 2). Las muestras de suero se diluyeron en PBS 1x en base dos a partir de 1:25. Para cada rutina se incluyeron controles positivos de sueros de cabras infectadas naturalmente y controles negativos de sueros precalostrales de cabritos nacidos de madres seronegativas para *T. gondii*. Se colocaron 10 µl de las diluciones

1:100 y 1:800 de cada suero de cabra por área del portaobjeto y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 10, 5 y 3 minutos cada uno en agitación. Posteriormente se colocaron 10 µl de conjugado anti-Ig G de cabra marcado con isotiocianato de fluoresceína (*Whole molecule*, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) diluido 1:100 en cada área del portaobjeto. Se incubó con el conjugado durante 30 min a 37°C en cámara húmeda y luego se realizaron nuevamente los tres lavados en agitación. Finalmente se colocó la solución de montaje y los portaobjetos se observaron con el microscopio de epifluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania) (Anexo 3). Se consideró positiva aquella reacción en la que toda la superficie del taquizoíto resultó fluorescente a la observación microscópica (Figura 4). Se consideraron seropositivos todos los animales con título \geq a 100. En las muestras de las provincias de Córdoba y Buenos Aires se realizó un único título (100) mientras que en el resto de las provincias se determinaron dos títulos (100 y 800) en todos los sueros (Dubey, 2010; Moré *et al.*, 2008). En las 163 muestras seleccionadas de Buenos Aires que fueron seropositivas al título 100, se realizaron diluciones mayores (desde 1:800 hasta 1:6400).

Para determinar la posible coinfección con *Neospora caninum* se realizó la prueba de IFI en la totalidad de las muestras, utilizando como antígeno taquizoítos de *N. caninum* del aislamiento NC-1 fijados a portaobjetos de 15 áreas (MP Biomedicals, Santa Ana, EE.UU) (Anexo 3). Se utilizó el título 100 para todas las muestras y además se analizó el título 800 para las muestras de Catamarca, Salta, La Rioja, Rio Negro y San Luis.

Figura 4. Resultado positivo a IFI con antígeno de *T. gondii* al microscopio de epifluorescencia (objetivo 40x).



4.1.3. Análisis estadísticos

La seroprevalencia total de la toxoplasmosis caprina, la seroprevalencia para cada una de las provincias, la de los departamentos de Córdoba y los parajes de La Rioja y la seropositividad de cada establecimiento fueron calculadas con un intervalo de confianza (IC) del 95% (Epidat 4.1, Organización Panamericana de la Salud y Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade). Los establecimientos que presentaron al menos una muestra seropositiva por IFI fueron considerados positivos. Las diferencias entre las seroprevalencias de las distintas provincias, entre los 3 departamentos de la provincia de Córdoba, entre los parajes de La Rioja y las diferencias de proporción de título 800 entre provincias fueron determinadas por chi cuadrado para diferencias entre proporciones con el programa WinEpi 2.0 (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza). Las diferencias entre los distintos sistemas de manejo de las cabras

y la relación con la presencia de abortos fueron analizadas por la prueba de chi cuadrado con el programa WinEpi 2.0 (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza). Un valor de $p < 0,05$ se consideró indicativo de diferencias estadísticas significativas.

Para evaluar la relación entre presencia de anticuerpos para *T. gondii* y el sistema de manejo se tomaron en cuenta la totalidad de las cabras de Buenos Aires ($n= 735$) y de Catamarca ($n= 219$), las cabras de los 3 tambos de Córdoba ($n= 150$), las cabras del tambo de Salta ($n= 111$) y las cabras de los 4 establecimientos de producción láctea de San Luis ($n= 20$) como cabras de sistema semi-intensivo/intensivo (total $n= 1235$). En el sistema extensivo se incluyeron las cabras de los pequeños productores de Córdoba ($n= 2037$), la totalidad de las cabras de La Rioja ($n= 237$), la totalidad de las cabras de Río Negro ($n= 123$) y los 74 establecimientos de San Luis ($n= 369$) (total manejo extensivo $n= 2766$). También se analizaron las diferencias de seroprevalencia en relación al manejo en las provincias que se muestrearon explotaciones tanto intensivas como extensivas (Córdoba y San Luis) mediante chi cuadrado y test de Fisher (Epidat 4.1, Organización Panamericana de la Salud y Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade).

Las diferencias en la distribución de los títulos de anticuerpos de IFI para *T. gondii* fueron calculadas sobre las cabras seropositivas de las provincias de Catamarca, Río Negro, La Rioja, Salta y San Luis ($n= 404$) y sobre 163 cabras de Buenos Aires. A su vez se analizó la distribución de títulos y su asociación con el

sistema de manejo sobre muestras de 526 cabras seropositivas con tipo de manejo conocido.

Para determinar la relación entre presencia de anticuerpos para *T. gondii* y la presencia de abortos se tomaron los datos individuales de las cabras de la provincia de La Rioja y de las muestras de los establecimientos con abortos de la provincia de San Luis. Además, las muestras pareadas de 154 cabras de la provincia de La Rioja se analizaron por IFI a título final para determinar si existió seroconversión de títulos en relación a los abortos. También se determinó el porcentaje de coinfección con *N. caninum*, el cual fue calculado sobre el total de las muestras (n= 4092).

Se analizaron distintos factores de riesgo en base a las muestras de las que se obtuvieron datos relevantes. Se determinó la relación con el sexo de los animales en las cabras de La Rioja, San Luis y Río Negro (n= 747). Para comparar razas se evaluaron los resultados de 960 cabras Saanen (pertenecientes a 16 tambos de Buenos Aires, los 3 tambos comerciales de Córdoba y al tambo de Salta) y 2397 cabras criollas/ cruza (de 73 establecimientos de Córdoba, la totalidad de las cabras de La Rioja y de Río Negro). La cuantificación de la asociación entre los factores de riesgo (sexo y raza), el sistema de manejo y la presencia de abortos con la seropositividad a *T. gondii* se estimó calculando el odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95% con el programa WinEpi 2.0 (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza).

4.2. Resultados

La seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* hallada en el país según el total de muestras analizadas fue del 39 % (1596/4092; IC95%= 37,5-40,5). Todas las provincias del país que fueron analizadas presentaron animales seropositivos a *T. gondii*. Las seroprevalencias más altas se encontraron en las provincias de Catamarca, Buenos Aires y Río Negro, las más bajas se encontraron en Salta, La Rioja y San Luis, mientras que Córdoba presentó una seroprevalencia intermedia ($p < 0,0001$). La seroprevalencia por provincia y la cantidad de cabras analizadas en cada una se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Seroprevalencia por provincia por la prueba de IFI (título 100).

Provincia	Seroprevalencia (IC95%)	Cabras SP	Total
Catamarca	71 % (64,5-77) ^a	155	219
Buenos Aires	63 % (59,4-66,6) ^{ab}	463	735
Río Negro	51,2 % (41,9-60,5) ^b	63	123
Córdoba	33,3 % (31,3-35,3) ^c	729	2187
Salta	27,7 % (21,3-34,1) ^{cd}	56	202
La Rioja	22,4 % (16,8-27,9) ^d	53	237
San Luis	19,8 % (15,7-23,9) ^d	77	389
TOTAL	39 % (37,5-40,5)	1596	4092

IC: intervalo de confianza; cabras SP: cabras seropositivas. Letras diferentes Indica diferencias significativas.

El total de establecimientos con animales seropositivos a *T. gondii* fue del 76,1 % (159/209; IC95%= 70,1-82,1). La cantidad de rebaños analizados por provincia se detalla en la tabla 3 y la distribución de establecimientos según la proporción de cabras seropositivas en la tabla 4.

Tabla 3. Seroprevalencia por establecimientos en las distintas provincias.

Provincia	Seroprevalencia de hatos (IC95%)	Hatos SP	Total	Rango intra-hato %
Buenos Aires	100 % (80,5-100)	17	17	19,2-100
Río Negro	100 % (79,4-100)	16	16	20-100
Catamarca	100% (1 tambo)	1	1	ND
Salta	100 % (47,8-100)	5	5	5-77,5
Córdoba	93,4 % (85,3-97,8)	71	76	3,4-100
La Rioja	68,7 % (41,3-88,9)	11	16	13-50
San Luis	48,7 % (36,9-60,6)	38	78	ND
TOTAL	76,1 % (70,1-82,1)	159	209	3,4-100

IC: intervalo de confianza; hatos SP: hatos seropositivos; ND: no determinado.

Tabla 4. Distribución de establecimientos según la proporción de cabras seropositivas expresados en porcentajes.

Provincia	0	<10	10-50	51-70	71- 99	100%	TOTAL
Catamarca	---	---	---	---	1	---	1
Buenos Aires	---	---	4	6	6	1	17
Río Negro	---	---	7	3	2	4	16
Córdoba	5	9	28	20	11	3	76
La Rioja	5	---	11	---	---	---	16
San Luis	40	---	28	6	3	1	78
Salta	---	1	2	1	1	---	5
Total	50	10	80	36	23	10	209

En las provincias de Buenos Aires, Río Negro y Salta todos los establecimientos presentaron cabras seropositivas. El 76,5 % de los establecimientos de Buenos Aires presentaron más del 50 % de sus cabras con anticuerpos para *T. gondii*, con un rango de seropositividad intra-establecimiento de 19,2 a 100 %. Río Negro presentó un rango de seropositividad similar, del 20 al 100 %, con el 56,2 % de los rebaños con seroprevalencias mayores al 50 %. En Salta el rango intra-establecimiento fue del 5 al 77,5 %, con dos establecimientos con prevalencias del 70 y 77,5 % y el tambo del INTA presentó una seroprevalencia del 13,1 %.

En la provincia de Córdoba el 93,4 % de los establecimientos fueron seropositivos, con un rango de seropositividad intra-establecimiento de 3,4 a 100 %; siendo la seroprevalencia del departamento de Pocho significativamente menor que los otros departamentos ($p < 0,0001$) (Tabla 5). En cuanto a la distribución de animales seroreactores, el 44,7 % de los hatos presentó más del 50 % de los animales seropositivos. Los tambos comerciales localizados en el departamento de Pocho presentaron una seroprevalencia del 87,5 % (28/32) y del 62,5 % (20/32), mientras que el tambo que se encuentra en Cruz del Eje tuvo un 16,3 % (14/86) de sus cabras seropositivas.

Tabla 5. Distribución de cabras y hatos seropositivos a *T. gondii* en los departamentos de la provincia de Córdoba.

Departamento	Cabras		Establecimientos	
	n	Positivos (%) (IC95%)	n	Positivos (%)
Cruz del Eje	766	296 (38,6) (35,1-42,2) ^a	26	24 (92,3)
Pocho	675	151 (22,4) (19,2-25,6) ^b	23	21 (91,3)
Minas	596	220 (36,9) (32,9-40,9) ^a	24	23 (95,8)
TC	150	62 (41,3) (33,1-49,6) ^a	3	3 (100)
Total	2187	729 (33,3) (31,3-35,3)	76	71 (93,4)

IC: intervalo de confianza; TC: tambos caprinos. Letras diferentes indican diferencias significativas.

En la provincia de La Rioja el 68,7 % de los hatos tuvieron animales seropositivos, con un rango de seroprevalencia intra-establecimiento de 13 a 50 %; presentándose 5 establecimientos sin animales seropositivos. No se observaron diferencias de seropositividad entre los 5 parajes del departamento de Chamental estudiados ($p = 0,1501$) (Tabla 6).

Tabla 6: Animales seropositivos por paraje del departamento Chamental en la provincia de La Rioja.

Parajes	Cabras		Establecimientos	
	n	Positivos (%) (IC95%)	n	Positivos (%)
Saladillo y Tala Verde	24	9 (37,5) (16,1-58,9)	2	1 (50)
San Antonio	24	8 (33,3) (12,4-54,3)	2	1 (50)
Esquina del Norte	78	17 (21,9) (11,9-31,6)	5	3 (60)
Las Breas	47	9 (19,1) (6,8-31,5)	3	3 (100)
Los Bordos	64	10 (15,6) (5,9-25,3)	4	3 (75)
Total	237	53 (22,4) (16,8-27,9)	16	11 (68,7)

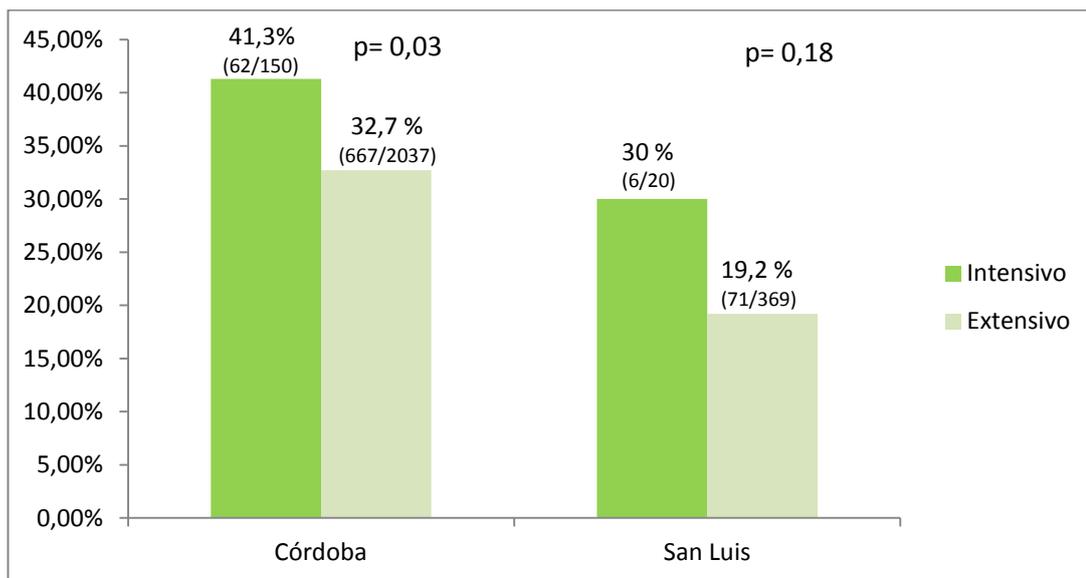
IC: intervalo de confianza.

En la provincia de San Luis se analizaron 5 animales por establecimiento. El 48,7 % de los rebaños presentaron animales seropositivos y en un único establecimiento la totalidad de las cabras analizadas fueron seropositivas. Cuarenta hatos no presentaron ninguna muestra seropositiva. De los cuatro establecimientos de producción láctea 3 presentaron cabras seropositivas (con 1, 2 y 3 cabras seropositivas respectivamente) y uno fue seronegativo.

En relación a las condiciones de manejo, la seroprevalencia de *T. gondii* en los establecimientos con manejo semi-intensivo/intensivo fue del 56,8 % (701/1235; IC95%=53,9-59,6), mientras que en los establecimientos de manejo extensivo fue del 30,9 % (854/2766; IC95%= 29,1-32,6). La seroprevalencia fue significativamente mayor en los establecimientos de manejo semi-intensivo/intensivo con producción láctea ($p < 0,0001$), con un OR= 2,94 (IC95% 2,56-3,38). Analizando en forma individual las provincias que tenían hatos bajo los dos sistemas de manejo, se observó que en la provincia de Córdoba y de San Luis las seroprevalencias de los sistemas semi-intensivo/ intensivo fueron

mayores que las de sistemas extensivos, encontrándose sólo diferencias significativas para la provincia de Córdoba (Figura 5).

Figura 5. Distribución de cabras seropositivas a la IFI para *T. gondii* según el sistema de manejo en cada provincia.

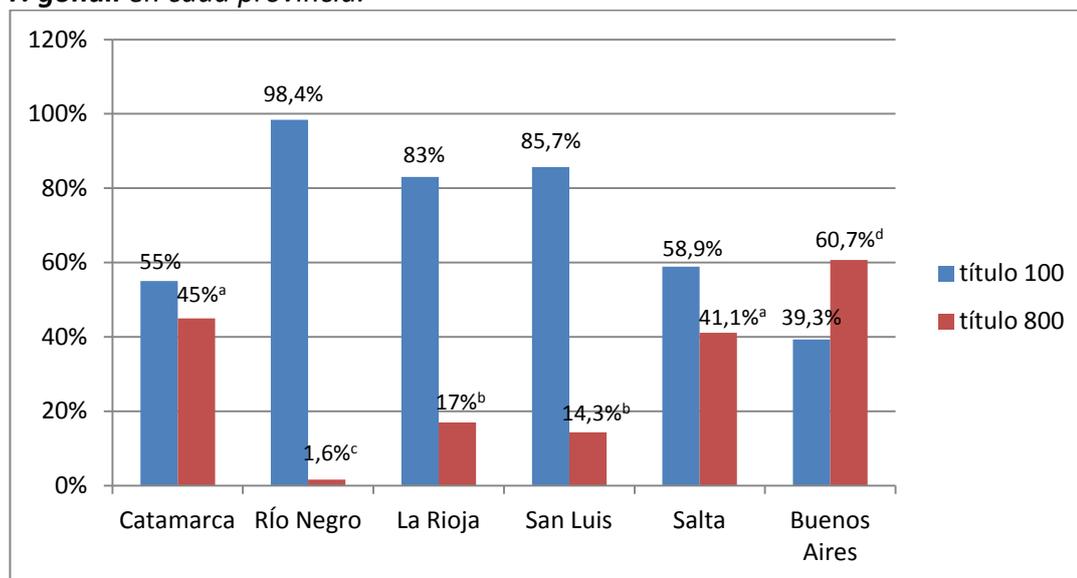


En las provincias donde se analizaron los títulos 100 y 800 a *T. gondii*, se observó que el 71,8 % (290/404; IC95%= 67,3-76,3) de las cabras presentaron título 100, mientras que el 28,2 % (114/404; IC95%= 23,7-32,7) presentaron títulos ≥ 800 . Al incluir las cabras de Buenos Aires, la proporción de cabras con títulos 800 aumenta al 37,6 % (213/567; IC95%= 33,5-41,6) y las de títulos 100 disminuyen a 62,4 % (354/567; IC95%= 58,4-66,5).

Las cabras con títulos 800 presentaron diferencias significativas entre provincias, siendo Buenos Aires la provincia que tuvo la mayor proporción (Figura 6). La distribución de títulos finales en las 163 cabras de 17 establecimientos de Buenos Aires se representa en la Tabla 7. El 54 % de los

animales seropositivos presentó títulos ≥ 1600 y 6 de los establecimientos presentaron más del 70% de sus cabras títulos ≥ 1600 (Tabla 7).

Figura 6. Distribución de títulos de cabras seropositivas a dos títulos de IFI para *T. gondii* en cada provincia.



Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tabla 7. Distribución de títulos de anticuerpos anti-*T. gondii* en cabras seropositivas de la provincia de Buenos Aires.

Hato	Títulos de IFI				
	< 800	800	1600	3200	6400
1	0	2	4	0	4
2	0	1	1	1	7
3	5	1	4	0	0
4	3	0	3	1	3
5	9	0	1	0	0
6	4	1	1	3	1
7	5	2	2	0	1
8*	8	0	0	0	0
9	3	0	1	3	3
10	1	0	1	6	2
11	0	0	3	4	3
12	4	0	3	1	2
13	5	1	3	1	0
14	3	2	3	2	0
15	3	1	3	3	0
16	9	0	1	0	0
17*	2	0	1	2	0
TOTAL	64(39,3%)	11(6,7 %)	35(21,5 %)	27(16,6 %)	26(15,9 %)

Establecimientos con menos de 10 cabras seropositivas. Marcados con color son los establecimientos con más del 70 % de sus cabras títulos ≥ 1600 .

Al determinar la asociación entre el sistema de manejo y los títulos de anticuerpos se observó que existieron diferencias significativas ($p < 0,001$), ya que en los animales con manejo intensivo/semi-intensivo, la proporción de títulos ≥ 800 fue del 50,7% (172/339) mientras que en los sistemas extensivos fue del 11,2 % (21/187). Las cabras mantenidas con un manejo intensivo presentaron 8 veces más probabilidades de tener títulos altos (OR= 8,14; IC95% 4,93-13,44). Los títulos hallados según el sistema de manejo en cada provincia se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Distribución de títulos 100 y 800 de IFI para *T. gondii* según el sistema de manejo de las cabras por provincia.

Provincia	n+	Intensivo (n = 339)		Extensivo (n = 187)	
		IFI100	IFI 800	IFI100	IFI 800
Catamarca	155	85	70	---	---
Buenos Aires	163	64	99	---	---
Río Negro	63	---	---	62	1
La Rioja	53	---	---	44	9
San Luis	77	6	---	60	11
Salta	15	12	3	---	---
Total	526	167	172	166	21

n+: cabras seropositivas

La relación de la infección por *T. gondii* y la presencia de abortos fue evaluada en las provincias de La Rioja y San Luis. En La Rioja se obtuvo el dato individual de las cabras, informándose que el 57,4 % (136/237) de las cabras de los 16 productores de la región estudiada manifestaron antecedentes de abortos/natimortos. Se detectaron anticuerpos para *T. gondii* en el 27,2 % de las cabras abortadas (37/136) y en el 15,8 % (16/101) de las cabras no abortadas, encontrándose una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos y los abortos ($p=0,0379$) (Tabla 9). Las cabras que estuvieron expuestas a *T. gondii* en esta región, tuvieron aproximadamente 2 veces más posibilidades de abortar que las no expuestas (OR= 1,98; IC95% 1,04-3,79). Además, la proporción de animales con título 800 fue mayor en el grupo de animales abortados, con un OR= 1,63 (IC95% 0,29-8,89). De las 154 cabras en las que se realizaron muestreos pareados (34 seropositivas y 120 seronegativas para *T. gondii*), no se observó seroconversión de títulos de anticuerpos específicos en el segundo muestreo, a pesar de que 26 de ellas presentaron abortos entre los muestreos. En relación a otros agentes infecciosos, en esta región todas las cabras analizadas eran

seronegativas para brucelosis y 3 presentaron anticuerpos para *N. caninum* con título ≥ 800 , siendo 2 de estas últimas seronegativas para *T. gondii*.

Tabla 9. Distribución de los abortos en cabras en relación con los títulos de anticuerpos anti- *T. gondii* en la provincia de La Rioja.

Título IFI	Cabras con abortos		Cabras sin abortos		total
	100	800	100	800	
Seropositivas	30	7	14	2	53
Seronegativas		99		85	184
Total		136		101	237

En la provincia de San Luis, si bien no se contaba con la información del estado reproductivo individual de cada cabra, no se halló relación significativa entre los hatos que presentaron abortos y la seropositividad a *T. gondii* (Tabla 10). Coincidentemente, los 38 establecimientos seropositivos a *T. gondii* presentaban antecedentes de animales seropositivos para brucelosis. De los 22 rebaños con antecedentes de abortos y seronegativos a *T. gondii* sólo 1 presentó animales seropositivos a IFI para *N. caninum*, mientras que el resto no presentaron anticuerpos contra ninguno de los 3 patógenos evaluados.

Tabla 10. Distribución de establecimientos con o sin abortos en relación a la presencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en la provincia de San Luis.

Establecimientos	Seropositivos	Seronegativos	Total
Con abortos	22	22	44
Sin abortos	16	18	34
Total	38	40	78

En cuanto a la situación de la neosporosis caprina, se encontró que el 4,7 % (191/4092; IC95%=4,01-5,33) del total de cabras analizadas en el país presentaron anticuerpos anti-*N. caninum*. El 60,7 % (116/191; IC95%= 53,5-67,9) de las cabras seropositivas a neosporosis presentaron también anticuerpos anti-*T. gondii*, siendo el porcentaje de coinfección para toxoplasmosis y neosporosis en las cabras del país del 2,8 % (116/4092; IC95%= 2,31-3,36). En Buenos Aires se encontró la mayor seroprevalencia para este protozoo (9,7 %), y el 82,4 % (14/17) de los hatos presentaron cabras seropositivas para *N. caninum*, con un rango intra-establecimiento de 3,2 a 22,2 %. En Catamarca se halló una seroprevalencia del 5 % en el único establecimiento lechero evaluado, donde las 11 cabras presentaron únicamente títulos 100 para esta enfermedad. Le sigue la provincia de Córdoba (4,2 %) donde el 30,3 % (23/76) de los hatos fueron seropositivos y las seroprevalencias de Pocho (0,9 %) y Minas (0,8 %) fueron significativamente menores que la de Cruz del Eje (9,5 %) ($p < 0,0001$). En Cruz del Eje se detectaron 15 rebaños seropositivos, con un rango intra-establecimiento de 7,1 a 41,9 %, en Minas fueron 4 con un rango de 1,8 a 3,7 % y en Pocho 1 con 25 % de seroprevalencia. Todos los tambos comerciales de esta provincia fueron seropositivos, pero con seroprevalencias bajas (2 con 3,12 % y uno con 5,81 %). La seroprevalencia para neosporosis en todas las provincias y los porcentajes de coinfección con toxoplasmosis se detallan en la tabla 11.

Tabla 11. Seroprevalencia para *N. caninum* y coinfección con *T. gondii* por provincia.

Provincia	Seroprevalencia para <i>N. caninum</i> (n/n; IC95%)	Cabras SP a <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i>	Coinfección <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i>
Buenos Aires	9,7 % (71/735; 7,5-11,8) ^a	64,8% (46/71)	6,3 % (46/735)
Catamarca	5 % (11/219; 1,9-8,1) ^{ab}	81,8% (9/11)	4,1 % (9/219)
Córdoba	4,2 % (91/2187; 3,3-5) ^b	58,2% (53/91)	2,4 % (53/2187)
Salta	3,5 % (7/202; 0,6-6,2) ^b	28,6% (2/7)	1 % (2/202)
San Luis	2,1 % (8/389; 0,5-3,6) ^b	62,5% (5/8)	1,3 % (5/389)
La Rioja	1,3 % (3/237; 0,3-3,7) ^b	33,3% (1/3)	0,4 % (1/237)
Río Negro	0 % ^c	0 %	0 % (0/123)
TOTAL	4,7 % (191/4092; 4,01- 5,33)	60,7% (116/191)	2,8 % (116/4092)

Cabras SP: cabras seropositivas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

En la tabla 12 se muestran las frecuencias de anticuerpos para *T. gondii* en las cabras de acuerdo a las razas y el sexo. En relación a las razas, los animales Saanen tienen más probabilidades de infección que los criollos o cruzas (OR= 2,28; IC95% 1,96-2,65). Evaluado proporcionalmente, el porcentaje de machos seropositivos fue similar al observado para las hembras.

Tabla 12. Frecuencia de caprinos positivos a la IFI para *T. gondii* de acuerdo al sexo y la raza.

Variables individuales	muestras	Cabra SP (%)	χ^2	P
Sexo N= 749				
Macho	50	14 (28)	0,240	0,6245
Hembra	699	174 (24,9)		
Raza N= 3246			114,07	<0,0001
Saanen	960	504 (52,5)		
Criollas/ cruzas	2397	783 (32,7)		

N: número de cabras evaluadas para cada variable. Cabras SP: cabras seropositivas.

4.3. Discusión

Según los datos obtenidos en este trabajo, la toxoplasmosis caprina se encuentra ampliamente distribuida en el país, dado que se detectaron anticuerpos para *T. gondii* en cabras de todas las provincias analizadas y que el 76,1 % de los rebaños resultaron seropositivos.

Este es el estudio serológico para toxoplasmosis caprina con mayor número de muestras llevado adelante en el país, lo que permite establecer índices estadísticamente confiables (Dubey, 2010; Thursfield, 2007).

Para la detección de anticuerpos se utilizó la prueba de IFI que posee buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de esta enfermedad en caprinos (Dubey, 2010; Fortes *et al.*, 2012; Munday y Mason, 1979). El título de corte utilizado (100) permitió evitar la sobrestimación de la seroprevalencia que podría ocurrir por reacciones cruzadas con otros agentes si se utilizaran títulos de corte menores, lo que hubiera aumentado la sensibilidad, pero en detrimento de la especificidad (Dubey, 2010; Opel *et al.*, 1991; Unzaga *et al.*, 1999).

La seroprevalencia total del 39 % para *T. gondii* hallada en cabras del país es similar a la que reportó anteriormente Unzaga *et al.* (1999) en Argentina pero analizando un menor número de animales (85/218= 38,9 %). En el mundo, el valor de seroprevalencia hallado se encuentra cercano a los de la mayoría de los países de Asia: 43,9 % en Rusia (Shuralev *et al.*, 2018), 42,8 % en Pakistán (Ahmed *et al.*, 2016), 42,5 % en China (Zhou *et al.*, 2018), 35,5 % en Malasia (Chandrawathani *et al.*, 2008), 30 % en Irán (Sharif *et al.*, 2007) y 27,9 % en Tailandia (Jittapalong *et al.*, 2005), aunque valores menores se encontraron en

Birmania (11,4 %; Bawm *et al.*, 2016) y Corea (6,8 %; Jung *et al.*, 2014) y mayores en Bangladesh (61 %; Rahman *et al.*, 2014).

En África los valores de seroprevalencia reportados por diferentes autores fueron de 19,3 % en Tanzania (Swai y Kaaya *et al.*, 2013) y 4,6 % en Nigeria (Kamani *et al.*, 2010), y en Uganda, Etiopía y Ghana se encontraron seroprevalencias más cercanas a las halladas en este estudio: 31 % (Bisson *et al.*, 2000), 27,6 % (Tilahun *et al.*, 2018) y 26,8 % (van der Puije *et al.*, 2000), respectivamente, mientras que en Egipto se reportaron valores más altos (59,4 %; Barakat *et al.*, 2009).

En Europa se reportan también seroprevalencias variables, ya sea inferiores: 25,1 % en el sur de España (García-Bocanegra *et al.*, 2013), 18,5 % en Portugal (Lopes *et al.*, 2013), 17 % en Noruega (Stormoen *et al.*, 2012), 13,3 % en Holanda (Deng *et al.*, 2016), 12,5 % en la región de Sardinia en Italia (Masala *et al.*, 2013); o bien mayores: 73,3 % en Serbia (Djokic *et al.*, 2014), 60,6 % en la región de Toscana en Italia (Mancianti *et al.*, 2013), 66 % en República Checa (Bartova y Sedlak, 2012), 59,8 % en Bulgaria (Prelezov *et al.*, 2008); 52,8 % en Rumania (Iovu *et al.*, 2012) y 48 % en noroeste de España (Díaz *et al.*, 2016). Estas variaciones podrían relacionarse con la prueba de diagnóstico utilizada en los mismos, ya que en algunos se utilizó la aglutinación (MAT) con bajos títulos de corte (Díaz *et al.*, 2016; Djokic *et al.*, 2014, Mancianti *et al.*, 2013). El valor de seroprevalencia más cercano al de nuestro trabajo en estudios europeos fueron los encontrados en Italia 41,7 % (Gazzonis *et al.*, 2015) y Grecia 30,7 % (Tzanidakis *et al.*, 2012).

En América, los valores más cercanos son los de México: 31 % (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011), mientras que en los países del Caribe los porcentajes de seroprevalencia fueron mayores: 52,9 % (Hamilton *et al.*, 2014). En Estados Unidos se encontró una seroprevalencia de 6,8 % en cabras de raza Boer en el estado de Missouri (Yaglom *et al.*, 2014), mientras que valores de anticuerpos para *T. gondii* de 53,4 % fueron encontrados en fluidos colectados de 234 corazones de cabras provenientes de Maryland, Virginia y Pensilvania destinados al consumo humano (Dubey *et al.*, 2011; Hill and Dubey, 2013). En Brasil, aunque se han realizado muchos relevamientos serológicos de la toxoplasmosis caprina en los distintos estados, el estudio más representativo en cuanto al número de cabras analizadas (n= 2362) se realizó en el estado de Ceará que determinó una seroprevalencia de 25,1 % (Cavalcante *et al.*, 2008).

Resulta difícil poder comparar la seroprevalencia hallada en Argentina con las de otros países, ya que en muchos de los trabajos se analizan solamente algunas regiones de cada país o incluso solo unos pocos establecimientos, mientras que en este estudio se contemplaron distintas regiones y un total de 209 hatos. Las diferencias también podrían ser atribuidas al tamaño de la muestra, las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico, el título de corte, las condiciones climáticas, las características geográficas y el manejo.

La mayoría de los establecimientos estudiados presentaron animales seropositivos (76,1 %), reforzando la amplia distribución del protozoo en distintas regiones. Esto concuerda con los datos mundiales que demuestran que la mayoría de los rebaños se encuentran infectados (más del 70 %), a pesar de las

variadas seroprevalencias entre los países (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011; Barakat *et al.*, 2009; Bisson *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2016; Djokic *et al.*, 2014; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Gazzonis *et al.*, 2015; Mancianti *et al.*, 2013; Stormoen *et al.*, 2012; Tilahun *et al.*, 2018). La seropositividad intra-hato en nuestro país fue de 3,4 al 100%, sin embargo estos resultados podrían estar condicionados al número de muestras obtenidos, dado que en algunos hatos se muestrearon de 2 a 5 animales dificultando la obtención de seropositivos si la prevalencia es cercana al 20 % (Thursfield, 2007).

Las diferencias de seroprevalencia encontradas entre las provincias estudiadas podrían deberse al sistema de producción de los animales, condiciones climáticas y /o características geográficas. En relación a ésto, se determinó que la seroprevalencia para *T. gondii* en cabras de nuestro país fue significativamente mayor en los establecimientos con manejo semi-intensivo/intensivo (56,8 %) con respecto a los establecimientos con manejo extensivo (30,9 %). El tipo de manejo se encuentra relacionado con el tipo de producción caprina, ya que la mayoría de los productores caprinos dedicados principalmente a la producción lechera realizan un manejo semi-intensivo/intensivo (Secretaría de Agroindustria, 2011). Las provincias de Buenos Aires y Catamarca presentaron las seroprevalencias más altas, y en ambas provincias la totalidad de los animales que se analizaron provenían de tambos caprinos con este tipo de explotación. En Catamarca los datos se obtuvieron de un solo establecimiento y por lo tanto podrían no ser representativos de otros de la región. En las provincias de Córdoba, La Rioja, Salta y San Luis las prevalencias

fueron menores, lo que podría estar relacionado con el manejo predominantemente extensivo de los animales muestreados. En el caso de la provincia de Río Negro, los establecimientos analizados pertenecían a pequeños productores con manejo extensivo de una zona restringida. La alta seroprevalencia hallada (51,2 %) podría relacionarse con el menor número de animales muestreados (123), que a su vez pastoreaban sobre terrenos fiscales en donde convivían rebaños de distintos productores sin terrenos delimitados, comportándose como un gran rebaño, en el que los animales podrían haber estado expuestos a una misma fuente de infección, como el agua de bebida (Gazzonis *et al.*, 2015). En la provincia de San Luis, Unzaga *et al.* (1999) describieron una mayor seroprevalencia, que podría relacionarse con el tipo de explotación intensiva de los animales analizados en este estudio.

Las diferencias de seroprevalencia entre los distintos sistemas de manejo observadas en este estudio coinciden con muchos trabajos realizados en Brasil (Carneiro *et al.*, 2009; Luciano *et al.*, 2011; Machado y Lima, 1987; Meireles *et al.*, 2003; Neto *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2003). Por otro lado, algunos trabajos justifican las seroprevalencias bajas encontradas en algunas zonas de Brasil a que predominan los sistemas de producción de tipo extensivo (Cavalcante *et al.*, 2008). Esto concuerda con los resultados que se han obtenidos en las provincias del centro y noroeste de este país (Córdoba, San Luis, La Rioja y Salta). Además, en las provincias donde se obtuvieron muestras de hatos con ambos tipos de manejo, se determinó una mayor seroprevalencia en los establecimientos de tipo intensivo (Córdoba y San Luis). La seroprevalencia

en Córdoba fue significativamente mayor a la del resto de las provincias con manejo extensivo mencionadas anteriormente. Esto podría vincularse a la incorporación de prácticas de suplementación para la obtención de “leche residual” en cabras criollas (Manazza *et al.*, 2012b).

Otros trabajos en diferentes países determinaron una mayor seroprevalencia en hatos lecheros con manejo intensivo, sugiriendo que en este tipo de explotación, la mayor concentración de las cabras expuestas al mismo alimento o agua potencialmente contaminados favorecería la infección con *T. gondii* (Iovu *et al.*, 2012; Jittaapalapong *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2013; Opel *et al.*, 1991; Tzanidakis *et al.*, 2012). Varios autores determinaron que las cabras lecheras tenían más posibilidad de infectarse con *T. gondii* que las de explotaciones de carne (Jittapalapong *et al.* (2005) y determinaron que las cabras criadas en sistemas intensivos y semi-intensivos presentaban mayor riesgo de infección que las criadas en condiciones extensivas, hallando también asociación con el suministro de agua de red (Tzanidakis *et al.*, 2012; Zewdu *et al.*, 2013). Por otra parte, algunos de estos trabajos sugieren que el acceso de los gatos a los bebederos, especialmente si son de materiales de difícil limpieza (madera), sería un factor que aumenta el riesgo de infección (Zewdu *et al.*, 2013). Otro factor de riesgo podría ser la ubicación de los tambos caprinos cercanos a las áreas urbanas (García *et al.*, 2012). Esto podría deberse a que la densidad de la población y la dinámica de los hospedadores definitivos e intermediarios varían entre los entornos urbanos y rurales (Bisson *et al.*, 2000; Iovu *et al.*, 2012; Kamani *et al.*, 2010).

Por otra parte, la crianza de caprinos en campos abiertos o sistemas extensivos, principalmente para carne, disminuirían la posibilidad de infección por *T. gondii* debido al tipo de pastoreo alto de hojas y ramas (Borde *et al.*, 2006; Gebremedhin *et al.*, 2014b; Jittapalapong *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2013; Machado y Lima, 1987; Silva *et al.*, 2003). Además, las cabras se alimentan en áreas comparativamente más extensas, por lo que es probable que se expongan a una menor concentración de ooquistes, debido a que estos podrían estar más dispersos (Tzanidakis *et al.*, 2012).

Algunos autores informaron que el sistema de manejo de las cabras no tuvo un efecto significativo sobre la incidencia de toxoplasmosis (Teshale *et al.*, 2007; van der Puije *et al.*, 2000). Sin embargo, Figueiredo *et al.* (2001) y Neto *et al.* (2008) indicaron que el sistema extensivo/semi-extensivo podría ser un factor de riesgo, sugiriendo que las cabras criadas en este tipo de explotación tendrían más chances de infectarse con pasturas contaminadas con ooquistes eliminados por felinos domésticos y silvestres. Por lo tanto las diferencias en las seroprevalencias en relación con el sistema de explotación podrían relacionarse con la definición de los sistemas de manejo por cada autor, donde los semi-extensivos mencionados por ellos, serían posiblemente semejantes a los semi-intensivos (con encierres y suplementación) mencionados en este estudio.

En relación con las condiciones higiénico-sanitarias varios autores determinaron que las cabras criadas para varios propósitos presentaban una mayor seroprevalencia que las criadas exclusivamente para la producción de leche y quesos. Esto fue atribuido a que estas últimas pertenecían a establecimientos

comerciales en los que se realizaba un mayor control de la higiene, lo que evitaría que los ooquistes se propaguen (Djokic *et al.*, 2014; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Gazzonis *et al.*, 2015; Zewdu *et al.*, 2013). En cambio, los sistemas extensivos mencionados en algunos estudios corresponderían a explotaciones de pequeñas empresas familiares, con un estándar higiénico inadecuado, relacionado con la presencia de roedores y gatos (Gazzonis *et al.*, 2015). Además la concentración de materia fecal y orina de los animales y los restos de alimentos pueden contribuir a mantener la viabilidad de los ooquistes (Dubey *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015). Bawm *et al.* (2016) encontraron que los establecimientos caprinos con pobres prácticas de manejo sanitarias (poca higiene, alimentación inadecuada, falta de vacunación y desparasitaciones regulares) implicaron un riesgo mayor de infección por *T. gondii*. En nuestro estudio, en la provincia de Salta la seroprevalencia hallada en el tambo con manejo semi-intensivo fue del 13 %, lo que podría relacionarse con apropiadas condiciones de higiene.

La presencia de felinos y crianza de gatos en los establecimientos ha sido considerada un factor de riesgo importante para la toxoplasmosis en cabras (Bawm *et al.*, 2016; Tzanidakis *et al.*, 2012; Zewdu *et al.*, 2013). Varios trabajos describen una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y la presencia de gatos en los rebaños caprinos (Bawm *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2016; García *et al.*, 2012;; Liu *et al.*, 2015; Neto *et al.*, 2008). Cavalcante *et al.* (2008) encontraron también asociación con el número de gatos en las propiedades, determinando que la probabilidad de infección de las cabras era

mayor en aquellos establecimientos que tenían más de 10 gatos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que pocos gatos son suficientes para contaminar una amplia área en poco tiempo, ya que un gato infectado puede eliminar millones de ooquistes (Silva *et al.*, 2003; Tenter *et al.*, 2000). Fortes *et al.* (2018) determinaron que los establecimientos seropositivos para toxoplasmosis tenían al menos 1 gato, en el 35,4 % tuvieron gatos menores de 1 año de edad y en el 42,5 % los gatos tenían acceso a los depósitos de alimento de las cabras. El riesgo de infección de las cabras aumenta también si los gatos tienen acceso a los comederos, bebederos y lugares de almacenamiento de alimento (Anderlini *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012; Tzanidakis *et al.*, 2012). Por otro lado, Jung *et al.* (2014) justificaron la baja seroprevalencia hallada en Corea al bajo número de gatos presentes en los hatos estudiados. Si bien en nuestro trabajo, no se determinó la presencia de gatos, es muy frecuente observar su presencia en todos los rebaños de nuestro país.

La presencia de gatos asilvestrados, que no viven todo el tiempo en los establecimientos, también puede ser un factor importante para mantener la cadena epidemiológica de la toxoplasmosis, debido a que estos animales acostumbran a cazar, presentando una mayor chance de infección que los gatos criados en los propios establecimientos y que son alimentados con balanceado (Czopowicz *et al.*, 2011; Luciano *et al.*, 2011).

Las diferencias en la seropositividad entre regiones de un mismo país podrían también explicarse por las diferentes condiciones climáticas y geográficas que influyen en la supervivencia y diseminación de los ooquistes en

el medio ambiente (Dubey, 2010). La elevada seroprevalencia hallada en todos los establecimientos estudiados de la provincia Buenos Aires, sugiere que los ooquistes estarían ampliamente dispersos en el ambiente, lo que podría atribuirse al clima templado y a la mayor humedad ambiental en comparación con las provincias de Salta, La Rioja, San Luis y el noroeste de Córdoba. Los ooquistes de *T. gondii* pueden permanecer infecciosos desde meses a años en suelos húmedos (Dumètre y Dardé, 2003; Jones y Dubey, 2010; Lélou *et al.*, 2012). En nuestro trabajo, sólo se analizaron establecimientos de producción lechera de la provincia de Buenos Aires; sería interesante poder analizar establecimientos con otros sistemas productivos para determinar con mayor precisión la influencia del clima en la presencia de la infección en la provincia.

En Brasil, las seroprevalencias más altas informadas se encontraron en estados de la región Noreste, que tiene clima predominantemente cálido y húmedo (Anderlini *et al.* 2011; Bispo *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2003). En numerosos estudios, las prevalencias son mayores en caprinos de zonas húmedas de clima templado con respecto a las de zonas áridas con climas extremos, demostrando que la humedad elevada y el tipo de vegetación crean las condiciones favorables para la supervivencia de los ooquistes (Bispo *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2015; Gondim *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2003). Por el contrario, las prevalencias más bajas se detectaron en áreas áridas (de Sousa *et al.*, 2012; Dubey, 2010; Kamani *et al.*, 2010). Estas diferencias también fueron descritas en distintas regiones de España, Tanzania, Ghana y Etiopía (Díaz, *et al.* 2016; Gebremedhin *et al.*, 2014b;

Kamani *et al.*, 2010; Swai y Kaaya, 2013; Teshale *et al.*, 2007; Tilahun *et al.*, 2008; van der Puije *et al.*, 2000; Zewdu *et al.*, 2013). Asimismo, Djorkic *et al.* (2014) hallaron una de las seroprevalencias más altas en el mundo (73,3 %) y determinaron que existió correlación entre la seropositividad de las cabras con las lluvias abundantes en algunas regiones de Serbia. En China, la mayor seroprevalencia fue determinada por Zhou *et al.* (2018) concluyendo que la humedad de la región explicaría las diferencias con los resultados obtenidos en estudios realizados en otras regiones del mismo país (Li *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2011). Wang *et al.* (2011) detectaron una seroprevalencia del 3,8 % en la provincia más fría de China, explicando que probablemente los ooquistes no podrían sobrevivir los 6 meses de estación de invierno por las temperaturas bajas extremas.

A pesar de que en el noroeste de Córdoba la mayor parte de la cría de cabras se lleva a cabo bajo condiciones de manejo extensivo y el clima es seco y árido, los animales están confinados en corrales en determinados momentos del día y por lo tanto, la concentración de orina y heces podría cambiar las condiciones ambientales y crear una situación propicia para la supervivencia de los ooquistes. Carneiro *et al.* (2009) determinaron que el uso de corrales fue un factor de riesgo para la toxoplasmosis. Además, en las provincias de La Rioja, Salta y noroeste de Córdoba las cabras recorren grandes distancias en áreas poco explotadas en las que los felinos salvajes, como el puma (*Felis concolor*) y el gato montés sudamericano (*Leopardus geoffroyi*) se observan con frecuencia (Burkart *et al.*, 1999). El rol de los felinos salvajes en la toxoplasmosis aún no se ha

estudiado en esta región, pero podrían estar implicados en la contaminación con ooquistes de las zonas de pastoreo (Dubey, 2010; Luciano *et al.*, 2011). En la isla de Fernando de Noronha, Brasil, un estudio sobre un total de 118 felinos indicó una mayor seropositividad en animales silvestres, reforzando la importancia de estos felinos en la epidemiología de la toxoplasmosis (Costa *et al.*, 2012).

En la provincia de Córdoba, se observaron diferencias significativas en la seroprevalencia de *T. gondii* entre los departamentos estudiados, y dentro de los establecimientos del mismo departamento, debido a que en algunos de ellos todos los animales fueron seropositivos o bien seronegativos. Estas diferencias podrían estar influenciadas por el clima y la altitud, ya que existe una zona montañosa importante que divide la región. Para completar estos primeros hallazgos sería conveniente realizar estudios de georeferenciación para evaluar adecuadamente la concentración y distribución de los establecimientos seropositivos.

En relación a la distribución de los títulos de anticuerpos anti- *T. gondii* hallados, se observó que el 62,4 % y 37,6 % de las cabras analizadas presentaron títulos de 100 y 800 respectivamente. De acuerdo a Dubey y Kirkbride (1989), los títulos ≥ 1024 indican infección activa y los títulos menores se relacionarían con infecciones crónicas. Por lo tanto, se podría considerar que gran parte de las cabras analizadas en este estudio estarían infectadas crónicamente, lo que constituye un riesgo para la salud pública (Tenter, 2009).

Se observaron diferencias significativas entre las provincias en relación a distribución del título 800, siendo Buenos Aires la que presentó la mayor

proporción (60,7 %). Relacionando este título y el tipo de manejo, se determinó que las cabras de sistemas semi-intensivos/intensivos tienen 8 veces más probabilidades de presentar títulos elevados, lo que podría relacionarse con los contactos reiterados con las fuentes de infección, dando lugar a reinfecciones (Carneiro *et al.*, 2009; Tzanidakis *et al.*, 2012).

En el análisis llevado adelante en la provincia de La Rioja se detectó una asociación entre la seropositividad a *T. gondii* y la presencia de abortos, resultando en una probabilidad 2 veces mayor de abortar en animales seropositivos. Por otra parte en los animales seropositivos en los que se evaluó seroconversión, algunas cabras habían abortado entre muestreos, sin que los mismos afectaran el movimiento de los títulos de anticuerpos. Esto podría relacionarse con el tiempo transcurrido entre el aborto y el segundo muestreo, o bien, en el resto de los animales, con el tiempo transcurrido entre el aborto y el primer muestreo. Sin embargo en esta región se encontraron cabras que presentaban anticuerpos anti-*N. caninum* con título ≥ 800 pero eran seronegativas para *T. gondii*, y si bien *N. caninum* es un agente causal de abortos, no se pudo determinar la asociación entre la neosporosis y la presencia de abortos por el bajo número de animales seropositivos. Por todo esto se infiere que *T. gondii* puede haber estado implicado en los abortos de esta región. Sin embargo, alrededor del 70 % de las cabras que abortaron fueron seronegativas, lo que indicaría que otros agentes infecciosos (distintos de *T. gondii*) y no infecciosos podrían haber estado implicados también como causales de los abortos de la zona muestreada.

En la provincia de San Luis no se encontró relación significativa entre los rebaños seropositivos y los que presentaban antecedentes de abortos. Además, el 51,3 % de los establecimientos analizados no presentaron anticuerpos anti-*T. gondii*. Se considera que sería necesario realizar estudios a nivel individual y no a nivel de hato para evidenciar posibles asociaciones causales de abortos. Si bien en esta provincia se encontraron establecimientos con animales seropositivos para *N. caninum* y se informaron que presentaban animales seropositivos para brucelosis, también se determinó que el 42,2 % no presentaron anticuerpos contra ninguna de las tres infecciones, por lo que es posible que otras causas de tipo no infecciosas estuvieron implicadas en los abortos. Curiosamente, todos los establecimientos seropositivos a nuestro estudio de toxoplasmosis lo fueron también para brucelosis. Serían necesarios otros estudios para evaluar la posible sinergia de la coinfección de estos agentes, así como realizar seguimiento serológico comparativo, evaluar las tasas de seroconversión, el uso de ELISA de avidéz y el examen de fetos abortados para detección del parásito por técnicas inmunológicas, de biología molecular o aislamiento en estas provincias.

Otra potencial causa de aborto caprino infecciosa reportada en el país es *N. caninum* (Campero *et al.*, 2018), por lo que analizamos el grado de coinfección con *T. gondii* en todas las muestras de este estudio. El valor de seroprevalencia de *N. caninum* hallado (4,7 %) fue similar a los reportados en caprinos de otras regiones del mundo y previamente en la provincia de La Rioja

(Diakou *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2016; Faria *et al.*, 2007; Figliuolo *et al.*, 2004; Iovu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2007).

Si bien los porcentajes de seroprevalencia de neosporosis en las distintas provincias estudiadas ha sido < 10 % y el porcentaje de coinfección para toxoplasmosis y neosporosis fue del 2,8 %, se deberían realizar estudios para determinar el impacto de la neosporosis sobre la aparición de abortos. Las mayores seroprevalencias para *N. caninum* se presentaron en las provincias de Buenos Aires y Catamarca lo que también podría estar relacionado con el manejo intensivo de los animales (Bartova y Sedlak, 2012; Liu *et al.*, 2015; Topazio *et al.*, 2014; Uzêda *et al.*, 2007). Se destaca, sin embargo, que un amplio porcentaje de cabras seropositivas a *N. caninum* lo fueron también a *T. gondii* (60,7 %). Existen pocos estudios que determinan la relación entre ambas infecciones. Díaz *et al.* (2016) también reportaron que la coinfección con ambos protozoos en el noroeste de España no fue frecuente (6 %), pero fue interesante reconocer que el 91,1 % de las cabras seropositivas a *N. caninum* lo fueron también a *T. gondii*; determinando que las cabras tenían 9,5 veces más probabilidad de infectarse con *N. caninum* si eran positivas a *T. gondii*. Lo expuesto anteriormente sugiere que los factores de riesgo asociados al manejo, clima y características geográficas de la región expresados para la toxoplasmosis, sumado a la presencia de perros, podrían ser los mismos que para la infección con *N. caninum* en caprinos de Argentina. En la provincia de Córdoba se presentaron algunos establecimientos con alta seropositividad para neosporosis, lo que puede deberse a que en los

mismos habitan los perros cabriteros, hospedadores definitivos de este parásito, que cumplen un rol fundamental en el manejo de los caprinos.

El sexo de los animales analizados en este trabajo no parece influir en la infección con *T. gondii*, lo que indicaría que tanto machos como hembras estarían igualmente expuestos a las mismas fuentes de infección. Esto coincide con varios trabajos que determinaron que el sexo de los animales no era un factor de riesgo para la infección por *T. gondii* en cabras (Bisson *et al.*, 2000; Carneiro *et al.*, 2009; Cavalcante *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2007; Kamani *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2014; Sella *et al.*, 1994; Tzanidakis *et al.*, 2012). Otros estudios han determinado que las hembras presentaban un mayor riesgo de infección (Jittapalapong *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2003; Swai y Kaaya, 2013; Tegegne *et al.*, 2016; Teshale *et al.*, 2007; Uzêda *et al.*, 2004; van der Puije *et al.*, 2000; Zewdu *et al.*, 2013). Si bien se ha sugerido que las hembras serían más susceptibles que los machos a la infección por parásitos protozoarios (Roberts *et al.*, 2001), se debe tener en cuenta que las hembras generalmente se mantienen por un período más largo en los establecimientos para la reproducción en relación a los machos que se venden para carne, aumentando su exposición a los ooquistes en el tiempo. Además, las hembras están expuestas al estrés de la preñez y la lactancia, presentando períodos de inmunodepresión que podrían aumentar su susceptibilidad a la infección (Swai y Kaaya, 2013; Teshale *et al.*, 2007; Tilahun *et al.*, 2018; Zewdu *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, aunque no se encontraron diferencias significativas para esta variable, hubo una mayor proporción de machos positivos (28 %; 14/50) en

relación a las hembras (24,9 %; 174/699). Esto también se observó en estudios de seroprevalencia en Nigeria y China (Kamani *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011). Se debe tener en cuenta que la cantidad de hembras analizadas en nuestro trabajo fue muy superior a la de los machos, dado que en las propiedades muestreadas, los machos son carneados o vendidos, mientras que las hembras se conservan para la reproducción y/o la producción de leche. Este tipo de “sesgo” en el muestreo ha sido también reportado por otros autores como una dificultad en el análisis de riesgo (Jittapalapong *et al.*, 2005; Manazza *et al.*, 2012a; van der Puije *et al.*, 2000).

En este trabajo se observó que los animales de raza Saanen tienen más probabilidades de infección para *T. gondii* que los criollos o cruza, lo que coincide con los estudios de Nunes *et al.* (2013) y de Carneiro *et al.* (2009) en los que los animales de raza pura presentaron una mayor proporción de seropositividad en comparación con los animales sin raza definida. Se ha sugerido que las cabras de raza al ser introducidas originalmente desde otros países, estarían menos adaptadas al ambiente y podrían ser más susceptibles a la infección con genotipos de la región (Jittapalapong *et al.*, 2005). Sin embargo, Díaz *et al.* (2016) indicaron que las cabras cruza presentaron mayor seropositividad que las cabras de raza propia (Galega) de la región, las que se encontrarían más adaptadas al ambiente y los agentes presentes que las cruza introducidas. Nuestros resultados creemos se vinculan al tipo de explotación y manejo semi-intensivo/intensivo de las razas lecheras (Saanen), el cual influiría en la mayor seropositividad como se discutió previamente. Sería interesante

determinar si existe una mayor susceptibilidad genética entre distintas razas expuestas al mismo manejo y a diferentes genotipos de *T. gondii* presentes en cada región.

5. VALIDACIÓN DEL ELISA TGSAG1 (P30) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN CAPRINOS

5.1. Materiales y métodos

Con el fin de validar en nuestro medio el uso del ELISA-TgSAG1 indirecto para el diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos se conformó un panel de sueros para utilizar como estándar relativo de comparación (ERC) (OIE, 2014). Se analizó la presencia de anticuerpos anti- *T. gondii* por la técnica de IB en sueros caprinos, previamente analizados por IFI. Los sueros con resultados concordantes a ambas pruebas, ya sea serológicamente positivos y/o negativos, se incluyeron en el ERC.

5.1.1 Prueba de IB y conformación del ERC

Se utilizaron 598 sueros provenientes de cabras de las provincias de Buenos Aires, La Rioja, San Luis, Salta, Córdoba y Catamarca que fueron seleccionados al azar.

Se incluyeron muestras serológicamente positivas a las diluciones 1:100, 1:800 y muestras negativas a IFI, de animales pertenecientes a establecimientos con prevalencias bajas y altas de la enfermedad.

Para la prueba de IB se realizó la técnica de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12,5 % a partir de un sonicado de taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* (antígeno total) en condiciones no reducidas y utilizando un marcador de peso molecular (Standard, *low range*, Biorad, California, EE.UU) (Anexos 4 y 5). Las proteínas se transfirieron

a membranas de PVDF las cuales fueron conservadas a -20°C hasta el momento de realización de la prueba (Anexo 6). Las membranas de antígeno se cortaron en tiras de 2-3 mm de ancho y se incubaron en solución de bloqueo (PBS 1x- 0,05 % Tween 20 – 2 % gelatina de pescado) en agitación y a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se incubaron los sueros caprinos y los controles en una dilución de 1:100 en solución de bloqueo durante una hora. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 2 minutos cada uno con solución de lavado (PBS 1x - 0,05 % Tween 20). Se procedió a incubar las tiras con el conjugado anti- Ig G de cabra unido a peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU), diluido 1:1000 en PBS 1x durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos con solución de lavado y 2 lavados más con PBS 1x. La unión antígeno-anticuerpo se puso en evidencia utilizando H_2O_2 como sustrato, en presencia de 4-cloronaftol como cromógeno, para lo cual los sueros fueron incubados durante 20 minutos con una solución de 30mg de 4-chloro-1 naphthol, 10 ml de metanol, 30ml de PBS y 40 μl de H_2O_2 . Todos los lavados y las incubaciones se realizaron en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se detuvo con agua destilada y se dejaron secar las tiras en papel secante para la observación de los resultados (Anexo 7). Se consideró una muestra positiva cuando aparecieron 2 o más bandas coloreadas de los identificados IDAs, de acuerdo a su peso molecular relativo (Pardini *et al.*, 2012).

Posteriormente, fueron seleccionados 478 sueros como ERC con resultados concordantes a las pruebas de IFI e IB para *T. gondii* en una

proporción de 1 positivo cada 3 negativos según lo recomendado por la OIE (2014). Los sueros de este panel fueron analizados por el ELISA-TgSAG1.

5.1.2. Prueba de ELISA-TgSAG1 (ELISA-P30) y análisis de datos

Para la prueba de ELISA-P30 se utilizó la proteína nativa de *Toxoplasma gondii* TgSAG1 (P30) que fue elaborada y purificada por el Dr. Gereon Schares (*Friedrich Loeffler Institute, FLI, Alemania*). La obtención se realizó por cromatografía de afinidad, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (Mab) Ig G2a P30 /3 (Immune System Ltd, Paignton, UK) incorporado a una columna de sefarosa, que reconoce el antígeno de superficie P30 de los taquizoítos de *T. gondii* (Hosseininejad *et al.*, 2009; Maksimov *et al.*, 2011).

Como control positivo se utilizó suero de una cabra adulta con título de 3200 para la IFI de *T. gondii* y negativa para la IFI de *N. caninum*. Esta cabra presentó aborto y la infección fue confirmada por PCR y genotipificación a partir de tejidos fetales (Fetos 1 a 3, ver en siguiente capítulo). Como control negativo se utilizó suero de un cabrito obtenido al nacimiento (previo a la ingesta de calostro), de una madre seronegativa para toxoplasmosis y neosporosis. Se determinó la concentración apropiada de proteína P30 utilizando distintas diluciones de la misma y de los sueros controles. Se seleccionó la menor concentración proteica que permitiera obtener un buen nivel de densidad óptica (DO) diferencial entre los controles.

Se sensibilizaron placas de ELISA con el antígeno nativo de *T. gondii* TgSAG1 diluído 1:200 en 0,1M de bicarbonato de sodio pH 8,3 (concentración de 12ng/pocillo) y se incubó por 1 hora a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBS 1x -

0,05 % Tween 20 y las placas se bloquearon con una solución de PBS 1x - 0,05 % Tween 20 con 20 % de suero equino por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se vaciaron los pocillos y se agregaron los sueros caprinos diluidos 1:100 en la solución de bloqueo. Se incluyeron los sueros controles y un blanco por placa (OIE, 2014). Todas las muestras y controles se realizaron por duplicado y se incubaron por 30 minutos a 37°C. Luego se realizaron 3 lavados y se agregó el conjugado anti-Ig G de cabra con peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) diluido 1:4000 en PBS 1x - 0,05 % Tween 20 con 1 % de suero equino. Se incubó 30 minutos a 37°C y se hicieron 3 lavados iguales a los anteriores y 2 lavados con agua destilada. Posteriormente se agregó el sustrato (100 µg/ml 3,3',5,5'-tetrametilbencidina - 0,004 % de peróxido de hidrógeno en una solución de 0,2 M de acetato de sodio y 0,2 M de ácido cítrico) y se incubó por 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con el agregado de ácido sulfúrico a una concentración final de 4N. Los valores de densidad óptica (DO) se midieron en un lector de ELISA en modo dual con un filtro de 450nm (filtro de referencia 620nm) (Anexo 8). Los resultados se expresaron como índices de ELISA de acuerdo a la siguiente fórmula:
$$\frac{\text{Promedio DO muestra} - \text{Promedio DO control negativo}}{\text{Promedio DO control positivo} - \text{Promedio DO control negativo}}$$
 (Pardini *et al.*, 2012).

Los resultados del ELISA para los sueros del ERC fueron analizados mediante la curva de características de tipo receptor-operador (ROC) utilizando el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc., San José, CA, USA). Se determinó el índice de ELISA (*cutoff*) donde los valores de sensibilidad (Se) y

especificidad (Sp) relativa fueran óptimos considerando un intervalo de confianza del 95 %. Se calculó el área bajo la curva (AUC) para evaluar la capacidad de la prueba para discriminar correctamente entre las muestras positivas y negativas (Greiner y Gardner, 2000; Greiner *et al.*, 2000). Se consideró como no informativa (AUC= 0,5), poco precisa ($0,5 < \text{AUC} \leq 0,7$), moderadamente precisa ($0,7 < \text{AUC} \leq 0,9$), altamente precisa ($0,9 < \text{AUC} \leq 1$) y perfecta (AUC= 1) (Swets, 1988).

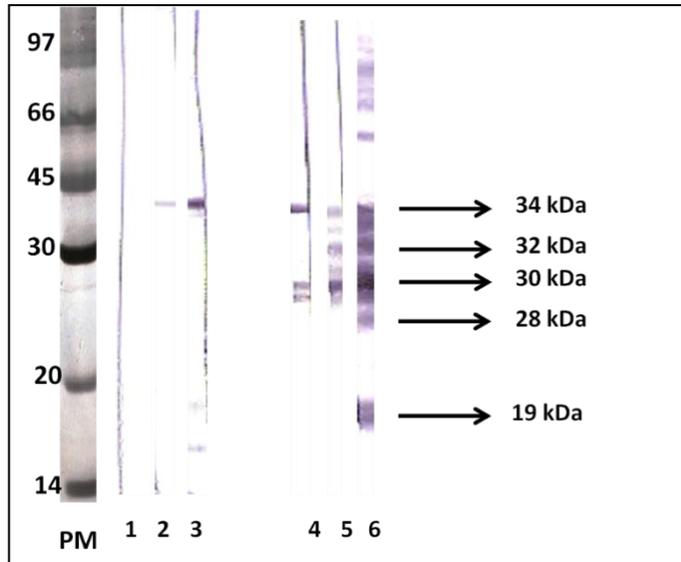
La concordancia entre las pruebas serológicas realizadas (IFI e IB, ERC y ELISA-P30) se determinó mediante el estadístico Kappa (K) utilizando el programa EPIDAT 3.1 (Organización Panamericana de la Salud y Xunta de Galicia, *Consellería de Sanidade*). Los valores de kappa se interpretaron como: pobre ($k= 0$), leve ($k= 0-0,20$), aceptable ($k= 0,21-0,40$), moderada ($k= 0,41-0,60$); considerable ($k= 0,61-0,80$); casi perfecta ($k > 0,81$) (Conraths y Schares, 2006). La relación entre las bandas de distinto peso molecular del IB y el título de los sueros a IFI (100 y 800) se realizó por la prueba de chi-cuadrado con el programa WinEpi 2.0 (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza).

5.2. Resultados

5.2.1. *Immunoblot* y conformación del ERC

Por la prueba de IB se identificaron las bandas proteicas con pesos moleculares de movilidad relativa de 34, 32, 30, 28 y 19 kDa como IDAs, de acuerdo a la intensidad de las reacciones en la unión antígeno-anticuerpo en los sueros caprinos (Figura 7).

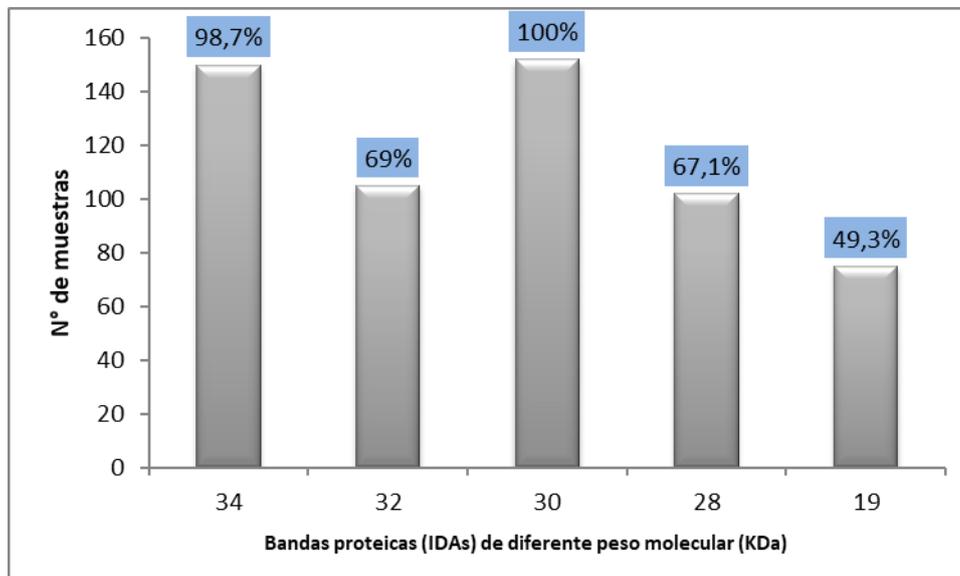
Figura 7. Reactividad de sueros caprinos naturalmente infectados a los diferentes IDAs de *T. gondii*.



Resultados IB: 1,2,3: sueros negativos. 4,5,6: sueros positivos.
PM: Marcador de peso molecular.

Los IDAs de 30 y 34 kDa fueron reconocidos con mayor frecuencia e intensidad en las muestras analizadas. Del total de muestras analizadas por esta técnica, 152 resultaron positivas al reaccionar hacia dos o más IDAs, presentando el 100 % de ellas reacción hacia las proteínas de 30 kDa y el 98,7 % hacia las proteínas de 34 kDa, mientras que las reacciones hacia las demás proteínas fueron menores (IDAS de: 32 kDa: 69 %, 28 Kda: 67 % y 19 kDa: 49,3 %) (Figura 8). Entre las 446 muestras que resultaron negativas el 32,3 % presentó una única reacción marcada a la proteína de 34 kDa, mientras que existieron reacciones tenues hacia las otras fracciones en otras muestras (en 2 muestras para la proteína de 30 kDa, en 2 para la de 28 kDa, en 1 para la de 19 kDa y ninguna presentó reacción hacia la de 32 kDa).

Figura 8. Distribución de las reacciones positivas a los distintos IDAs de los sueros positivos al Immunoblot (n=152).



En el análisis comparativo de los sueros positivos a diluciones 1:100 y 1:800 de IFI y reacciones a diferentes IDAs en el IB, aparecieron significativamente más representadas las bandas de 28 kDa ($p=0,0198$) y la de 19kDa ($p=0,0001$) en muestras con título alto (1:800).

El ERC para evaluar el ELISA-P30 quedó conformado por 136 sueros positivos y 342 sueros negativos concordantes entre IFI e IB ($n= 478$) del total de 598 sueros analizados. Los 120 sueros discordantes entre las 2 pruebas serológicas fueron descartados y no se incluyeron en el ERC. De estos últimos 104 sueros fueron positivos para IFI y negativos para IB presentando un 27 % de ellos reacciones a la proteína de 34 kDa, mientras que 16 sueros fueron positivos para IB (todos con reacciones a las proteínas de 30 y 34 kDa) y negativos para IFI. Las pruebas diagnósticas IFI e IB presentaron un grado de concordancia moderado ($k= 0,556$) (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados de la prueba de IB en relación a la prueba de IFI y obtención de sueros para ERC.

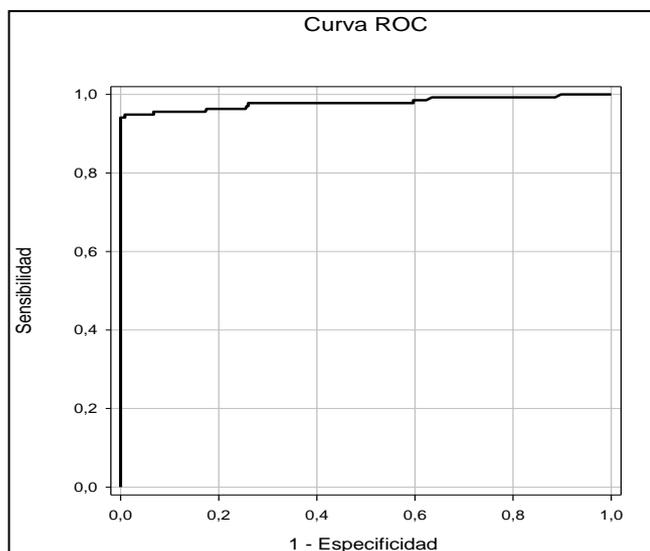
		IB		
		Positivos	Negativo	Total
IFI	Positivos	136	104	240
	Negativos	16	342	358
	Total	152	446	598

Valor de concordancia $\kappa = 0,556$.

5.2.2. ELISA-P30 y análisis de datos

El análisis por curva ROC determinó que el ELISA-P30 fue altamente preciso para discriminar sueros positivos y negativos con un área bajo la curva AUC= 0,9788 (IC 95% 0,9602-0,9974) en relación al ERC. Se seleccionó un índice de 0,2185 como el más apropiado y fue utilizado como valor de corte, en el que los valores de sensibilidad y especificidad relativas para la prueba de ELISA-P30 fueron de 96 % (IC 95%: 92,69-99,85%) y 98 % (IC 95%: 96,33-99,60 %), respectivamente (Figura 9).

Figura 9. Curva de características de tipo receptor-operador (ROC) para ELISA-P30 utilizando el ERC.



Valor de índice óptimo o *cutoff* = 0,2185. Área bajo la curva = 0,9788.

De los 136 sueros positivos del ERC, 129 sueros resultaron positivos al ELISA-TgSAG1 (94,85 %), mientras que 337 sueros de los 342 sueros negativos del ERC fueron también negativos por el ELISA (98,54 %) (Tabla 14).

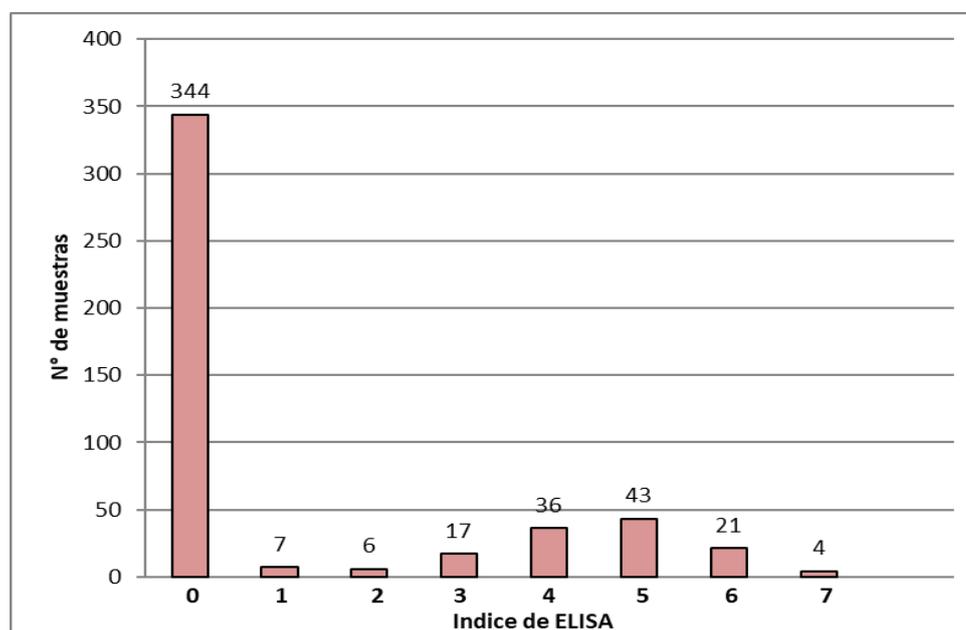
Tabla 14. Resultados del ELISA-TgSAG1 (P30) en relación con el ERC (IFI, IB).

		ELISA- TgSAG1 (P30)		
		Positivos	Negativos	Total
ERC	Positivos	129	7	136
	Negativos	5	337	342
	Total	134	344	478

Valor de concordancia $\kappa=0,9381$; Sensibilidad (Se): 96% y Especificidad (Sp): 98%.

La mayoría de los índices positivos del ELISA se encontraron entre los valores de 0,8 a 1,2 (Figura 10). La concordancia observada entre el ERC y el ELISA P30 fue casi perfecta ($k= 0,9381$; IC 95%: 0,9035-0,9726).

Figura 10. Índices de ELISA obtenidos con el ELISA-TgSAG1.



Referencias: Índices de ELISA 0= -0,2185; 2= 0,22-0,4; 3= 0,41-0,6; 4= 0,61-0,8; 5= 0,81-1; 6= 1,1-1,4; 7= 1,41-1,6.

5.3. Discusión

Las pruebas serológicas de diagnóstico indirecto, que detectan anticuerpos anti- *T. gondii*, son las utilizadas de rutina en el diagnóstico de la toxoplasmosis caprina. Una de las principales ventajas de las pruebas inmunoserológicas, es la posibilidad de realizar el diagnóstico de animales en pie. Esto las diferencia de las pruebas de diagnóstico directas, tales como la técnica de PCR, el aislamiento y la inmunohistoquímica, que requieren muestras de tejidos, generalmente de material obtenido a la necropsia. Las técnicas de diagnóstico directo brindan resultados definitivos y certeros, aunque suelen ser más costosas e implican en algunos casos el uso de animales de laboratorio,

requiriendo más tiempo para obtener los resultados (Dubey, 2010; Pereyra-Bueno *et al.*, 2004).

La prueba de IFI es una de las pruebas serológicas más usadas en el diagnóstico de toxoplasmosis, debido a que presenta elevada sensibilidad y especificidad (Dubey, 2010). Sin embargo, es poco práctica si se requiere analizar un gran número de muestras y es subjetiva en la interpretación de los resultados. Por lo tanto, resulta interesante el desarrollo y validación local de pruebas de ELISA para el diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos debido a que permiten analizar un mayor número de muestras, siendo más objetiva la interpretación de los resultados. Esto es importante para conocer la seroprevalencia en los hatos y establecer medidas de control.

En el presente estudio además de IFI se realizó la prueba de IB con el fin de obtener el panel de sueros concordantes para formar el ERC. La utilización de un panel de sueros concordantes a dos pruebas serológicas es una de las alternativas posibles para determinar el rendimiento de una nueva prueba diagnóstica cuando no es posible obtener un estándar de oro o *gold standard* (OIE, 2014). La prueba de IB ha sido muy utilizada en animales para la detección de anticuerpos anti- *N. caninum*, principalmente en bovinos y caninos, demostrando buena sensibilidad y especificidad (Pinheiro *et al.*, 2005; Staubli *et al.*, 2006) y su utilidad para determinar títulos de corte y descartar reacciones cruzadas (Silva *et al.*, 2007). Su uso para el diagnóstico de *T. gondii* se ha documentado principalmente en humanos para determinar anticuerpos en infecciones congénitas (Gross *et al.*, 2000; Khamari *et al.*, 2014; Magi y Migliorini,

2011) y en menor medida en animales (Chávez-Velásquez *et al.*, 2005; Pardini *et al.*, 2012; Saavedra y Ortega, 2004; Silva *et al.*, 2007).

Según los resultados del IB de los sueros de cabras analizados en este trabajo se determinó que las fracciones de 30 y 34 kDa son los IDAs principales para el diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos de la región, debido a que se presentaron reacciones a éstas en la mayoría de las muestras positivas. Esto sería similar a lo descrito por Conde *et al.* (2001) quienes estudiaron la evolución de la respuesta de IgG contra *T. gondii* en cabras infectadas experimentalmente (cepa RH) mediante IB, y observaron que la mayor reactividad de los sueros se presentó para el grupo de antígenos entre 28 y 34 kDa, y en particular para el antígeno de 30 kDa desde el día 14 p.i. Reacciones similares fueron observadas en estudios en ovejas inoculadas con la cepa vacunal de *T. gondii* (S48) (Wastling *et al.*, 1994).

Varios trabajos demostraron la presencia de reacciones a la banda proteica de 30 kDa en sueros de animales infectados por *T. gondii* tanto en forma natural como experimental (Conde *et al.*, 2001; Pardini *et al.*, 2012; Saavedra y Ortega, 2004; Silva *et al.*, 2007). Esta fracción antigénica incluiría a la proteína de superficie principal P30 o SAG1 de *T. gondii* debido al peso molecular o movilidad relativa similar (McLeod *et al.*, 1991). Si bien la banda de 30 kDa se encontró marcada de forma tenue en 2 muestras negativas, parece ser más específica en relación a la de 34 kDa, para la que se evidenciaron reacciones en el 32,3 % de las muestras negativas. La banda proteica de 34 kDa podría corresponder a las proteínas Gra6 o Rop 9 de *T. gondii* que demostraron tener un peso de entre 32

y 36 kDa en pruebas de IB con sueros humanos (Khamari *et al.*, 2014). Debido a esto, la reacción positiva de la banda de 34 kDa debería considerarse en el diagnóstico de la toxoplasmosis caprina si se detecta en conjunto con alguno de los demás IDAs (32, 30, 28 y 19 kDa). Las bandas de menores pesos moleculares (28 y 19 kDa) aparecen marcadas con mayor frecuencia en los sueros con títulos más altos. La reacción a la banda de 19 kDa apareció en numerosos sueros analizados (49,3 %), en contraste con el trabajo de Conde *et al.* (2001) donde no encontraron reacciones a proteínas por debajo de 23 kDa de peso molecular. Otros trabajos han descrito reacciones a proteínas de *T. gondii* de bajo peso molecular (11 kDa, 16-17 kDa, 19kDa) en sueros de cabras y ovejas infectadas experimentalmente con varias cepas del parásito (Harkins *et al.*, 1998; Vitor *et al.*, 1999; Wastling *et al.*, 1995). La mayor reactividad a proteínas de bajo peso molecular podrían deberse a un mayor nivel de anticuerpos (como observamos en las muestras de títulos altos de esta tesis), al grado de degradación del antígeno alcanzado después de la sonicación de los taquizoítos y a diferentes condiciones en el SDS-PAGE.

Si bien en algunos trabajos la prueba de IB permitió detectar anticuerpos a partir de 12-14 días p.i. en ellos no se encontró relación entre el patrón de reacción a diferentes IDAs y el período de infección (Conde *et al.*, 2001; Vitor *et al.*, 1999). A pesar de que el IB es una técnica muy laboriosa, podría ser utilizada en combinación con otras técnicas como confirmatoria del diagnóstico serológico de la toxoplasmosis en caprinos. La reacción a la proteína de 30 kDa en todas las

muestras positivas en esta técnica remarca la importancia de esta proteína como antígeno diagnóstico.

El antígeno SAG1 es considerado como el principal antígeno de superficie para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii*. Los antígenos de superficie se consideran más específicos que los antígenos intracelulares, y son la base de pruebas diagnósticas como la IFI, la cual detecta anticuerpos dirigidos hacia antígenos presentes en la superficie de los taquizoítos durante el inicio de la infección (Björkman y Uggla, 1999).

Los anticuerpos anti-SAG1 han sido identificados en sueros de distintas especies animales luego de la infección (Pardini *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2002) y también han sido identificados en cabras (Conde *et al.*, 2001; Velmurugan *et al.*, 2008; Vitor *et al.*, 1999). La proteína P30 ha sido ampliamente utilizada para la detección de inmunoglobulinas específicas de distintos isotipos en el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis humana (Bessieres *et al.*, 1992; Decoster, 1997; Harkins *et al.*, 1996; Marcolino *et al.*, 2000; Partanen *et al.*, 1984). Además, es importante su valor en el diagnóstico de infecciones causadas por diferentes genotipos del parásito, dado que está conservada en muchos aislados de *T. gondii* (Ware y Kasper, 1987). Esto ha sido comprobado también por Kimbita *et al.* (2001) al evaluar sueros de roedores inoculados con cuatro aislados distintas de *T. gondii* por un ELISA-P30 recombinante.

El ELISA elaborado con el antígeno nativo de superficie SAG1 en este trabajo demostró ser útil para la detección de anticuerpos anti- *T. gondii* en cabras naturalmente infectadas de nuestro país, encontrándose una

concordancia casi perfecta cuando se comparó con los sueros positivos y negativos del ERC. Se obtuvieron valores relativos altos de sensibilidad y especificidad con el valor de índice de 0,2185 como *cutoff* (96% y 98% respectivamente) y el ELISA-P30 demostró tener alta precisión para discriminar muestras positivas de negativas (AUC= 0,9788).

La prueba de ELISA con antígeno P30 purificado había sido utilizado antes en Grecia, por Tzanidakis *et al.* (2012) en cabras naturalmente infectadas. En Argentina esta prueba no había sido evaluada localmente para esta especie. Según la OIE (2014) es necesario estandarizar la misma prueba con sueros de animales naturalmente infectados de la región donde la misma se va a implementar, debido a que pueden existir variaciones epidemiológicas locales que generen una respuesta inmune distinta en los animales evaluados, como así también que los mismos estén expuestos a genotipos de *T. gondii* diferentes a las encontradas en otros países (Greiner *et al.*, 2000). Tzanidakis *et al.* (2012) obtuvieron buenos resultados de sensibilidad y especificidad (93,9 % y 100 %) con un valor de corte o índice menor al que se utilizó en este trabajo (0,0429). Sin embargo, la mayoría de los sueros que analizaron presentaron índices de ELISA mayores a 1,2 lo cual es similar a los índices de ELISA obtenidos en la mayoría de las cabras serológicamente positivas en este estudio. La conformación del ERC fue también por 2 pruebas diagnósticas (IFI e IB) y el área bajo la curva obtenida fue similar (AUC= 0,9731). Sobre la base del estudio realizado en Grecia y las recomendaciones de la OIE, podemos concluir que el ELISA P30 presenta una buena sensibilidad y especificidad y que, utilizando

índices o valores de corte adaptados a cada región o país, sería una herramienta útil para el diagnóstico de rutina de la toxoplasmosis caprina. Además, muchas de las pruebas diagnósticas comerciales carecen de estudios de validación regional, lo cual ubica a este ELISA como una prueba con aceptable performance en caprinos de nuestro país.

El ELISA-P30 también fue utilizado en otras especies en diferentes países con buenos resultados. Para la detección de anticuerpos en sueros caninos presentó una sensibilidad del 94,5 % y una especificidad del 93,6 %, con un *cutoff* mayor (0,790) (Hosseininejad *et al.*, 2009). En patos y gansos se obtuvo una sensibilidad del 94,4 % y especificidad del 95,8 % con un *cutoff* menor (0,14) (Maksimov *et al.*, 2011), pero en ambos casos sólo se utilizó la prueba de IFI como prueba de referencia. También se ha utilizado la proteína nativa SAG1 (P30) purificada desde taquizoítos lisados como antígeno para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis en ovinos (Sager *et al.*, 2003), cerdos (Azevedo *et al.*, 2010) y gatos (Kimbata *et al.* 2001), como así también en humanos (Decoster *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 1993; Santoro *et al.*, 1985). El ELISA-P30 también fue utilizado localmente en cerdos donde se obtuvo una sensibilidad del 92,8 % y una especificidad del 98,3 % con un *cutoff* de 0,204 y un AUC de 0,983 y utilizando un ERC de sueros analizados por IFI e IB (Pardini *et al.*, 2012). Estos últimos resultados coinciden con los hallados en el ELISA-P30 utilizado en este estudio, lo que podría relacionarse con la exposición de los animales a similares genotipos de *T. gondii*, en coincidencia con algunas características ambientales, aunque los sueros analizados hayan procedido de distintas especies.

La aplicación de esta prueba de ELISA-P30 en el diagnóstico de la toxoplasmosis caprina sería importante por diversas razones. Permitiría la reducción de los costos en el laboratorio de diagnóstico al permitir el procesamiento de un mayor número de muestras y posibilitaría el reemplazo de pruebas de ELISA comerciales importadas. Otra ventaja de esta prueba es la de utilizar un antígeno nativo. Su obtención y purificación implica un proceso largo y laborioso, pero sin embargo, durante el mismo no se alteran los epitopes conformacionales, como puede ocurrir cuando se utilizan antígenos recombinantes de *T. gondii* (Graille *et al.*, 2005). Kimbita *et al.* (2001) utilizaron un ELISA-P30 con SAG1 recombinante purificado (rSAG1) expresado en *Escherichia coli* para el diagnóstico de la toxoplasmosis en felinos inoculados experimentalmente, detectando una aceptable performance diagnóstica. Sin embargo, en estudios comparativos, los resultados de eficiencia diagnóstica obtenidos con ELISAs que utilizan antígeno TgSAG1 nativo han sido superiores a los que utilizan proteínas TgSAG1 recombinantes cuando se evalúan sueros de animales naturalmente infectados (Gamble *et al.*, 2000; Sager *et al.*, 2003). Otra ventaja del uso del ELISA-P30 sería la disminución de reacciones cruzadas con otros protozoos del mismo grupo, que pudieran generar resultados falsos positivos, mejorando la especificidad del diagnóstico. Esto fue comprobado por Maksimov *et al.* (2011) al evaluar sueros de gansos inoculados experimentalmente con *Hammondia hammondi*, por Hosseininejad *et al.* (2009) al evaluar sueros de caninos que presentaban altos títulos de anticuerpos anti-*N. caninum* debido a infección natural y por Kimbita *et al.* (2001) al analizar sueros

de roedores infectados experimentalmente con *N. caninum* por un ELISA-P30 con antígeno recombinante. En todos estos trabajos, los sueros de animales infectados con otros protozoos resultaron negativos a las pruebas utilizando P30 como antígeno, descartando posibles reacciones cruzadas.

Si bien se suponía que al utilizar una prueba con antígeno SAG1 purificado se podría realizar la detección temprana de los anticuerpos específicos al inicio de la infección dado a que el antígeno SAG1 es específico del estadio de taquizoíto (Kasper *et al.*, 1989; McLeod, 1991), algunos estudios han demostrado que el pico de producción de Ig G se detecta de forma más tardía por ELISA-P30 en comparación con la prueba de IFI en otras especies de animales infectados experimentalmente (Maksimov *et al.*, 2011; Pardini *et al.*, 2012). Por lo tanto, tanto el ELISA-P30 como la prueba de IB no serían adecuados para discriminar entre una infección reciente y una infección latente o crónica. Para conocer la evolución de la infección por *T. gondii* en cabras y la discriminación de una infección reciente, sería necesario el desarrollo de un ELISA-P30 que permita identificar el incremento de la avidéz de los anticuerpos anti- *T. gondii* (Björkman *et al.*, 1999; Jenum *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 2003).

En conclusión, sería importante lograr implementar la prueba de ELISA-P30 en el diagnóstico de la toxoplasmosis caprina en nuestro medio debido a que ha demostrado alta precisión. Además, podría utilizarse regularmente para el diagnóstico ya que es una técnica inmunoserológica práctica, de rápida realización, ofreciendo además una alternativa de menor costo en relación con ELISAs comerciales existentes.

6. TRANSMISIÓN VERTICAL, ABORTOS Y GENOTIPIFICACIÓN DE *T. GONDII*

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Muestras

Se analizaron un total de 54 fetos caprinos (que incluyeron abortos, natimortos y muertos perinatales), 35 placentas y 42 sueros de cabritos antes de ingerir calostro (sueros precalostrales) procesados en el Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP, durante los años 2013-2017. El material se obtuvo de los siguientes establecimientos:

Establecimiento 1 (E1): ubicado en la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires con producción principalmente láctea. Este establecimiento presentó un total de 50 cabras a lo largo del tiempo (hicieron recambio completo de sus animales), con cabras de raza Saanen y Anglo Nubian criadas bajo sistema de manejo semi-intensivo. De éste establecimiento se obtuvieron 18 fetos caprinos de 12 cabras (2 cabras con mellizos; 2 cabras en 2 gestaciones sucesivas y 1 cabra en 3 gestaciones sucesivas), 29 placentas (22 de partos normales y 7 de asociadas a fetos caprinos) y 34 sueros precalostrales.

Establecimiento2 (E2): ubicado en la Ciudad de La Plata con cabras Criollas, Enanas y Anglo Nubian con manejo intensivo (n= 45). Se obtuvieron 25 fetos de 18 cabras (1 cabra con trillizos, 4 con mellizos y una con abortos en 2 gestaciones sucesivas), 3 placentas (1 de parto normal y 2 asociadas a fetos caprinos) y 5 sueros precalostrales.

Establecimiento 3 (E3): Tambo caprino con manejo semi-intensivo ubicado en Arana (Partido de La Plata) con 25 cabras de raza Saanen. De este tambo se recolectaron 2 abortos y 3 sueros precalostrales.

Establecimiento 4: tambo ubicado en Mar del Plata con 30 cabras de raza Saanen y manejo semi-intensivo. De este establecimiento se obtuvo material de 1 feto.

Además se analizaron 7 fetos caprinos de pequeños productores con cabras Criollas de la región de Chamental de La Rioja (uno con placenta) y un feto caprino abortado con placenta de un establecimiento en Monte grande, provincia de Buenos Aires de los que no se registraron más datos ni se obtuvieron muestras de las madres.

La edad gestacional de los fetos fue calculada según la longitud del largo corona-base de la cola y el aspecto general externo (Kirkbride, 2012). Sólo en 45/54 de los casos se pudo determinar la edad: 2 fetos tenían entre 7 y 9 semanas de gestación (abortos tempranos), 1 entre 14 y 18 semanas de gestación (aborto de mediana gestación), 5 entre 19 y 21 semanas de gestación (abortos de gestación tardía), 24 cabritos a término que nacieron muertos (natimortos) y 13 que murieron al primero o segundo día de vida (muertos perinatales). La edad gestacional de 2 fetos no pudo ser calculada debido a que estaban momificados y de los 7 fetos restantes no se pudo obtener el dato de la edad.

Se realizó la necropsia de los fetos caprinos y se obtuvieron muestras de líquidos pleurales por aspiración con aguja de la cavidad torácica y/o de sangre

por punción cardíaca. Se tomaron muestras de sistema nervioso central, hígado, pulmón, corazón, bazo, lengua y diafragma (sin embargo, no todos los órganos pudieron ser recolectados en todos los casos). Los cerebros fetales fueron homogeneizados y se conservaron en tubos de 1,5 ml libres de DNAsas a -20°C para los análisis moleculares. El resto de los órganos fueron seccionados con bisturíes individuales para cada muestra y conservados como se menciona precedentemente. Además, se realizó un *pool* de órganos (homogenato) de cada feto conservándolo de igual manera. Se conservaron porciones de cada tejido/órgano en formol bufferado al 10 % mantenido a temperatura ambiente en tubos de 50 ml para eventual histopatología. En los fetos con grados leves de autólisis y descomposición se preparó un homogenato del sistema nervioso central con solución fisiológica estéril y antibióticos que se mantuvieron en recipientes estériles de 50 ml refrigerados entre 2-8°C para ser inoculados en ratones para el intento de aislamiento de *T. gondii*.

Las madres de todos los fetos caprinos fueron sangradas para determinar anticuerpos específicos por IFI al momento del aborto. Aquellas madres de fetos positivos a *T. gondii* volvieron a sangrarse a los 30 días para poder determinar si existió seroconversión de títulos.

De las 34 placentas caprinas recolectadas, 11 se obtuvieron de casos abortos y 23 de partos normales. Las placentas fueron examinadas en busca de lesiones macroscópicas y se realizó un homogenato con *mixer* (Philips) de cotiledones y regiones intercotiledonarias que fue conservado en tubo de 1,5 ml libres de DNAsas a -20°C para los estudios moleculares. Se conservaron muestras

de ambas zonas placentarias para histopatología como se indica en párrafos anteriores.

Se obtuvieron muestras de sangre por punción yugular de cabritos al parto (n= 42), antes de ingerir calostro y de sus madres.

Las muestras de sangre y los líquidos fetales fueron centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos y el suero o líquido fetal obtenido fue conservado refrigerado a 4-8 °C o congelado a -20 °C.

6.1.2. Estudios serológicos

Las muestras de suero y líquidos fetales se analizaron mediante la prueba de IFI para determinar la presencia de anticuerpos Ig G específicos para *T. gondii*. Los sueros precalostrales y los líquidos fetales fueron diluidos en PBS 1x en base doble a partir de la dilución 1:10 hasta título final (Anexo 3). Los sueros de animales adultos se diluyeron hasta título final a partir de la dilución 1:100 (Anexo 3).

6.1.3. Bioensayo de *T. gondii* en ratones

Los homogenatos de SNC de fetos con grados leves de autólisis y/o descomposición y que estaban en buenas condiciones de conservación (sin congelar), se inocularon por vía subcutánea en ratones GKO para interferón gamma. El homogenato se realizó en mortero estéril con el agregado de solución fisiológica y antibióticos (penicilina G potásica-estreptomicina). Se inocularon 2 ratones por cada muestra, para reducir la cantidad de animales inoculados según lo recomendado por el CICUAL (Comité Internacional del Cuidado y Uso de

Animales de Laboratorio). Los ratones se mantuvieron con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*. Los animales inoculados se observaron por 30 días y al final del período fueron sangrados (Anexo 12). Las muestras de sueros de los ratones fueron analizadas por la prueba de IFI (dilución 1:25) para la detección de anticuerpos específicos anti-*T. gondii* (Anexo 3). Ante la aparición de signos compatibles con toxoplasmosis o al confirmarse el resultado serológico, los animales fueron sacrificados en tubo de CO₂, se realizó la necropsia, se realizó la observación en fresco de cerebros en busca de quistes y de líquido peritoneal en busca de taquizoítos y los órganos fueron conservados para realizar análisis moleculares como se indicó anteriormente.

6.1.4. Diagnóstico y caracterización molecular de *T. gondii*

Los órganos fetales (*pools* y cerebros), las placentas caprinas y los tejidos de ratones inoculados fueron analizados por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para evidenciar la presencia de *T. gondii*. La extracción de ADN se realizó con un kit comercial (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, Promega, USA) acorde a las instrucciones del fabricante (Anexo 9). Con cada rutina de extracción se utilizó un microtubo conteniendo solo las soluciones del kit como control negativo de extracción.

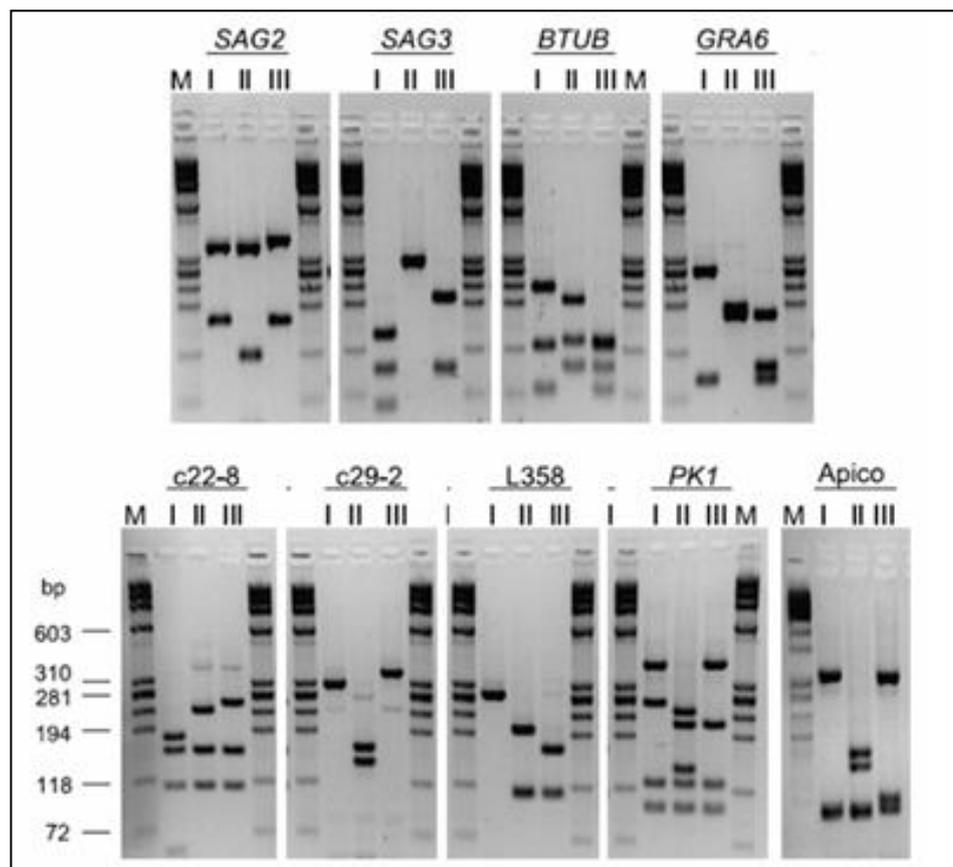
Se utilizaron los *primers* específicos TOX5-TOX8 que amplifican un fragmento de aproximadamente 450pb la secuencia repetitiva de 529pb de *T. gondii* como se describió previamente (Homan *et al.*, 2000; Moré *et al.*, 2010; Reischl *et al.*, 2003). Se agregó 1µl de ADN de cada muestra a los tubos que

contenían el *master mix* de PCR con 2,5 µl de 10x PCR buffer, 0,75 mM MgCl₂, 250 µM de dNTPs, 1 U *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, Brasil) 0,5 µM de cada primer y agua ultrapura para un volumen final de reacción de 25 µl. Para la amplificación se utilizó un termociclador (T18, IVEMA, Argentina) con un programa de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 60 s), alineamiento (59°C, 60 s) y extensión (72°C, 60 s), y un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Se utilizó ADN de taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* como control positivo, el control negativo de extracción y una muestra solo con *mastermix* o NTC (*no template control*) como controles de cada rutina de amplificación. La extracción de ADN, la preparación del *master mix* para PCR y la electroforesis de los amplificados se realizaron en ambientes separados con distinto instrumental para evitar la contaminación cruzada. Los productos amplificados fueron revelados en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen, USA), luego de una electroforesis de 30 minutos a 120 voltios. Se utilizó un marcador de pares de bases de 100bp (Ladder cada 100bp, 100-1000, Biodynamics, Argentina). Los productos fueron observados con transiluminador de luz azul (Safe Imager™, Invitrogen, USA) (Anexo 10).

Las muestras de tejidos que fueron positivas por PCR a *T. gondii* fueron sometidas a genotipificación por PCR anidada (*nested-PCR*) seguida por cortes con enzimas de restricción (RFLP) utilizando los marcadores moleculares nSAG 2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, PK1 y Apico de *T. gondii* procediendo acorde trabajos previos (Moré *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2006) (Figura 11). Como

controles de referencia se utilizó ADN extraído de taquizoítos de las cepas de referencia RH, ME49 y NED para los genotipos I, II y III, respectivamente (Anexo 11). Los productos amplificados se visualizaron luego de realizar la electroforesis en geles de agarosa al 2,5 % para todos los marcadores excepto para Apico que se utilizaron geles de agarosa al 3 %, teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Oregon, USA) y utilizado un marcador de pares de bases de 100bp (Ladder cada 100bp, 100-1000, Biodynamics, Argentina) (Anexo 10).

Figura 11. Marcadores utilizados como referencia para la caracterización molecular de de *T. gondii* (Su et al., 2006).



6.1.5. Tasas de transmisión vertical

La tasa de transmisión vertical de *T. gondii* fue determinada en aquellos establecimientos con mayor número de muestras y donde la seroprevalencia fue alta (E1 y E2). La misma fue determinada de 2 modos: -número de cabras en cuyos fetos se detectó *T. gondii* sobre el total de cabras con muestras de fetos caprinos x 100 y -el porcentaje de sueros precalostrales positivos a la IFI de *T. gondii* de cada establecimiento.

6.1.6. Diagnóstico diferencial de *N. caninum*

Como estudios complementarios, se realizó el diagnóstico diferencial de *N. caninum*. Los líquidos fetales, sueros precalostrales y sueros maternos fueron analizados para determinar anticuerpos anti-Ig G para *N. caninum* por IFI de acuerdo a lo descrito previamente (Unzaga *et al.*, 2014) (Anexo 3). Las muestras de ADN de las placentas y tejidos fetales fueron analizadas mediante PCR convencional utilizando los *primers* específicos Np6+ y Np21+ procediendo como se describe previamente (Moré *et al.*, 2008). Como controles se utilizó ADN de taquizoítos de la cepa NC-1 como control positivo, y el control de extracción y el NTC como controles negativos.

6.2. Resultados

Los establecimientos analizados presentaron la siguientes seroprevalencias de anticuerpos para *T. gondii*: E1: 100 %; E2: 76 %; E3: 20 % y E4: 20 %.

Del total de fetos analizados se obtuvieron 53 muestras de SNC, 52 *pools* de órganos y 44 líquidos pleurales/cardíacos. En uno de los fetos no se pudo analizar el cerebro y en 2 de ellos los órganos, debido a que se encontraban parcialmente consumidos por predadores. Los líquidos fetales no se obtuvieron en 7 fetos debido a que en 5 de ellos sólo se obtuvieron órganos y 2 estaban momificados. Además, 3 muestras de líquidos se descartaron debido a que eran de cabritos muertos los primeros días luego del nacimiento y ya habían calostrado.

El 13 % (7/54) de los fetos analizados fueron positivos a *T. gondii* por métodos diagnósticos directos o indirectos. En 1 de 44 (2,27 %) de los líquidos fetales se encontraron anticuerpos para *T. gondii* por IFI (título 20480). Mediante PCR se detectó *T. gondii* en el 13,2 % (7/53) de los SNC y en el 9,6 % (5/52) de los *pools* de órganos (Figuras 12 y 13). De los 7 fetos positivos 2 fueron abortos tardíos, 3 fueron natimortos y 2 murieron el primer día de vida. Ninguno de los fetos presentaba lesiones macroscópicas a la necropsia.

A continuación se detallan los hallazgos de los 7 fetos positivos (fetos 1 a 7) de 4 cabras:

Los fetos 1, 2 y 3 eran trillizos y fueron remitidos desde E2. Uno era un natimorto (feto 1) y los otros dos muertos perinatales (fetos 2 y 3). Los tres fueron seronegativos para *T. gondii*, mientras que se encontró ADN de *T. gondii* en SNC, *pools* de órganos y pulmones de los tres y en corazón e hígado de uno sólo de ellos (feto 2). La caracterización molecular se realizó a partir del SNC del feto 2 y también se obtuvieron resultados para algunos marcadores moleculares

a partir del SNC del feto 1 y pulmones de los fetos 2 y 3. Los cerebros de los animales no se inocularon en ratones porque fueron enviados congelados. La madre presentó un título de 3200 para *T. gondii* al momento del parto y volvió a presentar el mismo título un mes después. Los estudios de histopatología fueron realizados en INTA BALCARCE, y se informó que los fetos presentaron neumonía y miocarditis no supurativas generalizadas leves, con infiltrados inflamatorio linfocitocítico también en hígado, mientras que los cerebros no presentaron lesiones (Figura 14 A y B).

El feto 4, natimorto proveniente del E2, resultó negativo a la serología fetal y fue positivo por PCR para *T. gondii* en el cerebro, siendo el resto de los órganos negativos. La madre que presentó un título de 200 al momento de abortar, no seroconvirtió en el segundo muestreo. Las muestras no se inocularon en ratones porque llegaron congeladas. No se realizó la histopatología de tejidos.

Los fetos 5 y 6, mellizos provenientes del E1, de entre 19 y 21 semanas de gestación resultaron: feto 5, título 20480 para *T. gondii* y positivo por PCR en todos sus órganos (cerebro, pulmón, hígado, corazón y bazo), feto 6, positivo por PCR cerebro (único órgano obtenido). En este caso, también se obtuvo la placenta que presentó lesiones macroscópicas cotiledonarias características de la infección por *T. gondii* (Figura 15). Para realizar la caracterización molecular por *nested* PCR-RFLP se utilizó el SNC del feto 6 y la placenta, ya que fueron los órganos que evidenciaron mayor cantidad de ADN por PCR. Se pudo realizar la caracterización molecular completa sólo en la placenta. Los SNC de ambos fetos fueron inoculados en ratones siendo negativo el aislamiento del protozoo. Por

histopatología el feto 5 presentó neumonía intersticial no supurativa multifocal, hepatitis periportal mononuclear leve e infiltrado mononuclear intersticial multifocal en corazón (Figura 14 C y D). Se detectó placentitis no supurativa difusa moderada y necrosis en las vellosidades placentarias (Figura 16). La madre tuvo un título de 25600 para *T. gondii* al momento del parto, y no seroconvirtió al mes.

El feto 7, natimorto del E1, dio negativo a la serología de líquido pleural y positivo por la prueba de PCR, encontrándose ADN de *T. gondii* en cerebro, pulmón, corazón y lengua. La placenta fue positiva por PCR. Se pudo genotipificar parcialmente la muestra de cerebro. El material no se inoculó debido a que la serología fetal fue negativa y por el estado avanzado de autólisis del feto. La madre presentó un título de 200 al parto y no seroconvirtió al mes. En la histopatología se observó neumonía intersticial no supurativa generalizada moderada y hepatitis periportal mononuclear leve; la placenta presentó congestión generalizada.

Los resultados de los distintos diagnósticos de los 7 casos caprinos positivos a *T. gondii* se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Fetos positivos a *T. gondii* por las distintas técnicas de diagnóstico.

ID	Edad	IFI liq. fetal	PCR	Órganos PCR +	Título IFI madre	Genot.
Feto 1 ^a	natimorto	NEG	POS	SNC/pulmón	1º:3200; 2º:3200	Si *
Feto 2 ^a	perinatal	NEG	POS	SNC/pulmón/corazón/hígado		Si
Feto 3 ^a	perinatal	NEG	POS	SNC/pulmón		Si*
Feto 4	natimorto	NEG	POS	SNC	1º: 200; 2º: 200	Si*
Feto 5 ^b	tardío	POS (20480)	POS	SNC/pulmón/ hígado/corazón	1º:25600; 2º:25600	No
Feto 6 ^b	tardío	ND	POS	SNC		Si*
Feto 7	natimorto	NEG	POS	SNC/pulmón/corazón/lengua	1º: 200; 2º:200	Si*

ID: identificación. Genot.: genotipificación NEG: negativo POS: positivo ND: no disponible. SNC: sistema nervioso central. No: no determinado por escasa cantidad de ADN. ^a= trillizos. ^b= mellizos. *= genotipificación parcial, por detalles ver tabla 17.

El 17,6 % (6/34) de las placentas analizadas presentaron ADN de *T. gondii*.

De ellas, 3 se obtuvieron desde abortos: 2 de fetos positivos a *T. gondii* (placenta 1= feto 7 y placenta 2= fetos 5 y 6) y la otra de un feto que fue negativo a *T. gondii* (placenta 3). La placenta 2 presentó focos blanquecinos calcificados en los cotiledones (Figura 15). Las otras 3 placentas positivas se obtuvieron de partos normales (placentas 4, 5 y 6). Los resultados de los diferentes diagnósticos de *T. gondii* en las placentas antes mencionadas se detallan en la tabla 16.

Tabla 16. Placentas positivas a *T. gondii* por PCR.

ID	Lesiones macrosc.	aborto/parto normal	Título de madre	Genotipificación
Placenta 1	NO	aborto	200	No ^a
Placenta 2	SI	aborto	25600	Sí
Placenta 3	NO	aborto	200	Si*
Placenta 4	NO	parto normal	100	No
Placenta 5	NO	parto normal	100	Sí *
Placenta 6	NO	parto normal	100	No

ID= identificación. ^a= se genotipificó parcialmente desde tejidos fetales. *= genotipificación parcial, por detalles ver tabla 17.

Figura 12. Resultados para PCR de distintos órganos fetales.

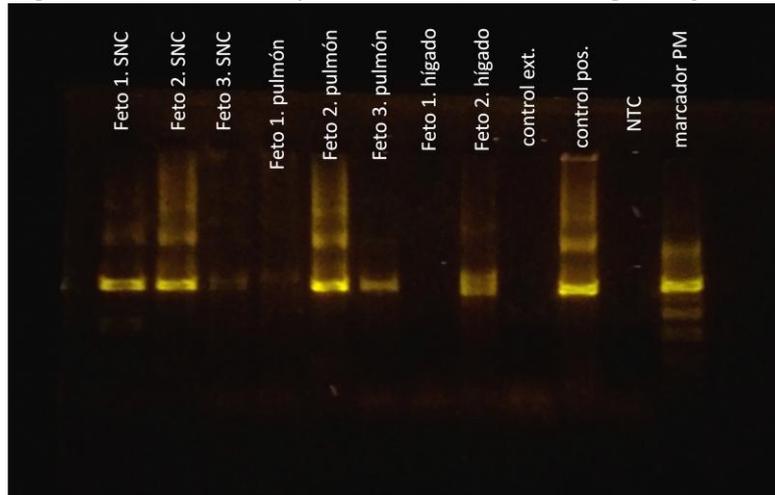


Figura 13. Resultados para PCR de distintos órganos fetales.

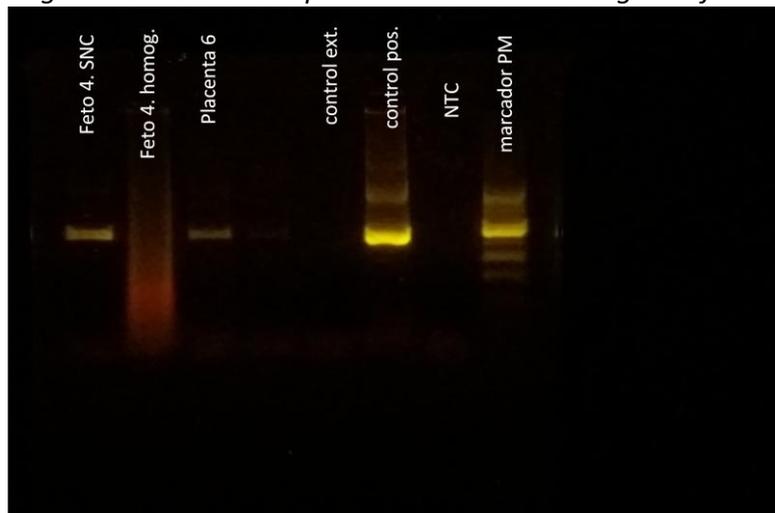
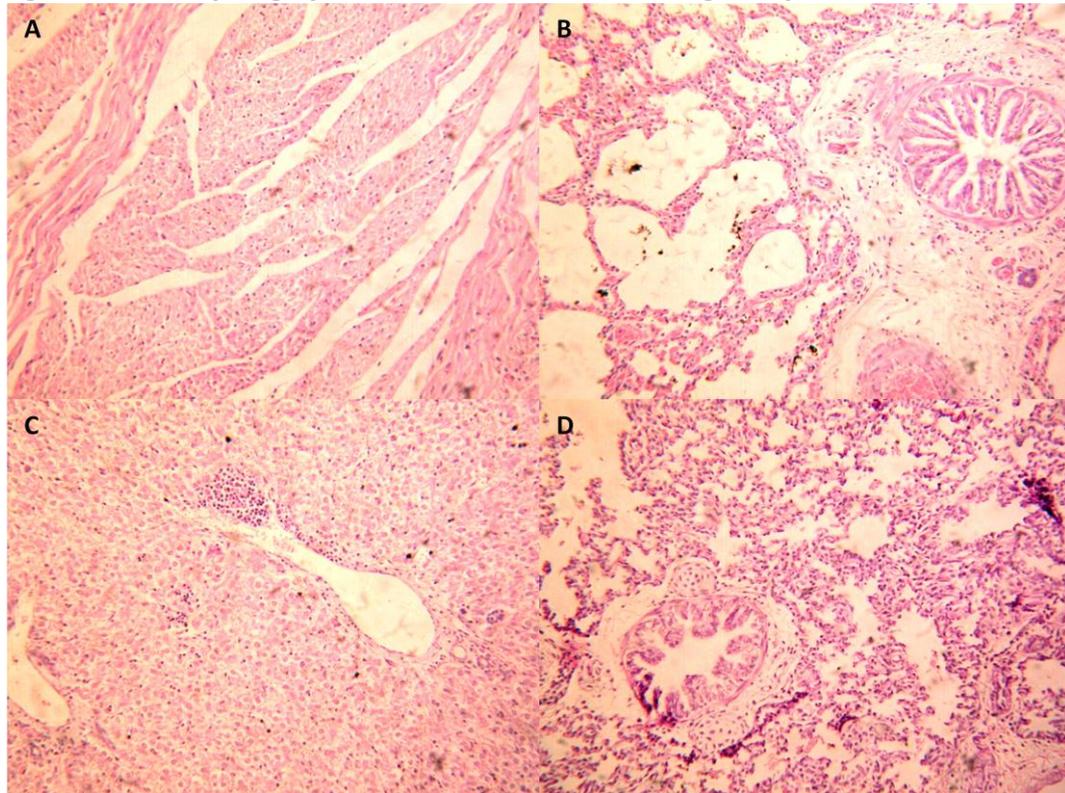


Figura 14. Microfotografías de lesiones en distintos órganos fetales.



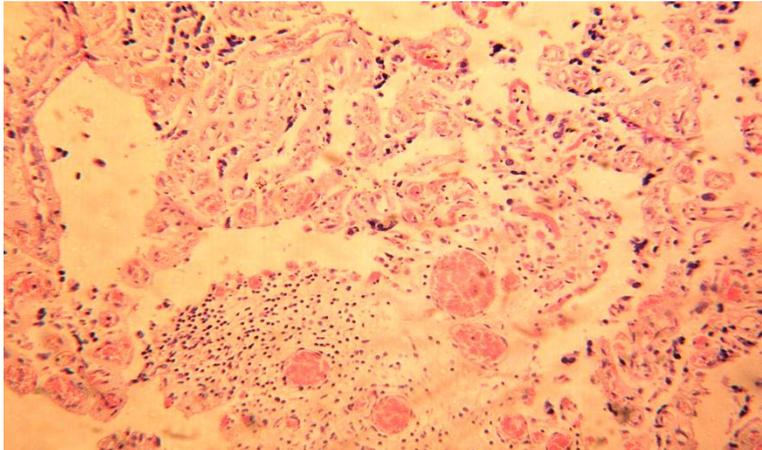
Feto 2: A. miocarditis no supurativa difusa. B. neumonía no supurativa.
Feto 5: C.hepatitis periportal mononuclear. D. neumonía no supurativa (H/E, X10).

Figura 15. Imagen macroscópica de placenta 2.



Las flechas indican las lesiones calcificadas en un cotiledón placentario.

Figura 16. Microfotografía de placenta 2.



Placentitis no supurativa difusa (H/E 10X).

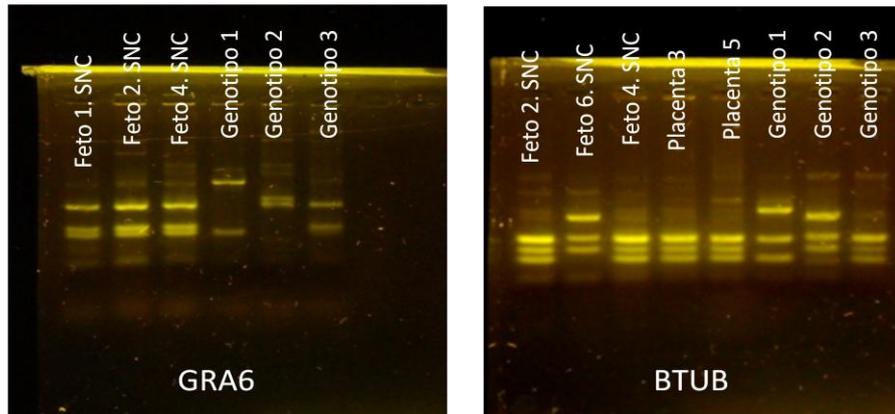
Los resultados resumidos de las muestras genotipificadas por la técnica de *nested* PCR-RFLP de 9 marcadores se detallan en la tabla 17. Tres de las placentas positivas por PCR (1, 4 y 6) fueron negativas para los marcadores utilizados (Figura 17).

Tabla 17. Genotipificación por *nPCR-RFLP* de las muestras positivas por PCR a *T. gondii*.

Muestras	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	L358	C22-8	C29-2	PK1	APICO
SNC Feto 1	-	-	-		-	-	-	-	-
SNC Feto 2									
Pulmón Feto 2	-	-	-	-	-	-		-	-
Pulmón Feto 3	-	-	-	-	-	-		-	-
SNC Feto 4					-	-	-	-	-
SNC Feto 6	-				-				
SNC Feto 7	-	-	-	-	-			-	-
Placenta 2 (fetos 5 y 6)									
Placenta 3					-	-	-	-	-
Placenta 5	-	-			-	-		-	-

(-)= no determinado

Figura 17. Genotipificación por nested-PCR RFLP para los marcadores GRA6 y BTUB.



No se realizó el aislamiento de *T. gondii* a partir de las muestras inoculadas de 11 de los fetos caprinos. Ninguno de los ratones inoculados presentó signos, no se observaron taquizoítos en los lavados peritoneales ni quistes en los exámenes en fresco de sus cerebros. La serología fue negativa para *T. gondii*. Las muestras de cerebro y órganos de los ratones fueron negativas por PCR.

Los 42 sueros precalostrales evaluados fueron negativos a la prueba de IFI para *T. gondii*. El 85,7 % (36/42) de los cabritos muestreados eran nacidos de madres seropositivas (7 a títulos 100-200 y 29 a título ≥ 800). Además, uno de los cabritos de madres seropositivas era mellizo de un natimorto que también resultó negativo para *T. gondii* por serología y PCR.

En los establecimientos donde se encontraron seroprevalencias altas (E1 y E2) se detectaron casos de abortos asociados a la infección con *T. gondii*. En E1 3/18 y en E2 4/25 fetos abortados fueron positivos a *T. gondii* por PCR en tejidos

y presentaron lesiones histopatológicas compatibles por infecciones con protozoos.

En estos establecimientos no se pudieron detectar tasas de transmisión vertical a través de los sueros precalostrales. La tasa de transmisión vertical de *T. gondii* estimada por la presencia de abortos por establecimiento fue del 16,6 % (2/12) en el E1 y del 11,1 % (2/18) en el E2. En el E1 una cabra tuvo mellizos abortados positivos (fetos 5 y 6) y en el E2 una cabra tuvo trillizos que resultaron todos positivos (Feto 1 a 3). El valor estimado de transmisión vertical basada en la presencia del protozoo en tejidos fetales, en ambos establecimientos, fue del 13,3% (4/30).

De los 54 fetos analizados, dos de ellos resultaron positivos para *N. caninum*. Uno de los fetos positivos a *N. caninum* (Del E1 con seroprevalencia del 20 %) era un natimorto y fue positivo por IFI (título 640, negativo a *T. gondii*) y por PCR en el SNC y corazón. La madre presentó anticuerpos para *N. caninum* con un título de 25600 y de 1600 para *T. gondii* al momento del aborto; al mes no se observó seroconversión. El otro feto (del E2 con seroprevalencia del 7 %) fue un aborto de 7 a 9 semanas de edad pero en este caso el líquido pleural resultó negativo a la serología para ambos parásitos, mientras que sus órganos: hígado, corazón y lengua resultaron positivos por PCR sólo para *N. caninum*. Su SNC no pudo ser analizado debido a que la cabeza había sido consumida por predadores. La madre fue seropositiva para *N. caninum* a título 3200 y a *T. gondii* con título 400. Los SNC de ambos fetos se inoculador en ratones fueron negativos para el aislamiento. Además una placenta obtenida de un parto normal

del E1 presentó ADN de *N. caninum* por la técnica de PCR. A la histopatología presentó una placentitis no supurativa leve, con infiltrado inflamatorio mononuclear multifocal.

6.3. Discusión

La toxoplasmosis es considerada una de las causas de aborto más importantes en pequeños rumiantes (Dubey, 2010). En nuestro estudio la infección por *T. gondii* fue confirmada en el 13 % de los fetos analizados. En todos ellos se detectó ADN de este parásito en sus tejidos por PCR, principalmente en SNC y pulmón, y sólo uno presentó anticuerpos contra *T. gondii* en los líquidos fetales. Estos resultados son similares a los encontrados en Italia donde también se determinó que el 13 % de los fetos caprinos y el 18,1 % de los fetos ovinos analizados fueron positivos a *T. gondii* por la técnica de PCR (Masala *et al.*, 2007). En España, Pereira-Bueno *et al.* (2004) encontraron 1 feto caprino positivo de 7 analizados solo por PCR, mientras que diagnosticaron infección por *T. gondii* en el 23 % de los fetos ovinos por alguna de las técnicas utilizadas (serología fetal, histopatología y PCR). Moreno *et al.* (2012) encontraron lesiones histopatológicas compatibles con infecciones por protozoarios en el 23 % y ADN de *T. gondii* en el 3,8 % de los 26 fetos caprinos de distintas regiones de ese mismo país.

En los trabajos donde se estudiaron varios agentes infecciosos asociados a abortos caprinos en otros países, se hallaron valores de infección de fetos del 15 al 17% (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002; van Engelen *et al.*, 2014) los que

coinciden con nuestros hallazgos. Por el contrario Moeller *et al.*, (2001) y van den Brom *et al.*, (2012) encontraron valores de infección en fetos menores al 6 %.

En otros países se ha relacionado a *T. gondii* con brotes de abortos, principalmente en establecimientos con manejo semi-intensivo realizando el diagnóstico por serología, PCR, aislamiento y/o detección de lesiones microscópicas (Ahmed *et al.*, 2008; Caldeira *et al.*, 2011; Pescador *et al.*, 2007; Silva Filho *et al.*, 2008). Durante el período de desarrollo de esta tesis no se observó este tipo de problemática.

En Argentina un estudio previo había determinado que el 36 % de los fetos analizados habían sido positivos para *T. gondii* por diferentes métodos de diagnóstico. La mayoría de los fetos presentaban anticuerpos específicos en sus líquidos pleurales (Unzaga *et al.*, 2014). Estos resultados difieren de los obtenidos actualmente, posiblemente por la diversidad del origen de las muestras analizadas en ese estudio y a que provenían de establecimientos que habían presentado brotes de abortos (Rossanigo *et al.*, 2002; Venturini *et al.*, 2000).

Las diferencias de prevalencia de infecciones fetales por *T. gondii* descritas en la bibliografía pueden deberse a los distintos métodos de diagnóstico utilizados. En un estudio donde se analizaron 173 fetos ovinos por distintas técnicas diagnósticas, se determinó que la mayoría de los fetos positivos se diagnosticaron por métodos serológicos (28,3 %) en relación a los estudios histopatológicos (8,7 %) y a la técnica de PCR (6,9 %) (Pereira-Bueno *et al.*, 2004). Tanto en este último trabajo como en el de Unzaga *et al.* (2014), se recalca la

importancia de la serología fetal en el diagnóstico del aborto en cabras, ya sea a partir de líquidos pleurales o de sangre de corazón, para detectar indirectamente la infección por *T. gondii*, considerando que los anticuerpos maternos no atraviesan la placenta en los pequeños rumiantes, por lo que la presencia de anticuerpos en los fetos indicaría infección transplacentaria (Dubey, 2010; Munday y Mason, 1979). Las pruebas serológicas que han sido utilizadas para detectar anticuerpos específicos en líquidos fetales han sido las pruebas de MAT, IFI y ELISA (Dubey, 2010). En nuestro estudio utilizamos la prueba de IFI para el diagnóstico fetal debido a que es la prueba que se realiza de rutina para casos individuales. El único feto que presentó anticuerpos específicos fue un aborto de más de 130 días de gestación (feto 5) y presentó un título alto (título 20480). Es importante determinar la edad gestacional para interpretar el diagnóstico serológico, debido a que se considera que los fetos caprinos son inmunocompetentes desde los 50 días de gestación (Duncanson *et al.*, 2001; Tizard, 2009). En este trabajo, el 92,6 % de los fetos analizados; tenía una edad gestacional mayor a los 60 días, por lo tanto, se consideraron inmunocompetentes. A pesar que realizamos la serología en diluciones de suero o líquidos fetales bajas (a partir de 1:10) como ha sido recomendado por otros autores (Pereira-Bueno *et al.* 2004; Unzaga *et al.* 2014), la mayoría de los fetos de este estudio resultaron seronegativos y sin embargo, en 7 se detectó ADN de *T. gondii* en tejidos. La explicación para ello, podría ser que estos animales habrían tenido una infección aguda, con niveles de Ig G aún no detectables o bien con Ig M, no detectada con el conjugado utilizado en la prueba de IFI (anti-Ig

G). En estos casos la infección tendría que haber ocurrido en el último tercio de la gestación, momento que se relaciona con el nacimiento de cabritos infectados, más que con abortos (Dubey, 2010). Por otro lado, en el único caso que se encontró un elevado título de anticuerpos, también se observaron lesiones calcificadas en los cotiledones, lo que indicaría una infección con un mayor tiempo de evolución. Por lo tanto, consideramos que para evitar la subestimación de la infección real en abortos por *T. gondii* sería importante realizar también una prueba de diagnóstico directo que confirme la infección como el aislamiento o PCR.

El aislamiento de este parásito a partir de muestras de abortos permite confirmar la infección, sin embargo, para que sea posible se requiere que los tejidos se encuentren en buen estado de conservación y que presenten un número apropiado de parásito vivos capaces de multiplicarse (de Oliveira *et al.*, 2018; Dubey, 2010; Unzaga *et al.*, 2014). La detección de los abortos y recolección de material son limitantes para el diagnóstico, porque la mayoría de las veces las muestras no son frescas y presentan grados variables de autólisis y contaminación ambiental. Sumado a estos factores, las condiciones de transporte y conservación (refrigeración-congelación) pueden condicionar el éxito del diagnóstico de laboratorio (Engeland *et al.*, 1998). En este trabajo se inocularon para aislamiento 11 de los fetos recibidos (2 de ellos con tejidos positivos por PCR), dado a que el resto no reunía las condiciones para su procesamiento, sin embargo, el aislamiento resultó negativo en todos los casos. Este resultado, con material proveniente de los fetos positivos por PCR (Fetos 5 y

6), consideramos que se debe a una baja viabilidad de los protozoos en tejidos. Sobre la base de nuestros resultados, el aislamiento a partir de material de abortos tuvo una menor sensibilidad que las técnicas de diagnóstico molecular. Por eso, las técnicas de PCR, serían una herramienta útil para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita, permitiendo obtener resultados en forma más rápida que los aislamientos y permitirían la posibilidad del diagnóstico en los casos de fetos en estado avanzado de autólisis (Abu-Dalbouh *et al.*, 2012; Caldeira *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2018; Duncanson *et al.*, 2001; Hurtado *et al.* 2001, Masala *et al.*, 2003; Pescador *et al.*, 2007; Silva Filho *et al.*, 2008).

En relación a las muestras de tejido más adecuadas para el diagnóstico por PCR, Masala *et al.* (2003) encontraron que 6,4 % de los tejidos de 88 fetos caprinos analizados en Italia fueron positivos por PCR, siendo la placenta y el cerebro los tejidos con mayor frecuencia de detección. En nuestro trabajo se encontró ADN de *T. gondii* en todos los cerebros de los fetos positivos (7), indicando que las muestras de este órgano serían las ideales. Del total de las placentas procesadas en el presente estudio, el 17,6 % resultó positivo por PCR. Otros estudios que analizaron placentas de caprinos detectaron resultados similares aunque utilizaron menor número de muestras (Masala *et al.*, 2007; Unzaga *et al.*, 2014). De las 6 placentas positivas, 2 fueron de casos de abortos con tejidos fetales positivos a *T. gondii*, 3 fueron de partos normales con sueros precalostrales negativos por IFI, y una fue de un aborto donde los tejidos fetales no evidenciaron la infección con *T. gondii*. Una de las placetas proveniente de aborto (placenta 2) presentó calcificaciones en cotiledones, los fetos fueron

positivos por PCR y uno de ellos también por serología. La madre presentó un título de IFI muy elevado. Este sería un caso de aborto “típico” de la toxoplasmosis caprina, que está frecuentemente asociada a necrosis y calcificación de los cotiledones fetales, que se visualizan en la inspección macroscópica como áreas blanco-amarillentas con áreas intercotiledonarias normales (Buxton y Losson, 2007; Dubey, 2010; Unzaga *et al.*, 2014; van dem Brom *et al.*, 2012). En base a estos resultados, podemos sugerir que la presencia del protozoo en las placentas no siempre se asocia a infección fetal, aunque es útil como muestra complementaria en el diagnóstico de abortos, debido a que muchas veces presenta mayor carga parasitaria (Masala *et al.*, 2003; van dem Brom *et al.*, 2012). Duncanson *et al.* (2001) encontraron *T. gondii* por PCR en el 42 % de las placentas en partos normales de ovinos, demostrando que la presencia del parásito no siempre resulta en la muerte de las crías.

La histopatología es otra técnica diagnóstica recomendada para evidenciar abortos asociados a la infección por protozoos en pequeños rumiantes (Ahmed *et al.*, 2008; Chanton-Greutmann *et al.*, 2002; Pereira-Bueno *et al.* 2004; van den Brom *et al.*, 2012; van Engelen *et al.*, 2014), aunque a veces es necesario complementar los hallazgos con técnicas de PCR o inmunohistoquímica para realizar el diagnóstico diferencial con otros protozoos que producen lesiones similares (Caldeira *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012). Las lesiones más frecuentemente encontradas en los fetos abortados y en los natimortos son hepatitis necrótica multifocal, miocarditis, neumonía intersticial y encefalitis no supurativa, lo que concuerda con la distribución de *T. gondii* en los

tejidos luego de la transmisión transplacentaria (Caldeira *et al.*, 2011; Duncanson *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 1980; Dubey, 1981a, Munday y Mason, 1979; Nurse y Lenghaus, 1986; Pereira-Bueno *et al.* 2004; Pescador *et al.*, 2007). En los fetos positivos de este estudio, no se encontraron lesiones consistentes en los cerebros, aunque sí se describieron lesiones en pulmón, corazón e hígado. Las muestras de cerebros de estos casos tenían importante grado de autólisis, lo que puede haber condicionado el resultado de la observación microscópica. De las 2 placentas de fetos caprinos positivos donde se realizaron estudios histopatológicos, se encontraron lesiones con infiltrado inflamatorio mononuclear multifocal y necrosis en cotiledones en una (placenta 2), lo que concuerda con las lesiones macroscópicas observadas en la misma y con casos “típicos” de toxoplasmosis (Dubey, 1981c; Pereira-Bueno *et al.*, 2004; van den Brome *et al.*, 2012), mientras que en la otra sólo se encontró congestión generalizada.

Las madres de los cabritos abortados con tejidos positivos a *T. gondii* presentaron títulos a *T. gondii* (≥ 200), pero ninguna presentó seroconversión al mes del aborto. La seroconversión de muestras pareadas provenientes de las hembras que abortaron se recomienda para evaluar la evolución de la infección y diferenciar infecciones agudas y crónicas, sin embargo, no siempre puede ser determinada (Borde *et al.*, 2006; Ortega-Mora *et al.*, 2007). En este estudio la transmisión de la infección a los fetos no se relacionó con seroconversión, lo que podría indicar que cabras con re-infecciones o reactivaciones no siempre evidenciarían cambios importantes en los niveles de anticuerpos circulantes.

Sería importante procesar un mayor número de muestras para confirmar esta hipótesis, sin embargo, y como se menciona en el capítulo de seroprevalencia, la seroconversión en caprinos pareciera ser poco frecuente en el período recomendado para la toma de muestras pareadas. Borde *et al.* (2006) tampoco observaron cambios en los títulos de la mayoría de las cabras que abortaron (79%) y en las no abortadas (54,5%) en un rebaño de Tobago, indicando que 1 mes entre muestreos sería poco tiempo para detectar seroconversión. Estos autores consideran que la evidencia de la participación de *T. gondii* como agente causal de los abortos se puede inferir comparando los títulos de anticuerpos de las hembras que abortaron con las que no abortaron (Borde *et al.*, 2006). Algunos trabajos sugieren que la ocurrencia de abortos epidémicos, asociados a títulos de anticuerpos para *T. gondii* ≥ 1024 , podrían ser un indicador de que este parásito es el agente causal (Caldeira *et al.*, 2011; Pescador *et al.*, 2007; Silva Filho *et al.*, 2008). En nuestro estudio no pudimos detectar una clara asociación entre el título de anticuerpos y las pérdidas reproductivas, debido a que fueron analizados un número relativamente bajo de casos confirmados y a que cabras sin pérdidas reproductivas presentaron títulos ≥ 800 . Además, aunque la serología de las madres contribuye en el diagnóstico de las pérdidas reproductivas, se ha observado que los títulos altos de anticuerpos para *T. gondii* en cabras pueden mantenerse durante largo tiempo, independientemente de la presencia de signos (Dubey, 1981a). Por eso sería importante desarrollar pruebas inmunoserológicas que permitan determinar el grado de avidéz de las inmunoglobulinas, para poder estimar con mayor precisión el momento de

infección y así mejorar el diagnóstico del aborto y transmisión vertical (Sager *et al.*, 2003).

Pocos estudios evaluaron la transmisión congénita de *T. gondii* en pequeños rumiantes, y menos aún utilizando muestras de sueros precalostrales (Dubey, 1981a; Dubey, 1981b, Dubey, 1982; Dubey, 1988; Dubey *et al.*, 1985; Dubey *et al.*, 1986; Hide *et al.*, 2009; Misurová *et al.*, 2009; Rodger *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2005). Estas muestras son difíciles de obtener y requieren que personal entrenado estén monitoreando los partos para asegurar su recolección antes de la ingesta de calostro. Todos los sueros precalostrales procesados en el marco de esta tesis fueron negativos por IFI, a pesar que el 85,7 % de los cabritos sangrados eran hijos de cabras seropositivas (la mayoría con títulos ≥ 800), por lo que no se pudo confirmar la transmisión vertical. Otro estudio en Bangladesh también determinó que la infección transplacentaria no es frecuente en cabras al estudiar 11 cabritos (sangrados antes de tomar calostro) de madres seropositivas para *T. gondii* (Rahman *et al.*, 2015). Posiblemente, la transmisión vertical ocurre en menor escala que lo sugerido en estudios previos (Dubey, 2010). Duncanson *et al.* (2001) evaluaron la transmisión congénita en un establecimiento de ovinos y determinaron una tasa del 61 %, al encontrar ADN del parásito en el 94 % de los fetos y en el 42 % de las placentas estudiadas. Sin embargo, no pudieron confirmar si las placentas positivas se correlacionaron con la infección fetal, ya que no evaluaron los sueros precalostrales.

En nuestro estudio, al encontrar fetos positivos por técnicas moleculares pudimos confirmar que la transmisión transplacentaria de *T. gondii* ocurrió en el

13,3 % de las cabras con pérdidas reproductivas de 2 establecimientos de la provincia de Buenos Aires con altas seroprevalencias. A diferencia de lo planteado al inicio de este estudio, no se detectaron cabritos infectados verticalmente asintomáticos, sino que todos los casos con evidencia de infección vertical de *T. gondii* fueron abortos, muertes neonatales o perinatales. Posiblemente, las variables genotípicas de los protozoos circulantes en Argentina sean más virulentas que las de países Europeos y de Norteamérica, generando infecciones incompatibles con la sobrevivencia fetal. En un estudio de infección experimental con una cepa virulenta de *T. gondii* (GT1) detectaron abortos en 11 cabras y solo 2 tuvieron cabritos infectados asintomáticos.

La caracterización molecular de *T. gondii* en este trabajo se realizó por la técnica de *nested* PCR seguida con cortes con enzimas de restricción (RFLP-PCR) que ha sido ampliamente utilizada para estudiar la población genética de este parásito (Howe and Sibley, 1995; Khan *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2006). En un principio, a través de esta técnica y utilizando cinco marcadores genéticos, Howe y Sibley (1995) analizaron 106 cepas de una variedad de hospedadores en América del Norte y en Europa, determinando tres linajes clonales de *T. gondii* (tipos I, II y III), concluyendo que predominaba el tipo II y que la diversidad de la población de *T. gondii* era limitada en determinadas regiones. Más tarde, diferentes estudios de genotipificación sobre aislamientos *T. gondii* en América del Sur revelaron una mayor variabilidad genética (Ajzenberg *et al.*, 2004; Dubey y Su, 2009; Lehmann *et al.*, 2006). En Brasil se analizaron 125 aislamientos de pollos, perros y gatos utilizando 10 marcadores

genéticos, encontrándose 48 diferentes genotipos siendo la mayoría distintas a las cepas "clonales" y no se encontraron cepas tipo II (Pena *et al.*, 2008).

La mayoría de los trabajos de genotipificación de *T. gondii* en caprinos se realizaron a partir de tejidos de animales destinados al consumo humano, determinándose también que los genotipos más frecuentes son de tipo II y III en Europa, Estados Unidos y África (Dubey *et al.*, 2011; Gebremehin *et al.*, 2014a, Paştiu *et al.*, 2015). En Japón se caracterizaron 13 aislamientos con el marcador GRA6 desde músculos cefálicos de cabras, predominando los tipo I y II y en menor medida el tipo III (Kyan *et al.*, 2012) y en India se obtuvo un aislamiento de cabra caracterizado como tipo III con el marcador SAG3 (Satbidge *et al.*, 2017). En el suroeste de China también se encontró limitada diversidad genética de *T. gondii* en tejidos de cabras de matadero, con una mayor frecuencia del genotipo I (Miao *et al.*, 2015). Por otro lado, en Brasil se demostró que predominan los genotipos atípicos en tejidos de cabras destinadas al consumo (Cavalcante *et al.*, 2007; Clementino Andrade *et al.*, 2013; Ragozo *et al.*, 2010; Rêgo *et al.*, 2017). Sin embargo es escasa la información que existe de los genotipos de *T. gondii* involucrados en casos de abortos en cabras infectadas naturalmente en el mundo (de Oliveira *et al.*, 2018; Silva Filho *et al.*, 2008; Unzaga *et al.*, 2014).

En el presente estudio se analizaron muestras de ADN de tejidos de 6 fetos y 3 placentas que resultaron positivas a *T. gondii* por PCR. Se obtuvieron genotipificaciones completas en tejidos de 2 de los casos de abortos (SNC de feto 2 y placenta 2), mientras que en el resto de las muestras se obtuvieron

genotipificaciones parciales. Esto podría deberse a una baja carga parasitaria en los tejidos, dado que se requieren altas concentraciones de ADN para lograr resultados satisfactorios (Ajzenberg *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2006). En 2 muestras (SNC feto 4 y placenta 3) se obtuvo una genotipificación parcial con alelos tipo III para los marcadores SAG3, nSAG2, BTUB y GRA6, lo que coincidiría con otros genotipos de *T. gondii* descritos en Argentina y en particular de la provincia de Buenos Aires (Bernstein *et al.*, 2018). Sin embargo, y como se ha expresado anteriormente, las comparaciones y definiciones genotípicas requieren genotipificaciones completas (Su *et al.*, 2006). El genotipo hallado en muestras de los fetos 1 a 3 (trillizos) fue atípico, con la mayoría de los marcadores tipo III, con excepción de C29-2 (tipo II), L358 y PK1 (ambos tipo I). En otras muestras de Sudamérica y Argentina, fueron frecuentes los genotipos con predominio de alelos tipo III, sin embargo, la combinación alélica de *T. gondii* en éste caprino no había sido reportada previamente (Bernstein *et al.*, 2018; Pena *et al.*, 2008) ni se encuentra identificada como haplotipo en la base de datos moleculares de *T. gondii* (ToxoDB; <http://toxodb.org/toxo/>). Un genotipo parecido fue descrito a partir de un aborto de cabra de Argentina, identificado como atípico con la mayoría de los marcadores con alelos tipo III, con excepción de BTUB (tipo II) y L358 (tipo I) y fue registrado en la ToxoDB como haplotipo #284 (Bernstein *et al.*, 2018; Unzaga *et al.*, 2014). Cavalcante *et al.* (2007) realizaron dos aislamientos atípicos con combinaciones alélicas I-III que presentaron diferente comportamiento biológico en modelo murino desde tejidos de cabras de Ceará, Brasil. Clementino Andrade *et al.* (2013) caracterizaron un aislamiento desde un

corazón caprino que también fue tipificado como atípico (III-I) y considerado virulento en modelo ratón. Ragozo *et al.* (2009) aislaron *T. gondii* de 12 de 26 tejidos positivos de cabras de Brasil, y 10 de ellos fueron virulentos para los ratones. Rêgo *et al.* (2017) lograron 9 aislamientos caracterizados como atípicos desde corazones de 198 cabras, siendo todos avirulentos y uno de virulencia intermedia. En otras regiones, también se encontraron genotipos atípicos aunque en menor proporción. Además en Estados Unidos, si bien 9 y 4 aislamientos de corazones de carnicerías de Maryland fueron clonales tipo II y tipo III respectivamente, el 55 % de los aislamientos presentaron genotipos atípicos (4 previamente reportados en otros animales y 5 genotipos nuevos), y demostraron que 2 genotipos atípicos hallados con alelos tipo I y tipo III en la mayoría de los marcadores fueron muy virulentos para los ratones (Dubey *et al.*, 2011). La mayor frecuencia de genotipos atípicos en América del Sur, se podría explicar en parte a una mayor tasa de recombinación genética en el intestino de los felinos (Herrmann *et al.*, 2012). Los genotipos atípicos presentan una virulencia diferente y generalmente mayor a los genotipos clonales II y III (Pena *et al.*, 2008). La importancia de las cepas atípicas está siendo estudiada en la actualidad, dado a que se han aislado de personas inmunocompetentes de distintos países, que presentaron signología grave, tanto en casos de toxoplasmosis adquirida (Demar *et al.*, 2012; De Salvador-Gullouët *et al.*, 2006) como en casos de toxoplasmosis congénita (Delhaes *et al.*, 2010; Elbez-Rubinstein *et al.*, 2009). También diversos genotipos atípicos han sido descritos por primera vez recientemente a partir de sangre de cordón y placenta de

mujeres seropositivas al parto en Argentina (Pardini *et al.*, 2019). Es importante profundizar en los estudios moleculares y de comportamiento biológico de los aislados atípicos de *T. gondii* que circulan en Argentina, tanto en animales como en el hombre, con el fin de establecer su virulencia y relacionarlos epidemiológicamente para identificar posibles fuentes de infección (Pardini *et al.*, 2016).

El otro genotipo completo hallado en este trabajo presentó un patrón alélico tipo II con los marcadores utilizados. Este genotipo sería poco frecuente en Sudamérica, e incluso se ha postulado que corresponde a protozoos “importados”, probablemente de Europa (Bernstein *et al.*, 2018; Rajendran *et al.*, 2012). En Argentina se detectaron genotipos con predominio de marcadores tipo II en animales y humanos en la provincia de Buenos Aires (Bernstein *et al.* 2018; Moré *et al.*, 2010; Pardini *et al.*, 2014). Este linaje clonal fue previamente identificados en casos de aborto en ovejas (Jungersen *et al.*, 2002) y se describió por primera vez en tejidos de cabras sacrificadas para el consumo humano en los Estados Unidos (Dubey *et al.*, 2011) y más tarde también en Rumania a partir de dos aislamientos de *T. gondii* provenientes de diafragmas de cabritos (Paștiu *et al.*, 2015). Este genotipo de *T. gondii* es el que predomina en infecciones de humanos y animales de Europa y es considerado de baja virulencia (Ajzenberg *et al.*, 2002; Halos *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2010). Recientemente se realizó el primer aislamiento y la primera descripción del linaje clonal tipo II de *T. gondii* en un brote de aborto de cabras del noreste de Brasil (de Oliveira *et al.*, 2018). En este último trabajo se determinó que el aislamiento presentó una virulencia

intermedia para el modelo de ratón. En nuestro estudio, este genotipo se relacionó con un caso típico de aborto caprino, con calcificaciones y necrosis de cotiledones y lesiones fetales. A pesar que los fetos (mellizos fetos 5 y 6) resultaron positivos por PCR en tejidos, la genotipificación completa solo se logró desde la placenta. Este dato, sumado a las lesiones placentarias, podría sugerir que la concentración parasitaria en cotiledones y la inflamación consecuente podrían ser causales de la insuficiencia placentaria y la muerte de los cabritos. Es interesante realizar el estudio de las placentas en el diagnóstico del aborto, para aportar al conocimiento de la transmisión vertical de *T. gondii*.

En este trabajo también se determinó que la infección por *N. caninum* ocurrió en el 3,7 % de los fetos analizados (2/54). Este dato es menor al reportado previamente en Argentina donde se había informado que *N. caninum* había participado en el 20 % de los abortos, de los que también 3 fetos eran positivos a *T. gondii* (Unzaga *et al.*, 2014). Sin embargo, Unzaga *et al.* (2014) diagnosticaron los abortos por *N. caninum* sólo por serología fetal, mientras que en este trabajo de tesis se pudo arribar al diagnóstico por PCR así como evaluar las lesiones histopatológicas asociadas a la infección. Masala *et al.* (2007) reportaron que el 8,6 % (2/23) de los fetos caprinos analizados en Italia se detectó ADN de *N. caninum*, y que en uno de ellos además se identificó ADN de *T. gondii*. Moreno *et al.* (2012) encontraron ADN de *N. caninum* en el 11,5 % de cerebros fetales caprinos en España, dos de los cuales estaban asociados a lesiones características de infecciones por protozoarios. En Estados Unidos Moeller *et al.* (2001) hallaron una menor proporción de abortos caprinos (0,9 %)

por *N. caninum*. En relación a la coinfección, en este estudio no se hallaron abortos positivos por PCR para ambos parásitos, aunque las madres de los dos fetos abortados por *N. caninum* presentaron también serología positiva para *T. gondii*. Estos resultados sugieren que *N. caninum* también podría ser una potencial causa de aborto en cabras de Argentina, sin embargo es necesario realizar más estudios para determinar la posible sinergia de estos parásitos. Además de *T. gondii* y de *N. caninum*, otros agentes infecciosos que no fueron investigados, pueden haber estado involucrados en los abortos que se analizaron en este trabajo. De hecho, varios autores indican que otros agentes infecciosos están implicados con distinta frecuencia en abortos caprinos en distintos países (Engeland *et al.*, 1998; Masala *et al.*, 2007; Moeller, 2001; van den Brom *et al.*, 2012), y también es frecuente que otras causas de tipo no infeccioso puedan originar abortos en las cabras (Bisias *et al.* 2010; Hässig, 2007; Mellado y Pastor, 2006; van den Brom *et al.*, 2012). Además en muchos casos no se logra llegar a un diagnóstico certero de los mismos (Moeller, 2001). Por eso, considerando los resultados obtenidos de un 13 % de fetos positivos a *T. gondii*, este agente sería uno de los principales causales de abortos infecciosos en cabras de la provincia de Buenos Aires.

Los resultados de este capítulo permiten establecer que es necesario que *T. gondii* sea considerado entre los diagnósticos diferenciales en el estudio de abortos en los rebaños caprinos del país. Además aporta información sobre la nuevos genotipos de *T. gondii* que infectan a los animales de nuestra región y que producen alteraciones reproductivas.

Sería importante realizar estudios adicionales para identificar los genotipos de *T. gondii* presentes en otras regiones de nuestro país, como así también profundizar el conocimiento más sobre el comportamiento biológico, la patogenia y la respuesta inmune de este protozooario en las cabras.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio confirman que la infección por *T. gondii* es frecuente en caprinos de Argentina, debido a que se detectaron anticuerpos en un 39 % de las cabras, distribuidas en el 76,1 % de los establecimientos. La mayoría de las cabras seropositivas presentaron títulos bajos (100) de IFI, que estarían relacionados con infecciones crónicas.

Los valores de seroprevalencia presentaron diferencias significativas entre las regiones estudiadas, lo que estaría vinculado a los tipos de manejo, las condiciones climáticas variables y las características geográficas.

Los establecimientos lecheros, con manejo semi-intensivo/intensivo, presentaron las mayores seroprevalencias y las cabras con títulos de anticuerpos más elevados. Esto podría deberse a la reinfección, por contactos reiterados con agua y alimentos contaminados con ooquistes.

El ELISA P30 presentó una muy buena sensibilidad (96 %) y especificidad (98 %) utilizando un índice o valor de corte validado en nuestro país. Esta prueba sería una herramienta útil para el diagnóstico de rutina de la toxoplasmosis caprina en Argentina.

La transmisión vertical de *T. gondii*, manifestada por el nacimiento de cabritos asintomáticos, tendría una limitada participación en el mantenimiento de la infección en hatos caprinos con alta seroprevalencia. Por consiguiente, la transmisión horizontal por la ingesta de ooquistes en el agua y alimento sería la principal forma de infección en las cabras.

Toxoplasma gondii participaría en el 13 % de los abortos caprinos. En establecimientos con seroprevalencias altas la transmisión vertical se manifestó con abortos, muertes neonatales o perinatales y se detectó por métodos directos (PCR) en tejidos fetales. El SNC fetal y la placenta fueron los tejidos con mayor carga parasitaria.

Los genotipos de *T. gondii* que afectaron caprinos en Argentina fueron en su mayoría atípicos, con predominio de marcadores tipo III, y se relacionaron con los genotipos detectados en otros hospedadores de la misma región. En la provincia de Buenos Aires fue factible detectar el genotipo II asociado a abortos en caprinos.

Teniendo en cuenta que los sistemas de producción semi-intensivos/intensivos en nuestro país se dedican principalmente a la producción de leche y sus derivados, se recomienda tomar medidas para reducir la infección horizontal de los caprinos. Para eso se debería controlar la población de gatos, limitar su acceso a los lugares de almacenamiento de comida, a los bebederos/comederos, y no alimentarlos con los restos de faena.

La alta seroprevalencia de *T.gondii* encontrada en la mayoría de nuestros rebaños indicaría una amplia distribución de los ooquistes en el medio ambiente, lo que supone un mayor riesgo de transmisión horizontal en los caprinos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou Zeid NZ, Amer HA, Barakat TM, Selim AM, El-Balkemey FA. Toxoplasmosis in naturally and experimentally infected goats. *J Am Sci*. 2010; 6(11): 122–129.

Abu-Dalbouh MA, Ababneh MM, Giadinis ND, Lafi SQ. Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. *Trop Anim Health Prod*. 2012; 44: 49–54.

Ahmed YF, Sokkar SM, Desouky HM, Soror AH. Abortion due to toxoplasmosis in small ruminants. *Global Veterinaria*. 2008; 6: 337–342.

Ahmed H, Malik A, Arshad M, Mustafa I, Riaz Khan M, Sohail Afzal M, Ali S, Mobeen M, Simsek S. Seroprevalence and Spatial Distribution of Toxoplasmosis in Sheep and Goats in North-Eastern Region of Pakistan. *Korean J Parasitol*. 2016; 54(4): 439–446.

Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Dardé ML. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2002; 186: 684–689.

Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2004; 34(10): 1185–1196.

Alvarado-Esquivel C, Silva-Aguilar D, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy goats in Michoacán State, Mexico. J Parasitol. 2013; 99(3): 540–542.

Amairia S, Rouatbi M, Rjeibi MR, Nouasri H, Sassi L, Mhadhbi M, Gharbi M. Molecular prevalence of *Toxoplasma gondii* DNA in goats' milk and seroprevalence in Northwest Tunisia. Vet Med Sci. 2016; 2(3): 154-160.

Amdouni Y, Rjeibi MR, Rouatbi M, Amairia S, Awadi S, Gharbi M. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered ruminants (sheep, goats and cattle) in Northwest Tunisia. Meat Sci. 2017; 133: 180-184.

Anderlini GA, Mota RA, Faria EB, Cavalcanti EF, Valenca RM, Pinheiro Junior JW, Albuquerque PP, Souza Neto OL. Occurrence and risk factors associated with infection by *Toxoplasma gondii* in goats in the State of Alagoas, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44: 157-162.

Asgari Q, Sarnevesht J, Kalantari M, Sadat SJ, Motazedian MH, Sarkari B. Molecular survey of *Toxoplasma* infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran. Trop Anim Health Prod. 2011; 43(2): 389-392.

Azevedo S, Pena H, Alves C, Filho AG, Oliveira R, Maksimov P, Schares G, Gennari S. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2010; 19: 80–84.

Bahia M T, de Almeida Vitor RW, Caldas RP, Antunes CMF, Chiari CA. A avidéz de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma* da classe IgG sua utilização na

diferenciação entre toxoplasmose recente e crônica em caprinos. Braz J Vet Res Anim Sci. 1995; 32: 11–16.

Barakat AMA, Abd Elaziz MM, Fardaly HA. Comparative diagnosis of toxoplasmosis in Egyptian small ruminant by indirect hemagglutination assay and ELISA. Global Veterinaria. 2009; 3(1): 9-14

Bartova E, Sedlak K. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in goats in the Czech Republic. Vet Med-Czech. 2012; 57: 111–114.

Basso W, Venturini MC, Moré G, Quiroga A, Bacigalupe D, Unzaga JM, Larsen A, Laplace R, Venturini L. Toxoplasmosis in captive Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Argentina. Vet Parasitol. 2007; 144: 157-161.

Basso W, Moré G, Quiroga A, Pardini L, Bacigalupe D, Venturini L, Valenzuela MC, Balduchi D, Maksimov P, Schares G, Venturini MC. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender - tailed meerkats (*Suricata suricatta*). Vet Parasitol. 2009; 61: 201-206.

Basso W, Grimm F, Ruetten M, Djokic V, Blaga R, Sidler X, Deplazes P. Experimental *Toxoplasma gondii* infections in pigs: Humoral immune response, estimation of specific IgG avidity and the challenges of reproducing vertical transmission in sows. Vet Parasitol. 2017; 236: 76-85.

Bawm S, Maung WY, Win MY, Thu MJ, Chel HM, Khaing TA, Wai SS, Htun LL, Myaing TT, Tiwananthagorn S, Igarashi M, Katakura K. Serological Survey and factor associated with *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Myanmar. Scientifica (Cairo). 2016; 2016: 4794318.

Beck HP, Blake D, Dardé ML, Felger I, Pedraza-Díaz S, Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Putignani L, Shiels B, Tait A, Weir W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int J Parasitol.* 2009; 39(2): 175-189.

Bernstein M, Pardini L, Moré G, Unzaga JM, Su C, Venturini MC. Population structure of *Toxoplasma gondii* in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2018; 65: 72-79.

Bessieres MH, Le Breton S, Seguela JP. Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma gondii* exo-antigens and comparison with somatic antigens. *Parasitol Res.* 1992; 78: 222–228.

Beverly JKA. Congenital transmission of *Toxoplasma gondii* through successive generations of mice. *Nature.* 1959; 183: 1348-1349.

Bezerra MJ, Kim PC, Moraes ÉP, Sá SG, Albuquerque PP, Silva JG, Alves BH, Mota RA. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. *Transbound Emerg Dis.* 2015; 62(4): 421-4.

Bharathi MV, Basheer AM, Nedunchelliyar S, Singh S, Selvan MSM. Comparison of modified direct agglutination and indirect haemagglutination tests for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in goats in Chennai. *J Vet Parasitol.* 2003; 17: 49–51.

Bisias G, Burriel AR, Boutsini S, Kritas SK, Leontides LS. A serological investigation of some abortion causes among small ruminant flocks in Greece. *Internet J Veterin Med.* 2010; 8(2).

Bispo MS, Faustino MAG, Alves LC, Salcedo JHP, Souza CH, Sousa DP. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em propriedades de criação de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco. Ciênc Anim Brasil. 2011; 12(2): 291–297.

Bisson A, Maley S, Rubaire-Akiiki CM, Wastling JM. The seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic goats in Uganda. Acta Tropica. 2000; 76 (1): 33–38.

Björkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol. 1999; 29: 1497–1507.

Björkman C, Naeslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton D, Uggla A. An Ig G avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest 1999; 11: 41-44.

Borde G, Lowhar G, Adesiyun AA. *Toxoplasma gondii* and *Chlamydophila abortus* in caprine abortions in Tobago: a sero-epidemiological study. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2006; 53: 188–193.

Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989; 27(8): 1787-1792.

Burkart R, Bárbaro N, Sánchez R, Gómez D. Eco-regiones de la Argentina. Administración de Parques Nacionales. Secretaria de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable. Presidencia de la Nación. 1999.
www.sib.gob.ar/archivos/Eco-Regiones_de_la_Argentina.pdf

Buxton D, Gilmour JS, Angus KW, Blewett DA, Miller JK. Perinatal changes in lambs infected with *Toxoplasma gondii*. Res Vet Sci. 1982; 32: 170–176.

Buxton D, Finlayson J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. J Comp Pathol. 1986; 96: 319–333.

Buxton D, Rodger SM, Maley SW, Wright SE. Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. Small Rum Res. 2006; 62: 43-46.

Buxton D, Losson B. Toxoplasmosis. Aetiology diagnosis. En: Ortega-Mora LM, Gottstein B, Conraths FJ, Buxton D. Protozoal Abortions in farm Ruminants, Guidelines for Diagnosis and Control. CAB International, Oxfordshire, UK and Cambridge, USA. 2007.

Buxton D, Maley SW, Wright SE, Rodger S, Bartley P, Innes EA. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. Vet Parasitol. 2007; 149: 25–28.

Caldeira FHB, Ubiali DG, de Godoy I, Dutra V, de Aguiar DM, Melo ALT, Riet-Correa F, Colodel EM, Pescador CA. Outbreak of caprine abortion by *Toxoplasma gondii* in Midwest Brazil. Pesqui Vet Bras. 2011; 31: 933-937.

Camossi LG, Greca-Jr H, Corrêa AP, Richini-Pereira VB, Silva RC, Da Silva AV, Langoni H. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. Vet Parasitol. 2011; 177 (3-4): 256–261.

Campero C, Cantón G, Moore DP. Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos. Diagnóstico y control. Ed. Hemisferio Sur. 1ra edición. 2017.

Campero LM, Gos ML, Moore DP, Regidor-Cerrillo J, Unzaga JM, Moré G, Ortega-Mora LM, Venturini MC. Microsatellite pattern analysis of *Neospora caninum* from a naturally infected goat fetus. *Vet Parasitol.* 2018; 255: 58-60.

Carneiro AC, Carneiro M, Gouveia AM, Guimarães AS, Marques AP, Vilas-Boas LS, Vitor RW. Seroprevalence and risk factors of caprine toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2009; 160 (3-4): 225-229.

Cavalcante ACR, Ferreira AM, Melo MN, Fux B, Brandão GP, Vitor RWA. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Ruminant Res.* 2007; 69: 79–82.

Cavalcante ACR, Carneiro M, Gouveia AMG, Pinheiro RR, Vitor RWA. Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008; 60: 36–41.

Chandrawathani P, Nurulaini R, Zanin CM, Premaalatha B, Adnan M, Jamnah O, Khor SK, Khadijah S, Lai SZ, Shaik MA, Seah TC, Zatil SA. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs, goats, cattle, dogs and cats in peninsular Malaysia. *Trop Biomed.* 2008; 25(3): 257-258.

Chanton-Greutmann H, Thoma R, Corboz L, Borel N, Pospischil A. Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996–1998) with special regard to chlamydial abortions. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde.* 2002; 144: 483–492.

Chávez-Velásquez A, Alvarez-García G, Gómez-Bautista M, Casas-Astos E, Serrano-Martínez E, Ortega-Mora L. *Toxoplasma gondii* infection in adult llamas (*Lama glama*) and vicunas (*Vicugna vicugna*) in the Peruvian Andean region. *Vet Parasitol.* 2005; 130: 93-97.

Chiappino ML, Nichols A, O'Connor GR. Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. *J Immunol.* 1984; 31: 288-292.

Chiari CA y Neves DP. Human toxoplasmosis acquired by ingestion of goat's milk. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1984; 79 (3): 337–340.

Chikweto A, Kumthekar S, Tiwari K, Nyack B, Deokar MS, Stratton G, Macpherson CN, Sharma RN, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs, sheep, goats and cattle from Grenada and Carriacou, West Indies. *J Parasitol.* 2011; 97: 950–951.

Cisak E, Zajac V, Sroka J, Sawczyn A, Kloc A, Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A. Presence of pathogenic rickettsiae and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. *Foodborne Pathog Dis.* 2017, 14: 189–194.

Clementino Andrade MMC, Pinheiro BV, Cunha MM, Carneiro ACAV, Andrade Neto VF, Vitor RWA. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Res Vet Sci.* 2013; 94: 587–589.

Conde M, Molina Caballero JM, Rodríguez-Ponce E, Ruiz A, González J. Analysis of Ig G response to experimental infection with RH *Toxoplasma gondii* in goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2001; 24: 197-206.

Conraths FJ, Schares G. Validation of molecular diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Vet Parasitol.* 2006; 136: 91–98.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a European multicentre case-control study. *Br Med J.* 2000; 15: 142-147.

Costa DG, Marvulo MF, Silva JA, Santana SC, Magalhães FJ, Filho CD, Ribeiro VO, Alves LC, Mota RA, Dubey JP, Silva JC. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *J Parasitol.* 2012; 98(3): 679-680.

Czopowicz M, Kaba J, Szalus-Jordanow O, Nowicki M, Witkowski L, Frymus T. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. *Vet Parasitol.* 2011; 178: 339–341.

da Silva JG, Alves BH, Melo RP, Kim PC, Souza Neto OL, Bezerra MJ, Sá SG, Mota RA. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. *Acta Trop.* 2015; 142: 145-8.

Decoster A. Detection of IgA anti-p30 (SAG-1) antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. *Curr Trop Microbiol Immunol.* 1997; 219: 199-207.

Decoster A, Gontier P, Dehecq E, Demory JL, Duhamel M. Detection of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin A antibodies by platelia-toxo IgA directed against P30 and by IMx Toxo IgA for diagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(8): 2206–2208.

Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Dardé ML, Dei-Cas E, Houfflin-Debauge V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenatal Diagnosis*. 2010; 30(9): 902–905.

Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, Bourbigot AM, Nasser V, Ajzenberg D, Darde ML, Carme B. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(7): E221-231.

de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RM, da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 326-329.

Deng H, Dam-Deisz C, Luttikholt S, Maas M, Nielen M, Swart A, Vellema P, van der Giessen J, Opsteegh M. Risk factors related to *Toxoplasma gondii* seroprevalence in indoor-housed Dutch dairy goats. *Prev Vet Med*. 2016; 124: 45–51.

de Oliveira JMB, de Almeida JC, de Melo RPB, de Barros LD, Garcia JL, Andrade MR, Porto WJN, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, Oliveira AADF, Mota RA. First description of clonal lineage type II (genotype #1) of *Toxoplasma gondii* in abortion outbreak in goats. *Exp Parasitol*. 2018; 188: 21-25.

De Salvador-Guillouët F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, Saint-Paul MC, Dunais B, Dellamonica P, Marty P. Severe pneumonia during primary infection with an

atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. *Journal of Infection*. 2006; 53: e47–e50.

Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. 1980; 11: 562–568.

de Sousa C, Batista Santos A, Santos de Azevedo S, Sousa Soares H, dos Santos Higino SS, Pena H, Alves CJ, Gennari SM. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats in the State of Paraíba, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012; 21(4): 399-404.

Diakou A, Papadopoulos E, Panousis N, Karatzias C, Giadinis N. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. *Vet Parasitol*. 2013; 198(3–4): 387–390.

Díaz P, Cabanelas E, Díaz JM, Viña M, Béjar JP, Pérez-Creo A, Prieto A, López CM, Panadero R, Fernández G, Díez-Baños P, Morrondo P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats from north-western Spain. *Ann Agric Environ Med*. 2016; 23(4): 587–590.

Djokic V, Klun I, Musella V, Rinaldi L, Cringoli G, Sotiraki S, Djurkovic-Djakovic O. Spatial epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in goats in Serbia. *Geospat Health*. 2014; 8(2): 479-488.

Dubey, JP. Toxoplasma-induced abortion in dairy goats. *J Am Vet Med Assoc*. 1981a; 178: 671–674.

- Dubey JP. Epizootic toxoplasmosis associated with abortion in dairy goats in Montana. *J Am Vet Med Assoc.* 1981b; 178: 661–670.
- Dubey JP. Repeat transplacental transfer of *Toxoplasma gondii* in goats. *J Am Vet Med Assoc.* 1982; 180: 1220–1221.
- Dubey JP. Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. *Am J Vet Res.* 1988; 49: 905-909.
- Dubey, JP. Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet Parasitol.* 1989; 32: 133–144.
- Dubey JP. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J Parasitol.* 1995; 81:410- 415.
- Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocyst for cats. *J Parasitol.* 1996; 82: 957-960.
- Dubey JP. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6 % NaCl solutions at 4-208C. *J Parasitol.* 1997; 83: 946-949.
- Dubey, JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998a; 28: 1019-1024.
- Dubey, JP. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology.* 1998b; 116: 43–50.
- Dubey, JP. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J Parasitol.* 1998c; 84: 862-865.

Dubey JP. The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In: Ambroise-Thomas P, Petersen E. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris: Springer-Verlag, 2000. pp. 271-275.

Dubey, JP. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol. 2001; 87: 215-219.

Dubey JP. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. J Parasitol. 2002; 88: 713-717.

Dubey, JP. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. Vet Parasitol. 2005; 133: 289-298.

Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2009; 39(8): 877-882.

Dubey JP. Toxoplasmosis of Animal and Humans. 2nd Edition. CRC Press. Boca Ratón. FL. USA. 2010.

Dubey JP, Desmonts G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Vet J. 1987; 19(4): 337-339.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med. 1970a; 132: 636-662.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1970b; 56: 447-456.

Dubey JP, Sharma SP, Lopes CWG, Williams JF, Williams CSF, Weisbrode SE. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Am J Vet Res. 1980; 41: 1072-1076.

Dubey JP, Desmonts G, Antunes F, McDonald C. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in experimentally infected pregnant goats and transplacentally infected kids. Am J of Vet Res. 1985; 46: 1137-1140.

Dubey JP, Miller S, Desmonts G, Thulliez P, Anderson WR. *Toxoplasma gondii*-induced abortion in dairy goats. J Am Vet Med Assoc. 1986; 188: 159-162.

Dubey JP, Emond JP, Desmontis G, Anderson WR. Serodiagnosis of postnatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep. Am J Vet Res. 1987; 48: 1239-1243.

Dubey JP, Kirbride CA. Enzootic toxoplasmosis in sheep in north-central United States. J Parasitol. 1989; 75(5): 673-676.

Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J Parasitol. 1990; 76: 201-204.

Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OCH, Blixt JA. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol.* 1997; 83: 870-882.

Dubey, JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 267-299.

Dubey JP, Su C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 190-195.

Dubey JP, Moura L, Majumdar D, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OC, Kelly P, Krecek RC, Su C. Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. *Parasitology.* 2009; 136(6): 589-594.

Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Hill DE, Villena I, Zhou H, Su C, Jones JL. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol.* 2011; 41 (8): 827-833.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease and epidemiology. *Parasitology.* 2012; 139: 1375-1424.

Dubey JP, Verma SK, Ferreira LR, Oliveira S, Cassinelli AB, Ying Y, Kwok OCH, Tuo W, Chiesa OA, Jones JL. Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. *J Food Prot.* 2014; 77: 1747-1753.

Dumètre A, Dardé ML. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? FEMS Microbiol Rev. 2003; 27: 651-661.

Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. Int J Parasitol. 2001; 31: 1699–1703.

EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. EFSA, 2007.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. J Infect Dis. 2009; 199(2): 280–285.

Engeland IV, Waldeland H, Andresen O, Loken T, Bjorkman C, Bjerkas I. Foetal loss in dairy goats: an epidemiological study in 22 herds. Small Rumin Res. 1998; 30: 37-48.

Faria E, Gennari SM, Pena HPJ, Athayde ACR, Silva ML, Azevedo SS. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. Vet Parasitol. 2007; 149: 126-129.

Feldman H, Miller L. Serological study of toxoplasmosis prevalence. Am J Epidemiol. 1956; 64(3): 320-335.

Ferguson DJP. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104: 133-148.

Figliuolo LPC, Rodrigues AAR, Viana RB, Aguiar DM, Kasai N, Gennari SM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. Small Rumin Res. 2004; 55: 29-32.

Figueiredo, JF, Silva DA, Cabral DD, Mineo JR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the indirect haemagglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the Region of Uberlandia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 687–692.

Fortes MS, Ruiz Lopes-Mori FB, Tekes Caldart E, Constantino C, Evers F, Pagliari S, Campos de Almeida J, Barros LD, Lemos Freire R, García JL, Headley SA, Navarro IT. Caprine toxoplasmosis in Southern Brazil: a comparative seroepidemiological study between the indirect immunofluorescence assay, the enzyme-linked immunosorbent assay, and the modified agglutination test. Trop Anim Health Prod. 2018; 50 (2): 413–419.

Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. BioScience. 1973; 23: 343-352.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as a coccidian oocysts. Science. 1970; 167: 893-896.

Frenkel JK, Hassanein KM, Hassanein RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53: 458-468.

Gamble HR, Dubey JP, Webert DW, Parmley SF. Use of recombinant antigens for detection of *Toxoplasma gondii* infection in swine. J Parasitol. 2000; 86: 459-462.

García G, Sotomaior C, do Nascimento AJ, Navarro IT, Soccol VT. *Toxoplasma gondii* in goats from Curitiba, Paraná, Brazil: risks factors and epidemiology. Rev Bras Parasitol Vet. 2012; 21(1): 42-7.

García-Bocanegra I, Cabezon O, Hernandez E, Martinez-Cruz MS, Martinez-Moreno A, Martinez-Moreno J. *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. J Parasitol. 2013; 99: 438-440.

Gazzonis AL, Veronesi F, Di Cerbo AR, Zanzani SA, Molineri G, Moretta I, Moretti A, Piergili Fioretti D, Invernizzi A, Manfredi MA. *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Northern Italy – prevalence and risk factors. Ann Agric Environ Med. 2015; 22(1): 62-68.

Gebremedhin EZ, Agonafir A, Tessema TS, Tilahun G, Medhin G, Vitale M, Di Marco V. Some risk factors for reproductive failures and contribution of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats of Central Ethiopia: a cross-sectional study. Res Vet Sci. 2013; 95(3): 894-900.

Gebremedhin EZ, Abdurahaman M, Tessema TS, Tilahun G, Cox E, Goddeeris B, Dorny P, De Craeye S, Dardé ML, Ajzenberg D. Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption. Parasit Vectors. 2014a; 7: 425.

Gebremedhin EZ, Abdurahaman M, Hadush T, Tessema TS. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats slaughtered for human consumption in Central Ethiopia. BMC Research Notes. 2014b; 7: 696.

Gondim LFP, Barbosa HV, Ribeiro Filho CH, Saeki H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. Vet Parasitol. 1999; 82: 273-276.

González-Warleta M; Castro-Hermida JA, Calvo C, Pérez V, Gutiérrez- Expósito D, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, Mezo M. Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* during successive pregnancies across three generations of naturally infected sheep. Vet Res. 2018; 49: 106.

Graille M, Stura EA, Bossus M, Muller BH, Letourneur O, Battail- Poirrot N, Sibai G, Gauthier M, Rolland D, Le Du MH, Ducancel F. Crystal structure of the complex between the monomeric form of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. J Mol Biol. 2005; 354: 447-458.

Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. Prev Vet Med. 2000; 45: 3-22.

Greiner M, Pfeiffer DU, Smith RD. Principal and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med. 2000; 45: 23-41.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. Exp Parasitol. 1992; 74(1): 106-111.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int J Parasitol.* 1995; 26: 169-173.

Gross U, Bohne W, Schröder J, Roos J, Heesemann T. Comparison of a commercial enzyme immunoassay and an Immunoblot technique for detection of immunoglobulin A antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993; 12: 636-639.

Gross U, Luder CGK, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, Krczal D, Enders G. Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3619-3622.

Guo M, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Lambertini E, Ying Y, Gamble HR, Jones JL, Pradhan AK. Qualitative assessment for *Toxoplasma gondii* exposure risk associated with meat products in the United States. *J Food Prot.* 2015; 78(12): 2207-2219.

Guo M, Mishra A, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, Jones JL, Pradhan AK. A systematic meta-Analysis of *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals in the United States. *Foodborne Pathog Dis.* 2016; 13(3): 109-118.

Halos L, Thebault A, Aubert D, Thomas M, Perret C, Geers R, Alliot A, Escotte-Binet S, Ajzenberg D, Dardé ML, Durand B, Boireau P, Villena I. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J for Parasitol.* 2010; 40(2): 193-200.

Hamilton CM, Katzer F, Innes EA, Kelly PJ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in small ruminants from four Caribbean islands. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 449.

Hamilton CM, Kelly PJ, Bartley PM, Burrells A, Porco A, Metzler D, Crouch K, Ketzis JK, Innes EA, Katzer F. *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasit Vectors*. 2015; 18(8): 166.

Handman E, Goding JW, Remington JS. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1980; 124: 2578-2583.

Harkins D, Spenser J, Metsis A, Vuust J, Petersen E. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (p30) expressed in *E. coli* is recognized by human toxoplasmosis-specific immunoglobulin M (Ig M) and IgG antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996; 3: 355-357.

Harkins D, Clements DN, Maley S, Marks J, Wright S, Esteban E, Innes EA, Buxton D. Western blot analysis of IgG response of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*. *J Comp Path*. 1998; 73: 376-382.

Hartley WJ, Marshall SC. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *N Z Vet*. 1957; 5: 119-124.

Hässig M. 2007. Non-infectious causes of abortion in farm animals. En: Ortega-Mora LM, Gottstein B, Countraths FJ, Buxton D. *Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control*. CAB International, UK. p. 263.

Herrmann DC, Pantchev N, Vrhovec G et al. Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Inter J for Parasitol.* 2010; 40 (3): 285–292.

Herrmann DC, Bärwald A, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, Schares G. *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Vet Res.* 2012; 42: 39.

Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH, Thomasson D, Wright EA, Williams RH, Murphy RG, Smith JE. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 2009; 136(14): 1877-1885.

Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 107-113.

Hiramoto RM, Mayrbaur-Borges M, Galisteo Jr. AJ, Meireles LR, Macre MS, Andrade Jr. HF. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. *Revista de Saude Publica.* 2001; 35(2): 113-118.

Homan WL, Vercammen M, de Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000; 30: 67-95.

Hosseininejad M, Azizi HR, Hosseini F, Schares G. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. *Vet Parasitol.* 2009; 164: 315-319.

Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995; 172: 1561–1566.

Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, García-Perez AL. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet Parasitol.* 2001; 102: 17-27.

Hutchinson WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 1965; 206: 961-962.

INDEC. 2002. Censo Nacional Agropecuario 2002.
www.indec.gov.ar/cna_index.asp

Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 108: 29-36.

Innes EA, Bartley PM, Maley SW, Wright SE, Buxton D. Comparative host parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine.* 2007; 25 (30): 5495-5503.

Iovu A, Gyorke A, Mircean V, Gavrea R, Cozma V. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy goats from Romania. *Vet Parasitol.* 2012; 186: 470-474.

Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1960; 46: 11-21.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(8): 1972-1977.

Jittapalapong S, Sangvaranond A, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Khachaeram W, Koizumi S, Maruyama S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. *Vet Parasitol.* 2005; 127: 17-22.

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. *Exp Parasitol.* 2010; 124 (1): 10-25.

Jung BY, Gebeyehu EB, Lee SH, Seo MG, Byun JW, Oem JK, Kim HY, Kwak D. Detection and determination of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(5): 374-377.

Jungersen G, Jensen L, Rask MR, Lind P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep Type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2002; 25: 187-195.

Juránková J, Opsteegh M, Neumayerová H, Kovařík K, Frencová A, Baláž V, Volf J, Koudela B. Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic and real-time PCR. *Vet Parasitol.* 2013; 193(1-3): 95-99.

Kalambhe D, Gill JPS, Singh BB. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in the slaughter sheep and goats from North India. *Vet Parasitol.* 2017; 241: 35-38.

Kamani J, Mani AU, Egwu GO. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno state, Nigeria. *Trop Anim Health Prod.* 2010; 42(4): 793-797.

Karsten V, Qi H, Beckers CJM, Reddy A, Dubremetz JF, Webster P, Joiner KA. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J cell biol.* 1998; 141: 1323-1333.

Kasper LH. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity.* 1989; 57 (3): 668-672.

Kean BH, Kimball AC, Christenson WN. An epidemic of acute toxoplasmosis. *J Am Med Assoc.* 1969; 208: 1002-1004.

Khammari I, Saghrouni F, Lakhal S, Bouratbine A, Ben Said M, Boukadida J. A new IgG immunoblot kit for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. *Korean J Parasitol.* 2014; 52(5): 493-499.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R Jr, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2006; 6: 942-949.

Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol.* 2008; 38: 1359-1370.

Kimbita EN, Xuan X, Huang X, Miyazawa T, Fukumoto S, Mishima M, Susuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Susuki N, Mikami T, Igarashi I. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. *Vet Parasitol.* 2001; 102: 35-44.

Kirkbride. Kirkbride's Diagnosis of abortion and neonatal loss in animals. 4th Edition. Ed. Bradley L Njaa. Wiley-Blackwell. Oxford, UK. 2012.

Kotula AW, Dubey JP, Sharar AK, Andrews CD, Shen SK, Lindsay DS. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Food Prot.* 1991; 54: 687-690.

Kuticic V, Wikerhauser T. Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. In: Gross U, editor. *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer-Verlag, 1996. pp. 261-265.

Kyan H, Taira M, Yamamoto A, Inaba C, Zakimi S. Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* genotypes from goats at an abattoir in Okinawa, Jpn. *J Infect Dis.* 2012; 65: 167-170.

Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanita*. 2004; 40(1): 81-88.

Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(30): 11423-11428.

Lekutis C, Ferguson J, Grigg M, Camps M, Boothroyd J. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol*. 2001; 31: 1285-1292.

Lélu M, Villena I, Dardé ML, Aubert D, Geers R, Dupuis E, Marnef F, Poulle ML, Gotteland C, Dumètre A, Gilot-Fromont E. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78: 5127-5132.

Li F, Wang SP, Wang CJ, He SC, Wu X, Liu GH. 2016. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats in Hunan province, China. *Parasite*. 2016; 23: 44.

Linhares GFC, Dias MJ, Souza AM, Dias Filho FC. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos no município de Goiania: levantamento sorológico. *An Esc Agron Vet*. 1990; 20: 31-37.

Liu ZK, Li JY, Pan H. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in small ruminants in China. *Prev Vet Med*. 2015; 118(4): 488-492.

Lopes AP, Dubey JP, Neto F, Rodrigues A, Martins T, Rodrigues M, Cardoso L. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs

from the north of Portugal for human consumption. *Vet Parasitol.* 2013; 193: 266-269.

Luciano MD, Menezes RC, Ferreira LC, Nicolau JL, Neves LB, Luciano RM. Soroepidemiologia da toxoplasmose em caprinos e ovinos de três municípios do Estado do Rio de Janeiro. *Pesqui Vet Brasil.* 2011; 31 (7): 569-574.

Lundén A, Uggla A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol.* 1992; 15: 357-363.

Machado TMM, Lima JD. Frequência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em caprinos criados sobre diferentes formas de exploração no Estado de Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1987; 55: 485-487.

Maciel PK. Serological evaluation of antibodies of *Toxoplasma gondii* in goats bred on Gravataí and Viamão counties, Great Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Scientiae Veterinarie.* 2005; 33(2): 233-234.

Magi B, Migliorini L. Westernblotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol.* 2011; 34: 93-95.

Mainardi RS, Modolo JR, Stachissini AVM, Padovani CR, Langoni H. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de Sao Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 136: 759-761.

Maksimov P, Buschtöns S, Herrmann DC, Conraths FJ, Görlich K, Tenter AM, Dubey JP, Nagel-Kohl U, Thoms B, Bötcher L, Kühned M, Schares G. Serological

survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. *Vet Parasitol.* 2011; 182: 140-149.

Manazza JA, Gos ML, Español G, Fiorentino MA, Lioi M, Venturini MC, Morsella C, Méndez L, Paolicchi F, Späth EJA. Seroprevalencia de brucelosis, neosporosis, toxoplasmosis y paratuberculosis en caprinos lecheros de la provincia de Buenos Aires. XIXª Reunión Científico Técnica AAVLD. 2012a. E25, pp: 299-300.

Manazza JA, Späth EJA, Gos ML, Venturini MC, Fiorentino MA, Morsella C, Malena R, Paolicchi F. Brucelosis, neosporosis, toxoplasmosis y paratuberculosis en caprinos para carne y leche en el noroeste de Córdoba. XIXª Reunión Científico Técnica AAVLD. 2012b. E26, pp. 301-302.

Mancianti F, Nardoni S, D'Ascenzi C, Pedonese F, Mugnaini L, Franco F, Papini R. Seroprevalence detection of DNA in blood and milk and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. *Biomed Res Int.* 2013; 905326.

Manger ID, Hehl AB, Boothroyd JC. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect Immun.* 1998; 66(5): 2237-2244.

Marcolino PT, Silva DAO, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(3): 384-389.

Marques PX, O'Donovan J, Williams EJ, Gutierrez J, Worrall S, McElroy M, Proctor A, Brady C, Sammin D, Bassett H, Buxton D, Maley S, Markey BK, Nally JE.

Detection of *Toxoplasma gondii* antigens reactive with antibodies from serum, amniotic, and allantoic fluids from experimentally infected pregnant ewes. *Vet Parasitol.* 2012; 185: 91-100.

Martínez A, Bincaz J, Brihuega B, Sheridan M, Mozgovej M, Parreño V, Gos ML, Robles CA. *Revista Veterinaria Argentina.* 2013; 30: 303.

Masala G, Porcu R, Madau L, Tanda A, Ibba B, Satta G, Tola S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet Parasitol.* 2003; 117: 15-21.

Masala G, Porcu R, Daga C, Denti S, Canu G, Patta C, Tola S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest.* 2007; 19(1): 96-98.

McLeod R, Mack D, Brown C. *Toxoplasma gondii*, new advances in cellular and molecular biology. *Exp Parasitol.* 1991; 72: 376-382.

Medeiros AD, de Medeiros M, Andrade C, de Almeida Vitor RW, de Andrade-Neto WF. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in meat and dairy goat herds in Rio Grande do Norte, Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 2014; 23(4): 481-487.

Meireles LR, Galisteo AJ, Andrade HF. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2003; 40: 267-271.

Mellado M, Pastor FJ. Aborto no infeccioso en caprinos. *Ciencia Animal Brasileira*. 2006; 7(2): 167-175.

Mercier C, Adjogble KDZ, Däubener W, Delauw MFC. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. *Int J Parasitol*. 2005; 35: 829-849.

Miao Q, Huang SY, Qin SY, Yu X, Yang Y, Yang JF, Zhu XQ, Zou FC. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Yunnan black goats (*Capra hircus*) in southwest China by PCR-RFLP. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 57.

Mineo JR, Kasper LH. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp Parasitol*. 1994; 79(1): 11-20.

Misurová L, Svobodová V, Pavlata L, Dvorak R. Titres of specific antibodies against *Toxoplasma gondii* in goats and their kids. *Acta Vet Brno*. 2009; 78: 259-266.

Moeller RB. Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991–1998). *J Vet Diagn Invest*. 2001; 13: 265-270.

Moore DP, de Yaniz MG, Odeón AC, Cano D, Leunda MR, Späth EAJ, Campero CM. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in goats from La Rioja Province, Argentina. *Small Rumin Res*. 2007; 73: 256-258.

Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol Res*. 2008; 102(4): 671-675.

Moré G, Pardini L, Basso W, Machuca M, Bacigalupe D, Villanueva MC, Schares G, Venturini MC, Venturini L. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Vet Parasitol.* 2010; 169: 57-61.

Moré G, Maksimov P, Pardini L, Herrmann DC, Bacigalupe D, Maksimov A, Basso W, Conraths FJ, Schares G, Venturini MC. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. *Vet Parasitol.* 2012; 184: 116-121.

Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol.* 2012; 187: 312-318.

Morley EK, Williams RH, Hughes JM, Terry RS, Duncanson P, Smith JE, Hide G. Significant familial differences in the frequency of abortion and *Toxoplasma gondii* infection within a flock of Charollais sheep. *Parasitol.* 2005; 131: 181-185.

Morrisette NS, Ajioka JW. The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 865-869.

Munday BL, Corbould A. The application of the *Toxoplasma*, indirect, fluorescent-antibody test to sheep sera. *Australian Journal Medical Technology.* 1971; 2: 3-6.

Munday BL, Mason RW. Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. *Aust Vet J.* 1979; 55: 485-487.

Nagel SD, Boothroyd JC. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J Biol Chem.* 1989; 264: 5569-5574.

Neto JO, Azevedo SS, Gennari SM, Funada MR, Pena HF, Araujo AR, Batista CS, Silva, ML, Gomes AA, Piatti RM, Alves CJ. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Serido Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, northeast region of Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 156: 329–332.

Neumayerová H, Juránková J, Saláková A, Gallas L, Kovařík K, Koudela B. Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. *Food Microbiol.* 2014; 39: 47-52.

Nichols BA, Chiappino ML, O'Connor GR. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J Ultrastruct Res.* 1983; 85-98.

Nishi SM, Kasai N, Gennari SM. Antibody levels in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol.* 2001; 87(2): 445-447.

Nunes FVA, Vaez JR, Pinheiro RR, Cavalcante ACR, Vitor RWA, Ahid SMM. Soroprevalência e fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos de propriedades rurais do município de Mossoró, RN. *Pesq Vet Bras.* 2013; 33(5): 565-570.

Nurse GH, Lenghaus C. An outbreak of *Toxoplasma gondii* abortion, mummification and perinatal death in goats. *Aust Vet J.* 1986; 63(1): 27-29.

OIE. World Organisation for Animal Health. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: *Terrestrial Manual.* 2014, capítulo 1.1.5, p. 15-16.

Opel U, Charleston WAG, Pomroy WE, Rommel M. A survey of the prevalence of *Toxoplasma* infection in goats in New Zealand and a comparison of the latex agglutination and indirect fluorescence tests. *Vet Parasitol.* 1991; 40: 181-186.

Pardini L. Estudios inmunológicos y moleculares de la infección por *Toxoplasma gondii* en cerdos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. 2011.

Pardini L, Maksimov P, Herrmann DC, Bacigalupe D, Rambeaud M, Machuca M, Moré G, Basso W, Schares G, Venturini MC. Evaluation of an in-house TgSAG1 (P30) IgG ELISA for diagnosis of naturally acquired *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vet Parasitol.* 2012; 189: 204-210.

Pardini L, Moré G, Rudzinski M, Gos ML, Campero LM, Meyer A, Bernstein M, Unzaga JM, Venturini MC. *Toxoplasma gondii* isolates from chickens in an area with human toxoplasmic retinochoroiditis. *Exp Parasitol.* 2016; 166: 16-20.

Pardini L, Bernstein M, Carral LA, Kaufer FJ, Dellarupe A, Gos ML, Campero LM, Moré G, Messina MT, Schneider MV, Freuler CB, Durlach RA, Unzaga JM, Venturini MC. Congenital human toxoplasmosis caused by non-clonal *Toxoplasma gondii* genotypes in Argentina. *Parasitol Int.* 2019; 68(1): 48-52.

Partanen P, Turunen HJ, Paasivuo RT, Leinikki PO. Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M, and A antibodies at different stages of infection. *J Clin Microbiol.* 1984; 20: 133-135.

Paștiu AI, Ajzenberg D, Györke A, Șuteu O, Balea A, Rosenthal BM, Kalmár Z, Domșa C, Cozma V. Traditional goat husbandry may substantially contribute to human toxoplasmosis exposure. *J Parasitol.* 2015; 101(1): 45-49.

Patton S, Johnson SS, Puckett K. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in nine populations of dairy goats: compared titers using modified direct agglutination and indirect hemagglutination. J Parasitol. 1990; 76: 74–77.

Paul M. Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis. Przegl Epidemiol. 1998; 52: 447-454.

Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol. 2008; 38: 561-569.

Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaló A, Pérez-Pérez V, Alvarez- García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. Vet Parasitol. 2004; 121: 33-43.

Pescador CA, Oliveira EC, Pedroso PMO, Okuda LH, Corbellini LG, Driemeier D. Perdas reprodutivas associadas com infeccao por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. Pesq Vet Bras. 2007; 27: 167-171.

Pinheiro AM, Costa MF, Paule B, Vale V, Ribeiro M, Nascimento I, Schaer RE, Almeida MA, Meyer R, Freire SM. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. Vet Parasitol. 2005; 130(1-2): 73-79.

Prelezov P, Koinarski V, Georgieva D. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in the Stara Zagora region. Bulg J Vet Med. 2008; 11: 113-119.

Ragozo AMA, Yai LEO, Oliveira LN, Dias RA, Gonçalves HC, Azevedo SS, Dubey JP, Gennari SM. Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil. J Parasitol. 2009; 95: 323-326.

Ragozo AM, Pena HF, Yai LE, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. Vet Parasitol. 2010; 170: 307-312.

Rahman M, Azad MT, Rouf SM, Ohya K, Chiou SP, Baba B, Kitoh K, Takashima Y. Age-specificity of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in sheep, goats and cattle on subsistence farms in Bangladesh. J Vet Med Sci. 2014; 76: 1257-1259.

Rahman M, Alauddin, Mozaffor Hossain KM, Hemayetul Islam Md, Kitoh K, Nagamure K, Takashima Y. Prevalence and dynamics of antibodies against *Toxoplasma gondii* in kids born from naturally infected goats. Parasitol Int. 2015; 64: 389-391.

Rajendran C, Su C, Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. Infect Genet Evol. 2012; 12 (2): 359-368.

Ramzan M, Akhtar M, Muhammad F, Hussain H, Hyszczynska-Sawicka, Haq AU, Mahmood MS, Hafeez MA. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Rahim Yar Khan (Punjab), Pakistan. Trop Anim Health Prod. 2009; 41(7): 1225-1229.

Rawall BD. Toxoplasmosis. A dye-test on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1959; 53: 61-63.

Rêgo WMF, Costa JGL, Baraviera RCA, Pinto LV, Bessa GL, Lopes REN, Vitor RWA. Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. *Vet Parasitol.* 2017; 247: 19-25.

Reis CR, Lopes FMR, Freire RL, Gonçalves DD, Garcia JL, Navarro IT. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in caprines from Pitanga city, Paraná State, Brazil. *Braz J of Vet Res An Sci.* 2007; 44(5): 358-363.

Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* 2003; 3: 7.

Riemann HP, Meyer ME, Theis JH, Kelso G, Behymer DE, Daviis BS. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J Pediat.* 1975; 87(4): 573-576.

Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 476-488.

Rodger SM, Maley SW, Wright SE, Mackellar A, Wesley F, Sales J, Buxton D. Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep. *Vet Rec.* 2006; 159: 768-772.

Rodriguez C, Afchain D, Capron A, Dissous C, Santoro F. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur J Immunol.* 1985; 15(7): 747-749.

Rossanigo CE, Frigerio KL, Silva Colomer J. La cabra criolla sanluiseña, Información técnica para pequeños productores. Información técnica N°135. INTA Villa Mercedes. 1999. www.produccion-animal.com.ar.

Rossanigo CE, Venturini L, Venturini MC, Bacigalupe D, Unzaga JM. Toxoplasmosis caprina en majadas de San Luis. XIV Reunión Científico Técnica AAVLD. 2000. PAR-08.

Saad NM, Hussein AAA, Ewida RM. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in raw goat, sheep, and camel milk in Upper Egypt. *Vet World*. 2018; 11(9): 1262-1265.

Saavedra G, Ortega Y. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from slaughterhouses in Lima, Perú and Georgia, USA. *J Parasitol*. 2004; 90: 902-904.

Sabin A, Cincinnati MD. Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA*. 1941; 116: 9.

Sacks JJ, Roberio RR, Brooks NF. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *J Am Med Assoc*. 1982; 248: 1728-1732.

Saffer LD, Mercareau-Puijalon O, Dubrematz JF, Schwartzman JD. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool*. 1992; 39: 526-530.

Sager H, Gloor M, Tenter A, Maley S, Hassig M, Gottstein B. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol Res*. 2003; 91: 171-174.

Samad MA, Rahman KB, Halder AK. 1993. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic ruminants in Bangladesh. *Vet Parasitol*. 1993; 47(1): 157-159.

Sánchez, C. Caracterización del territorio Noroeste de la provincia de Córdoba. Ediciones INTA. Estación Agropecuaria Manfredi. Córdoba, AR. 2013.

Santoro F, Afchain D, Pierce R, Cesbron JY, Ovlaque G, Capron A. Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). Clin Exp Immunol. 1985; 62: 262-269.

Satbige AS, Vijaya Bharathi M, Ganesan PI, Sreekumar C, Rajendran C. Detection of *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Chennai using PCR and modified direct agglutination test. J Parasit Dis. 2016; 4: 1466-1469.

Secretaría de Agroindustria. Ministerio de Producción y Trabajo, Presidencia de la Nación. Caracterización de los sistemas de producción caprina en la provincia de Córdoba. 2002. www.minagri.gob.ar/sitio/areas/caprinos/ley_caprina/informes/index.php.

Secretaría de Agroindustria. Ministerio de Producción y Trabajo, Presidencia de la Nación. Caracterización del sector caprino en Argentina. 2011. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/procal/estudios/04_Caprino/SectorCaprino_Argentina.pdf.

Sella MZ, Navarro JT, Vidotto O, Freire RL, Shida PN. Epidemiologia da toxoplasmose caprina: levantamento sorologico do *Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros na micro regioao de Londrina, Parana, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet. 1994; 3: 13-16.

Sharif M, Gholami S, Ziae H, Daryani A, Laktarashi B, Ziapour SP, Rafiei A, Vahedi M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. *Vet J.* 2007; 174: 422-424.

Sharif M, Sarvi SH, Shokri S, Hosseini Teshnizi S, Rahimi MT, Mizani A, Ahmadpour E, Daryani A. *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res.* 2015; 114: 1–16.

Shuralev EA, Shamaev ND, Mukminov MN, Nagamune K, Taniguchi Y, Saito T, Kitoh K, Arleevskaya MI, Fedotova AY, Abdulmanova DR, Aleksandrova NM, Efimova MA, Yarullin AI, Valeeva AR, Khaertynov KS, Takashima Y. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats, cats and humans in Russia. *Parasitol Int.* 2018; 67(2): 112-114.

Sibley L D, Krahenbuhl J L, Adams GMW, Weidner E. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J Cell Biol.* 1986; 103: 867-874.

Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 1995; 108: 1667-1677.

Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002; 357 (1417): 81-88.

Silva NM, Lourenco EV, Silva DA, Mineo JR. Optimisation of cut-off titres in *Toxoplasma gondii* specific ELISA and IFAT in dog sera using immunoreactivity to SAG-1 antigen as molecular marker of infection. *Vet J.* 2002; 163: 94-98.

Silva AV, Cunha ELP, Meireles LR, Gottscalk S, Mota RA, Langoni H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudos seroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Cienc Rural.* 2003; 33: 115-119.

Silva DAO, Lobato J, Mineo TWP, Mineo JR. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.* 2007; 143: 234-244.

Silva Filho MF, Erzinger E, Cunha IAL, Bugni FM, Hamada FN, Marana ERM, Freire RL, Garcia JL, Navarro IT. *Toxoplasma gondii*: abortion outbreak in a goatherd from Southern Brazil. *Semina Ciências Agrárias.* 2008; 29: 887-894.

Skinner LJ, Timperley AC, Wightman D, Chatterton JM, Ho-Yen DO. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goat owner's family. *Scand J Infect Dis.* 1990; 22: 359-361.

Slosárková S, Literák I, Skivánek M, Svobodová V, Suchý P, Herzig I. Toxoplasmosis and iodine deficiency in Angora goats. *Vet Parasitol.* 1999; 81: 89-97.

Spišák F, Turčková L, Reiterová K, Špilovská, Dubinský P. Prevalence estimation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in goats. *Biologia.* 2010; 65(4): 670-674.

Spósito Filha E, do Amaral V, Santos SM, Macruz R, Reboucas MM. *Toxoplasma gondii* em caprinos: Isolamento de cepas a partir de diafragmas de animais oriundos do estado da bahiae abatidos em matadouros de Sao Paulo-Brasil. O Biológico. 1983; 49: 199-206.

Sreekumar C, Rao JR, Mishra AK, Ray D, Joshi P, Singh RK. Detection of toxoplasmosis in experimentally infected goats by PCR. Vet Rec. 2004; 154(20): 632-635.

Sroka J, Kusyk P, Bilska E, Karamon J, Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Stojek K, Różycki M, Cencek T. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. Folia Parasitologica. 2017; 64: 023.

Staubli D, Nunez S, Sager H, Schares G, Gottstein B. *Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. Parasitol Res. 2006; 99: 648-658.

Stormoen M, Tharaldsen J, Hopp P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Norwegian dairy goats. Acta Vet Scand. 2012; 54: 75.

Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. Int J Parasitol. 2006; 36: 841–848.

Swai ES, Kaaya JE. A survey of *Toxoplasma gondii* antibodies by latex agglutination assay in dairy goats in Northern Tanzania. Trop Anim Health Prod. 2013; 45(1): 211-217.

Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988; 240: 1285-1293.

Tavassoli M, Esmailnejad B, Malekifard F, Soleimanzadeh A, Dilmaghani M. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Sheep and Goat Milk in Northwest of Iran by PCR-RFLP. *Jundishapur J Microbiol*. 2013; 6(10): e8201.

Tegegne D, Kelifa A, Abdurahaman M, Yohannes M. Seroepidemiology and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Southwestern Ethiopia. *BMC Vet Res*. 2016; 12(1): 280.

Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2009; 104 (2): 364-369.

Tenter AM, Luton K, Johnson AM. Species-specific identification of *Sarcocystis* and *Toxoplasma* by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. *Appl Parasitol*. 1994; 35(3): 173-188.

Tenter A, Heckeroth A, Weiss L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000; 30: 1217-1258.

Teshale S, Dumetre A, Dardé ML, Merga B, Dorchies O. Serological survey of caprine toxoplasmosis in Ethiopia: prevalence and risk factors. *Parasite*. 2007; 14: 155-159.

Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology*, 3rd Edition. Blackwell Science Limited. USA. 2007.

Tilahun B, Tolossa YH, Tilahun G, Ashenafi H, Shimelis S. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among domestic ruminants in East Hararghe Zone of Oromia Region, Ethiopia. *Vet Med Int.* 2018; 2018: 4263470.

Tizard IR. *Veterinary immunology*. 8th ed. Barcelona, España. Elsevier. 2009.

Topazio JP, Weber A, Camilo G, Flores Vogel F, Machado G, Ribeiro A, Barbosa Moura A, Samia Lopes L, Tonin AA, Solda NM, Braunig P, Schafer da Silva A. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in goats in Santa Catarina state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014; 23: 360-366.

Trees AJ, Williams D. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 2005; 21(12): 558-561.

Tzanidakis N, Maksimov P, Conraths FJ, Kiossis E, Brozos C, Sotiraki S, Schares G. *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. *Vet Parasitol.* 2012; 190: 340-348.

Unzaga JM, Venturini L, Bacigalupe D, Venturini MC, Basso W, Rambeaud M. Detección de anticuerpos anti- *Toxoplasma gondii* en cabras mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de aglutinación modificada. 1999. En XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología.

Unzaga JM, Moré G, Bacigalupe D, Rambeaud M, Pardini L, Dellarupe A, De Felice L, Gos ML, Venturini MC. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goat abortions from Argentina. *Parasitol Int.* 2014; 63: 865-867.

Uzêda RS, Pinheiro AM, Fernández SY, Ayres MCC, Gondim LFP, Almeida MAO. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. *Small Rumin Res.* 2007; 70: 257-259.

van den Brom R, Lievaart-Peterson K, Luttikholt S, Peperkamp K, Wouda W, Vellema P. Abortion in small ruminant in the Netherlands between 2006 and 2011. *Tijdschr Diegerneesk.* 2012; 137: 450-457.

van der Puije WNA, Bosompem KM, Canacoo EA, Wastling JM, Akanmori BD. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. *Acta Trop.* 2000; 76: 21-26.

van Engelen E, Luttikholt S, Peperkamp K, Vellema P, van den Brom R. Small ruminants abortions in the Netherlands during lambing season 2012–2013. *Vet Rec.* 2014; 174(20): 506.

Velmurugan GV, Tewari AK, Rao JR, Baidya S, Kumar M, Mishra, AK. High-level expression of SAG1 and GRA7 gene of *Toxoplasma gondii* (Izatnagar isolate) and their application in serodiagnosis of goat toxoplasmosis. *Vet Parasitol.* 2008; 154: 185-192.

Venturini L, Omata Y, Vignau ML, Venturini MC, Bedotti D. Anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en cabras. *Rev Med Vet.* 1993; 74: 16ed.

Venturini MC, Bacigalupe D, Venturini L, Machuca M, Perfumo CJ, Dubey JP. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stillborn piglets in Argentina. *Vet Parasitol.* 1999; 85: 331-334.

Venturini L, Unzaga JM, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Calvetty Ramos M, Machuca M, Lacchini R. *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*: su relación con abortos en cabras. III Congreso Argentino de Parasitología. p 485.

Venturini MC, Bacigalupe D, Venturini L, Rambeaud M, Basso W, Unzaga JM, Perfumo CJ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and an outdoor farm in Argentina. *Vet Parasitol.* 2004; 124: 161-165.

Vera T, Ricarte A, Díaz RF. Recursos genéticos caprinos de la República Argentina: la cabra criolla de La Rioja. Publicaciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Catamarca-La Rioja. Estación Experimental Agropecuaria La Rioja "Ing. Juan Carlos Vera". 2016. www.inta.gov.ar/documentos/la-cabra-criolla-de-la-rioja.

Vitor RWA, Ferreira AM, Fux B. Antibody response in goats experimentally infected with *T. gondii*. *Vet Parasitol.* 1999; 81: 259-263.

Walsh CP, Hammond S E, Zajac AM, Lindsay DS. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. *J Eukaryot Microbiol.* 1999; 46(5): 73S-74S.

Wang CR, Qiu JH, Gao JF, Liu LM, Wang C, Liu Q, Yan C, Zhu XQ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats in northeastern China. *Small Rumin Res.* 2011; 97: 130-133.

Ware PL, Kasper LH. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1987; 55: 778.

Wastling JM, Harkins D, Buxton D. Western Blot analysis of the IgG response of sheep vaccinated with S48 *Toxoplasma gondii* (Toxovax). Res Vet Sci. 1994; 57: 384-386.

Wastling JM, Harkins D, Maley S, Innes E, Paton W, Thomson K, Buxton D. Kinetic of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. J Comp Pathol. 1995; 112: 53-62.

Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii* The model apicomplexan: perspectives and methods. ed. Elsevier Ltd. 2007.

Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009; 39: 895-901.

Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. Parasitology. 2005; 130: 301–307.

Windeck T, Gross U. *Toxoplasma gondii* strain specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. Parasitol Res. 1996; 82: 715-719.

Xu P, Li X, Tang F, Liu YH, Kou X, Zhao ML, Li B, Guo L, Liu XG, Zhao Q. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Jinzhou, Northeastern China. Trop Biomed. 2015; 32(3): 563-567.

Yaglom HD, Rottinghaus AA, Pithua P. Evidence of *Toxoplasma gondii* exposure in Boer goat herds in Missouri, USA. Zoonoses Public Health. 2014; 61(6): 395-397.

Zewdu E, Agonafir A, Tessema TS, Tilahun G, Medhin G, Vitale M, Di Marco V, Cox E, Vercruyse J, Dorny P. Seroepidemiological study of caprine toxoplasmosis in East and West Shewa Zones, Oromia Regional State, Central Ethiopia. *Res Vet Sci.* 2013; 94(1): 43-48.

Zhao GH, Zhang MT, Lei LH, Shang CC, Cao DY, Tian TT, Li J, Xu JY, Yao YL, Chen DK, Zhu XQ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy goats in Shaanxi Province, Northwestern China. *Parasit Vectors.* 2011; 4: 47.

Zhou Z, Wu Y, Chen Y, Wang Z, Hu S, Zhou R, Dong C, Lin H, Nie K. Molecular and serological prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Anaplasma* spp. infection in goats from Chongqing Municipality, China. *Parasite.* 2018; 25: 20.

ANEXOS DE TÉCNICAS

Anexo 1: Cultivo de *T. gondii* en células VERO

Soluciones y reactivos utilizados:

Medio RPMI 1640 con glutamina (PAA Laboratories, Austria, N° catálogo: E15-840); Suero fetal bovino (SFB) (PAA Laboratories, Austria, N° catálogo: A15-042); Tripsina-EDTA (10x) (PAA Laboratories, Austria, N° catálogo: L11-003); Solución antibiótico-antimicótico (100x) (PAA Laboratories, Austria, N° catálogo P11); Solución buffer de fosfatos (PBS).

Solución buffer de fosfatos (PBS)

Solución madre:

40 g Cloruro de sodio (NaCl)

1 g Cloruro de potasio (KCl)

5,75 g Fosfato disódico (Na_2HPO_4)

1 g Fosfato de potasio (KH_2PO_4)

Completar con agua destilada hasta 500 ml

Para la solución de trabajo (1x) se utiliza la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final es de 7,2.

Procedimiento

1. Las células VERO (células de riñón de mono verde africano) se cultivan en botellas de 25 cm³ (CELLSTAR, Greiner Bio One International GmbH N° catálogo: 690170) con 5 ml de medio RPMI 1640 con glutamina, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) para crecimiento o 3 % SFB para mantenimiento, con 1 % de solución de antibióticos (penicilina-estreptomicina) y antimicóticos (anfotericina B) comerciales.
2. Una vez observada la formación de una monocapa, se descarta el medio de la botella y se agrega PBS pH 7,2 estéril y se enjuaga, luego se elimina el PBS.
3. Se agrega 2,7 ml de PBS y 0,3 ml de Tripsina-EDTA sol. 10x (5 g de tripsina/l 1:250, 2g EDTA/l) y se incuba a 37° C 30 min.
4. Una vez desprendidas las células se completa hasta 5 ml con RPMI.
5. Se Coloca 1 ml de esa suspensión en cada nueva botella de cultivo con 5 ml de medio con 10 % de SFB colocado previamente.
6. Se incubar a 37° bajo una atmósfera con 5 % de CO₂.
7. Las células se multiplican una vez por semana. En dos a cinco días puede estar formada la monocapa.
8. Los cultivos se infectan luego de que está formada la monocapa (5-7 días). Se inoculan las botellas con 0,2 ml del sobrenadante de una botella previamente infectada con la cepa de referencia RH mantenida en el Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP.

Anexo 2: Preparación de antígeno para la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta

Procedimiento:

1. Se colecta en un tubo de centrífuga el sobrenadante de una botella infectada donde se observa que los taquizoítos han roto el 80 % de la monocapa celular. La monocapa se levanta con un raspador estéril (Greiner Bio One International GmbH).
2. Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.
3. Se descartar el sobrenadante y se resuspende en 5 ml de PBS. Se vuelve a centrifugar. Se repite este último paso tres veces.
4. Los taquizoítos se inactivan con 1 % de formol durante 15 minutos. Se lava con PBS tres veces, centrifugando y resuspendiendo el pellet cada vez a 3000 rpm durante 10 minutos.
5. Se cuentan los taquizoítos obtenidos en una cámara de Neubauer y se resuspende en PBS en una dilución aproximada de 1×10^7 taquizoítos/ml.
6. Se colocan 10 μ l de la suspensión en cada pocillo del portaobjetos de 15 áreas (MP Biomedicals, Santa Ana, EE.UU) y se deja secar a temperatura ambiente.
7. Se conservan los portaobjetos con el antígeno a -20° C.

Anexo 3: Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta

Soluciones utilizadas:

Solución buffer de fosfatos (PBS) (Anexo 1)

Solución buffer de carbonatos

Solución madre:

11,4 g Carbonato de sodio (Na_2CO_3)

33,6 g Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

8,5 g Cloruro de sodio (NaCl)

Completar con agua destilada hasta 500 ml

Para la solución de trabajo (1x) se utiliza la solución madre diluida 1:4 en agua destilada. El pH final es de 9.

Líquido de montaje (glicerina al 10 %) para *T. gondii*

Se preparan 10 ml de la solución:

9 ml de PBS (1x)

1 ml de Glicerina

Líquido de montaje (glicerina al 50 %) para *N. caninum*

Se preparan 10 ml de la solución:

5 ml de carbonato (1x)

5 ml de Glicerina

Conjugado: Conjugado anti-Ig G de cabra FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU, N° de Catálogo: F7367).

Procedimiento:

1. Se dejan secar los portaobjetos con el antígeno a temperatura ambiente.
2. Se realiza la dilución de los sueros problemas y los sueros controles positivos y negativos en PBS 1x en placas de 96 pocillos con fondo en U. Para ellos se colocan 100 µl de PBS 1x en todos los pocillos excepto en el primero en el que se colocan 192 µl de PBS. Luego se colocan 8 µl de suero en el primer pocillo (para obtener la dilución inicial de 1:25) y se hacen las diluciones pasando 100 µl desde el primer pocillo en adelante (en base 2 hasta dilución final). Para los sueros/líquidos fetales en el primer pocillo se diluyen 20 µl del suero en 180 µl de PBS (para obtener la dilución inicial de 1:10).
3. Se colocan las diluciones de los sueros problemas y de los controles en los portaobjetos.
4. Se incuba el antígeno con los sueros a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
5. Luego se realiza el lavado con PBS 1x 3 veces: 10 minutos, 5 minutos y 3 minutos, en agitador, cambiando la solución cada vez. Para la IFI de *N. caninum* se lava con carbonato 1x.
6. Se incuba con el conjugado anti-Ig G de cabra marcado con fluoresceína por 30 minutos a 37° C, en cámara húmeda.

7. Se repiten los lavados con PBS 1x 3 veces: 10 minutos, 5 minutos y 3 minutos, en agitador, cambiando la solución cada vez. Para la IFI de *N. caninum* se lava con carbonato 1x.
8. Se monta con glicerina al 10 % en buffer de PBS para la IFI de *T. gondii* y con glicerina al 50 % en buffer de carbonato para la IFI de *N. caninum*.
9. Se observa con microscopio de epifluorescencia con los objetivos de 20 y 40x (Leica, Wetzlar, Alemania) en cuarto oscuro.

Para cada rutina se usó como control positivo suero de cabras infectadas naturalmente y como control negativo sueros precalostrales. Se consideró como resultado positivo cuando se observó fluorescencia completa en toda la superficie de los taquizoítos.

Anexo 4: Elaboración de geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12,5 %)

Soluciones utilizadas:

Solución A: Buffer Tris-HCl 0,5 M (buffer para gel concentrador o de siembra)

6,06 g Tris (hydroxymethyl)-aminometanol

4 ml 10 % SDS

Completar con agua destilada hasta 100 ml

La solución debe tener un pH de 6,8 (Ajustar el pH con HCl 1M). Se guarda en frasco color caramelo en heladera.

Solución B: Buffer Tris-HCl 1,5M (buffer para gel separador o de corrida)

18,17 g tris (hydroxymethyl)-aminometanol

4 ml 10 % SDS

Completar con agua destilada hasta 100 ml

La solución debe tener un pH de 8,8 (Ajustar el pH con HCl 1M). Se guarda en frasco color caramelo en heladera.

Solución C: Solución stock de acrilamida

30 g acrilamida

0,8 g N,N'-methylen-bis (acrilamida)

Completar con agua destilada hasta 100 ml

Preparar en vaso de precipitado, agitar hasta disolución y guardar en frasco color caramelo, protegido de la luz (envuelto con papel aluminio) en heladera. Utilizar con cuidado debido a la neurotoxicidad de los compuestos.

SDS al 10 %

Disolver 5 g de SDS (dodecilsulfato sódico) en un volumen total de 50 ml de agua destilada en vaso de precipitado o Erlenmeyer en agitación. Guardar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

Amonio persulfato (APS) 30 %

Nº de catálogo: 161-0754 (Biorad, California, EE.UU) preparado en agua destilada.

Se guarda en alícuotas a -20°C.

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)

Nº de catálogo: 161-0800 (Biorad, California, EE.UU).

Se guarda a temperatura ambiente protegido de la luz.

Buffer de electroforesis (5x) (buffer de corrida)

15,2 g tris (hydroxymethyl)-aminometanol

72,1 g glicina

5 g SDS

Completar con agua destilada hasta 1000 ml

Se guarda en frasco color caramelo en heladera. La solución de trabajo se prepara al 1x en agua destilada.

Se utilizan las siguientes cantidades de soluciones suficientes para elaborar 2 minigeles de 60mm x 70 mm x 1 mm cada uno:

1. Mezcla de soluciones para gel de corrida:

- a. Solución B: 2,5 ml
- b. Solución C: 4,2 ml
- c. Agua destilada: 3,3 ml
- d. TEMED: 10 μ l
- e. APS al 30 %: 50 μ l

2. Mezcla de soluciones para gel de siembra:

- a. Solución A: 1,5 ml
- b. Solución C: 0,7 ml
- c. Agua destilada: 3,6 ml
- d. TEMED: 5 μ l
- e. APS al 30 %: 20 μ l

Procedimiento:

1. Se arman las placas de vidrio de la cuba electroforética vertical (ENDURO™ Vertical PAGE System, Labnet International, Inc., Nueva York, EE.UU) y se llenan con agua destilada hasta el momento del armado de los geles.
2. Se mezclan las soluciones correspondientes al gel de corrida (1) en el orden indicado anteriormente en un vaso de precipitado de vidrio.
3. Se descarta el agua destilada de la cuba y se procede a cargar rápidamente la solución del gel de corrida entre los vidrios hasta completar $\frac{3}{4}$ de la cuba. Se completa el resto con agua destilada para evitar la formación de burbujas y nivelar el borde del gel.
4. Se deja polimerizar durante 30 minutos a temperatura ambiente con luz directa para favorecer la polimerización.
5. Se mezclan las soluciones correspondientes al gel de siembra (2) en el orden indicado anteriormente en un vaso de precipitado de vidrio.
6. Se descarta el agua destilada de la parte superior de la cuba por inversión y se carga la solución del gel de siembra hasta el tope de la cuba.
7. Se coloca el peine con cuidado de no formar burbujas (con una calle de 3 mm de ancho para sembrar el marcador de peso molecular y una calle de 60 mm de ancho continua para sembrar el antígeno posteriormente).

8. Se deja polimerizar durante 30 minutos a temperatura ambiente con luz directa.
9. Se retira el peine y se limpian los restos de gel presentes en las calles con papel secante.
10. Se colocan las placas de vidrio con los geles en el aparato de electroforesis y se llena con buffer de electroforesis 1x. Llevar a heladera overnight.

Anexo 5: Elaboración y siembra del antígeno para la prueba de *Immunoblot*

Soluciones utilizadas:

Buffer de muestra no reducido (5x)

3,75 g tris (hydroxymethyl)-aminometanol

10 g SDS

35 ml glicerina

25 mg azul de bromofenol

Completar con agua destilada hasta 100 ml

La solución debe tener un pH de 8,8 (Ajustar el pH con HCl 1M). Se guarda en alícuotas en tubos de 15 ml en freezer. La alícuota en uso se mantiene a temperatura ambiente.

Marcador de peso molecular

Se utilizó el marcador Prestained SDS-PAGE Standard, low range (Biorad, California, EE.UU, N° de catálogo: 161-0305). Se mantiene guardado en alícuotas de 20 µl a -20°C.

Procedimiento:

1. Se obtienen taquizoítos de cepas RH de *T. gondii* proveniente de cultivos celulares.
2. Se pasan por filtros de PVDF de 5 μ (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
3. Se cuentan los taquizoítos en cámara de Neubauer para determinar la concentración y se coloca todo el contenido en un tubo de 15 ml.
4. Se centrifugan a 3000 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 1 ml de PBS 1x estéril y se pasa a un eppendorf de 1,5 ml.
5. Se centrifuga nuevamente a 3000 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante.
6. Se dejar secan los pellets al aire debajo del flujo laminar.
7. Se arma un stock de pellets que se conservan así hasta su uso a -20°C.
8. Al momento del uso, se descongela el pellet de taquizoítos a temperatura ambiente y se resuspende en agua destilada (150 μ l de agua destilada para 2×10^7 taquizoítos totales por membrana a realizar).
9. El eppendorf con la solución de taquizoítos se coloca en un vaso de precipitado con hielo y se somete a sonicado con un sonicador

(Omni Sonic Ruptor International, Kennesaw, EE.UU, Código: OR250-220) realizando 50 ciclos de 1 minuto cada uno 3 veces.

10. Se observa una gota del sonicado al microscopio óptico para confirmar la ruptura de los parásitos.
11. Se toma la cantidad necesaria de volumen de de acuerdo al número de membranas que se vayan a realizar (150 μ l/membrana) y se vuelve a congelar el sobrante.
12. Se agrega 50 μ l de Buffer de muestra (5x) a la suspensión de taquizoítos sonicados y se lleva a baño seco a 95°C por 5 minutos junto al marcador de peso molecular.
13. Se siembra en el gel: 10 μ l del marcador de peso molecular en la calle chica y 200 μ l del antígeno en el buffer de siembra en la calle continua.
14. Correr el gel a 150 voltios y una potencia de 75 mA durante 1 hora y 30 minutos.

Anexo 6: Inmunotransferencia del antígeno de *Immunoblot*

Soluciones utilizadas:

Buffer de transferencia (buffer aniónico)

3,03 g tris (hydroxyl-methyl)aminomethanol

200 ml methanol

Completar con agua destilada hasta 1000 ml.

Metanol

Se utiliza el comercial.

Solución de Tinta china

500 ml de PBS (1X)- 0,05 % Tween20

0,5 ml de tinta china (marca PELIKAN FOUNT INDIA, Alemania)

5 ml de ácido acético (CH₃-COOH) (M= 60.05 g/ mol)

El ácido acético debe incorporarse al final. Conservar en frasco color caramelo a temperatura ambiente. Agitar antes de usar.

Solución de bloqueo

PBS (1x)- 0,05 % Tween20

2 % de gelatina de pescado (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU, N° de catálogo G7765)

Procedimiento:

1. Se cortan papeles de filtro de 10 x 7,5 cm (Filtros Gel Blot Paper 15 cm x 20 cm, N° de catálogo: GB003) y membranas de PVDF 7,5 x 8,5 cm (Millipore Immobilon-P Membrane, Billerica, EE.UU, N° de catálogo: IPVH00010) (de acuerdo al tamaño del gel).
2. Se sumergen 6 filtros por membrana en una placa con buffer de transferencia.
3. Se coloca la membrana en una placa con metanol puro para activarla, luego se lava con agua destilada y por último se sumerge en una placa con buffer de transferencia.

4. Colocar 3 filtros embebidos en el piso del aparato de transferencia (transbloteador semiseco), por encima se coloca la membrana y por último el gel.
5. Por último colocar 3 filtros más embebidos en buffer y quitar las burbujas.
6. Realizar la transferencia a una potencia de 50 mA y 120 voltios durante 1 hora y 30 minutos.
7. Luego de la corrida, cortar el extremo de la membrana donde se ubica el marcador de peso molecular y guardarlo a -20°C . También se recortan ambos extremos de la membrana y se colocan en una placa en agitación con la solución de tinta china hasta su tinción para corroborar que la transferencia de las proteínas ha sido correcta y que toda la membrana presenta antígeno.
8. La membrana se coloca en solución de bloqueo por 30 minutos y posteriormente se deja secar sobre papel secante en flujo laminar.
9. Se guarda hasta su uso a -20°C envuelta en papel de aluminio junto a su respectivo peso molecular.

Anexo 7: Prueba de *Immunoblot*

Soluciones utilizadas:

Solución de bloqueo

PBS 1x- 0,05 % Tween20

2% de gelatina de pescado (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU N^o de catálogo G7765)

La gelatina de pescado se guarda en heladera. Sacar al momento de la preparación hasta que alcance la temperatura ambiente. Mezclar 100 ml de PBS 1x con 50 µl de Tween 20 y 2 ml de gelatina de pescado. En agitador hasta disolución completa.

Solución de lavado

PBS 1x- 0,05 % Tween20

Preparar 100 ml de PBS 1x con 50 µl de Tween 20. Mezclar por inversión.

Conjugado

Conjugado anti- Ig G de cabra con peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU, N° de catálogo: A8919) diluido 1:1000 en PBS 1x.

Solución de revelado (sustrato)

30 mg 4-chloro-1-naphthol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU, N° de catálogo: 6788)

10 ml metanol

30 ml PBS 1x

40 µl 30% H₂O₂

Se diluye la pastilla de cloronaftol en 10 ml de metanol y se guarda en heladera.

Al momento del uso, se toma el volumen necesario según la cantidad de muestras a procesar manteniendo la relación: 1 ml de cloronaftol en metanol- 3 ml de PBS 1x - 4 µl de H₂O₂. El PBS que se utiliza debe mantenerse en heladera para que al momento de mezclarse se encuentre frío. El agua oxigenada se agrega a último momento. La mezcla se prepara en tubo de vidrio.

Procedimiento:

1. Se descongela la membrana del antígeno y se cortar en tiras de aproximadamente 3-4 mm de ancho (con mini-guillotina) y se numeran según la cantidad de sueros a realizar. Cortar además una tira para el control positivo y otra tira para el control negativo. Las tiras se colocan en un dispositivo de acrílico con múltiples pocillos.
2. Se incuban las tiras con 500 μ l por pocillo de solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
3. Se descarta la solución de bloqueo.
4. Se coloca 495 μ l de solución de bloqueo sobre las tiras y se agrega 5 μ l de los sueros problemas y controles para lograr la dilución 1:100.
5. Se incuba por una hora a temperatura ambiente y en agitación.
6. Se descartan los sueros y se lavan las tiras 5 veces con solución de lavado por 2 minutos cada lavado.
7. Se coloca 500 μ l del conjugado diluido 1:100 en PBS 1x sobre cada tira y se incuba por una hora a temperatura ambiente y en agitación.
8. Se descarta el conjugado y se lavan las tiras 3 veces con solución de lavado y 2 veces más con PBS 1x por 2 minutos cada lavado.
9. Se incuba con 500 μ l de solución de revelado sobre cada tira por 20 minutos (o menos tiempo si las bandas se hacen visibles en el control positivo).

10. Se descarta la solución de revelado (en descartador especial para líquidos tóxicos) y se detiene la reacción con agua destilada dejándola por 2 minutos en agitación sobre las tiras.
11. Se sacan las tiras y se colocan sobre papel secante protegidas de la luz hasta que estén secas y se puedan observar las bandas.

Anexo 8: Prueba de ELISA-TgSAG1 (P30)

Soluciones utilizadas:

Solución A: Solución de pegado

0,1 M bicarbonato de sodio

Se preparan 0,125 g de NaHCO_3 en 15 ml de agua destilada. La solución debe tener un pH de 8,3 (de ser necesario ajustar con ácido clorhídrico 1M).

Solución B: Solución de lavado

PBS 1x- 0,05% Tween 20

Preparar 500 ml de PBS 1x y agregar 250 μl de Tween 20. Mezclar por inversión.

Solución C: Solución de bloqueo (buffer de dilución de muestra)

PBS 1x- 0,05 % Tween 20 con 20 % de suero equino

Tomar 34 ml de la solución de lavado y agregarle 6,8 ml de suero equino.

Solución D: Buffer de sustrato

0,19 g sodio acetato ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)

0,5 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

12 ml agua destilada

Disolver en vaso de precipitado. Al momento de usar agregar 120 μl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y 2 μl de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Solución E: Solución STOP

Acido sulfúrico 4N

Mezclar 0,5 ml de ácido sulfúrico con 9,5 ml de agua destilada en tubo de vidrio.

Conjugado

Conjugado Anti-Ig G de cabra con peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU, N° de catálogo: A8919) diluido 1:4000 en PBS 1x- 0,05 % Tween 20 con 1 % de suero equino. Tomar 12 ml de la solución de lavado y agregar 120 μl de suero equino y 3 μl del conjugado. Preparar en tubo de vidrio.

Procedimiento:

1. Se realiza la dilución de la proteína p30 1:200 en la solución de lavado en un tubo de vidrio (75 μl de proteína en 15 ml de solución).
2. Se sensibilizan las placas de ELISA de 96 pocillos (Polysorp-Immunon-Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU) con 120 μl /pocillo de la proteína p30 diluida (concentración de 12ng/pocillo).
3. Se incuba la placa tapada por 1 hora a 37°C.
4. Se descarta el exceso y se procede a realizar 3 lavados colocando 300 μl de la solución de lavado/pocillo cada vez, sacudiendo fuerte cada vez que se descarta el líquido.

5. Se colocan 100 μ l/pocillo de la solución de bloqueo y se incuba la placa tapada por 30 minutos a 37°C.
6. Se diluyen los sueros caprinos problemas y los controles 1:100 en solución de bloqueo en eppendorf de 0,5 ml rotulados (5 μ l de suero en 495 μ l de la solución).
7. Posteriormente se vacian los pocillos de la placa de ELISA y se agrega 100 μ l de los sueros problemas y los controles en los pocillos por duplicado. En el pocillo del blanco colocar 100 μ l de la solución de bloqueo. Se incuba por 30 minutos a 37°C.
8. Se lava 3 veces con 300 μ l/pocillo de solución de lavado cada vez, sacudiendo fuerte cada vez que se descarta el líquido.
9. Se agregan 100 μ l/pocillo del conjugado diluido 1:4000 y se incuba 30 minutos a 37°C.
10. Se lava 3 veces con 300 μ l/pocillo de solución de lavado cada vez y se realizan 2 lavados más con 300 μ l/pocillo de agua destilada, sacudiendo fuerte cada vez que se descarta el líquido.
11. Se agregan 100 μ l/pocillo del sustrato y se incuba por 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente (tapado con papel aluminio).
12. Se detiene la reacción agregando 50 μ l/pocillo de la solución stop.
13. Se miden los valores de densidad óptica (OD) en un lector de ELISA (Thermo, Labsystems MS Multiskan, Waltham, EE.UU) con un filtro de 450nm (con filtro de referencia 620nm).

Anexo 9: Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Soluciones utilizadas:

Proteinasa K:

Buffer de stock:

0,148 g Tris-HCl

0,02 g Cl₂Ca

20 ml de agua destilada ultrapura

La solución de stock debe tener un PH de 8. Se reconstituye la proteinasa K 100 gramos (Promega, Byodinamics, N° de Catálogo: V3021) en el buffer de stock. Se conserva fraccionada en freezer.

dNTPs:

Se mezclan 20 µl de cada dNTP (del set de dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100 mM, Promega, Byodinamics, N° de Catálogo: U1420) y 120 µl de agua destilada ultrapura (libre de DNAasas y RNAasas, Promega, Byodinamics, N° de Catálogo: P1193). Se conservan fraccionados en freezer.

Etanol 70 %:

Se mezclan 7 partes de alcohol etílico absoluto con 3 partes de agua destilada ultrapura. Se mantiene a temperatura ambiente.

Procedimiento:

1. Se realiza la extracción del ADN desde los diferentes tejidos con un kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega,

Byodinamics, Nº de Catálogo: A1120) acorde a las instrucciones del fabricante; en los siguientes pasos:

- a. Lisis del tejido: se toman pequeñas cantidades de la muestra de tejido (aproximadamente 25 mg) con un bisturí y se colocan en eppendorf de 1,5 ml debidamente rotulados. Se adicionan 500 µl de la solución de lisis nuclear del kit comercial y 20 µl de proteinasa K reconstituida en cada muestra. Las muestras se incuban baño maría a 55°C hasta que la muestra quede totalmente lisada (toda la noche). Durante la incubación mezclar en vortex para dispersar la muestra.
- b. Precipitación de proteínas: Se colocan las muestras en gradilla hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se adicionan 200 µl de la solución precipitadora de proteínas del kit a cada muestra. Se mezcla con vortex por 20 segundos. Luego se mantienen las muestras sobre hielo por 5 minutos. Se centrifugan por 4 minutos a 16000 g.
- c. Precipitación del ADN: Se remueve el sobrenadante anterior y se transfiere a eppendorf de 1,5 ml con 600 µl de alcohol isopropílico (Biopack). Se mezcla por inversión varias veces. Se centrifugan por 1 minuto a 16000g.
- d. Rehidratación del ADN: Se elimina el sobrenadante y se agrega alcohol etílico 70 % al pellet. Se mezcla por inversión 5 a 6 veces. Se centrifuga por 1 minuto a 16000g. Se descarta el sobrenadante

y se deja secar en baño maría a 55°C por 15 minutos. Luego se adicionan 100 µl de la solución de rehidratación del ADN del kit a cada muestra. Las muestras se dejan en heladera a 4°C hasta el día siguiente o bien, a 65°C por una hora si se continúa con la técnica de PCR en el día.

2. Preparación de la mezcla madre (*mastermix*):

- muestra de ADN: 1 µl
- 10x PCR buffer: 2,5 µl
- BSA: 20 µg/ ml
- MgCl₂: 0,75 mM
- Concentración primer TOX 5: 0,5 µM
- Concentración primer TOX 8: 0,5 µM
- Nucleótidos (dNTPs): 250 µM
- *Taq* ADN polimerasa: 5 U/100 µl
- Agua bidestilada hasta completar un volumen final de 25 µl.

Se multiplica el volumen de cada componente (excepto el ADN) por el número de muestras a procesar más 3 (controles positivo, negativo y remanente). Se realiza la mezcla en un tubo (*Mastermix*). Se mantienen y preparan todas las soluciones sobre hielo hasta cargar el termociclador. Se fracciona el *Mastermix* en microtubos de 0,2 ml a razón de 23 µl por microtubo en la habitación de *Mastermix*. Se carga el ADN en la habitación de extracción. En cada ciclo de amplificación

se colocaron como control positivo ADN de *T. gondii* (cepa RH) y como control negativo una muestra sólo con *mastermix* (NTC).

3. Se colocan los tubos en el termociclador (T18, IVEMA, Argentina) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 60 s), alineamiento (59°C, 60 s) y extensión (72°C, 60 s), y un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Anexo 10: Preparación de geles de agarosa y revelado de productos de PCR

Soluciones utilizadas:

Solución de buffer Tris Base EDTA (TBE)

Solución madre (5x):

54 g de Tris base

27,5 g de Ácido bórico

20 ml EDTA 0.5M (PH: 8)

Se completa hasta 1000 ml con agua destilada.

Se coloca en frasco de vidrio. Se mantiene a temperatura ambiente. La solución de trabajo se prepara con la solución madre al 0,5 % en agua destilada.

Geles de agarosa al 1,5 %:

Para preparar un gel de 17 calles:

0,45 g de Agarosa (Biodynamics, N° de Catálogo B030)

30 ml de Buffer TBE 0,5 %

3 μ l SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Catálogo N°de Catálogo s33102)

Pesar la agarosa y colocarla en un Erlenmeyer. Agregar el buffer TBE y llevar a microondas a potencia máxima hasta que comience la ebullición. Sacar del microondas y agitar suavemente hasta su completa disolución. Dejar entibiar y agregar el colorante Sybr Safe DNA, homogeneizar. Volcar el contenido en el molde para preparar el gel, colocar el peine y esperar hasta su gelificación completa protegido de la luz. Luego extraer el peine para poder sembrar las muestras.

Para un gel al 2,5 %: Para un gel de 17 calles mezclar 0,75 gr de agarosa + 30 ml de TBE 1X y 3 μ l de SYBR Safe. Para un gel al 3 %: Para un gel de 17 calles mezclar 0,9 gr de agarosa + 40 ml de TBE 1X y 4 μ l de SYBR Safe.

Procedimiento:

1. Se prepara un gel de agarosa al 1,5 %.
2. Se cargan 10 μ l de cada muestra+ 2 μ l de buffer de muestra coloreado (Byodinamics, N° de Catálogo BO60) en cada calle del gel. Utilizar el mismo volumen para el marcador de peso molecular (Promega, Byodinamics, N° de Catálogo G2101, 100 a 1500 pb).
3. El gel se coloca en cuba electroforética horizontal y se realiza una corrida electroforética a 120 voltios por 30 minutos o hasta que el colorante haya migrado de acuerdo al peso molecular buscado. Para la corrida, se llena la cuba con buffer TBE 1x (diluir 1 en 4 el buffer

TBE 5x). Controlar durante la misma que el buffer siempre cubra los geles.

4. Se observa en cuarto oscuro con un transiluminador de luz azul para poner en evidencia los fragmentos de ADN (Foto 4).

Anexo 11: Técnica de PCR anidada (*nested-PCR*) seguida de cortes con enzimas de restricción (RFLP)

Para realizar la genotipificación de *T. gondii* por PCR-RFLP se utilizan dos grupos de marcadores denominados nuevos y viejos. Los nuevos son: c22-8, L358, PK1, c29-2 y Apico. Los viejos son: nSAG2, BTUB, GRA6 y SAG3. En una primera etapa se realizan dos multiplex con primers externos para cada grupo de marcadores a partir del ADN extraído.

Procedimiento:

1. Se prepara el *mastermix* multiplex (ronda externa):

ADN muestra: 2,5 μ l

BSA: 20 μ g/ml

MgCl₂: 1,50 mM

Concentración del primer (I): 0,30 μ M

Concentración del primer (II): 0,30 μ M

Concentración de los dNTP: 250 μ M

Taq-polimerasa: 5 U/100 μ l

Agua bidestilada hasta completar un volumen final de 25 μ l.

2. Se colocan los tubos de PCR en el termociclador y se utiliza el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 4min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 30seg), alineamiento (55°C, 60 seg) y extensión (72°C, 2min) y una extensión final a 72°C por 5min.
3. En una segunda etapa se utilizan los primers internos para completar la nested-PCR. En este paso se toma ADN amplificado de la primera etapa y se agrupan las reacciones de la siguiente manera:

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

Se prepara el *mastermix* (ronda interna):

Volumen de ADN: 2,5 µl

BSA: 20 µg/ml

MgCl₂: 0,75 mM

Concentración del primer (I): 0,50 µM

Concentración del primer (II): 0,50 µM

Concentración de los dNTP: 250µM

Taq-polimerasa: 5 U/100 µl

Agua bidestilada hasta completar un volumen final de 25 µl.

4. Al finalizar la nested-PCR se realizan los cortes con enzimas de restricción en baño maría seco según el tiempo indicado para cada marcador y en la siguiente proporción de enzimas:

nSAG2: 37°C, 0,5 h 65°C, 0,5 h H2O 3,7 µl TaqI Puffer 1 µl TaqI 0,1 µl Bsh1285I 0,2 µl DNA 5 µl	BTUB: 37°C, 1 h 65°C, 1 h H2O 3,7 µl TaqI Puffer 1 µl TaqI 0,1 µl Bsh1285I 0,2 µl DNA 5 µl	GRA6: 65°C, 1 h H2O 3,9 µl R 1 µl Tru1I 0,1 µl DNA 5 µl
SAG3: 37°C, 1 h H2O 3,9 µl Tango Y 1 µl BcnI 0,1 µl DNA 5 µl	C22-8: 37°C, 0,5 h H2O 3,7 µl Tango 1 µl Alw26I 0,1 µl MboII 0,2 µl DNA 5 µl	L358: 37°C, 1 h H2O 3,7 µl R 1 µl BsuRI 0,1 µl Hin1II 0,2 µl DNA 5 µl
PK1: 37°C, 1 h H2O 3,8 µl Tango 1 µl Eco88I, RsaI 0,1 µl DNA 5 µl	Apico: 37°C, 1 h H2O 2,6 µl Tango 2 µl BspTI, HpyF3I 0,2 µl DNA 5 µl	c29-2: 37°C, 1 h 65°C, 1 h H2O 3,8 µl Tango 1 µl RsaI, Tail 0,1 µl DNA 5 µl

5. Se preparan los geles de agarosa al 2,5 % para todos los marcadores excepto para Apico que se utilizaron geles de agarosa al 3 %, teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Oregon, USA) y utilizado un marcador de pares de bases de 100bp (Ladder cada 100bp, 100-1000, Biodynamics, Argentina), se cargan las muestras y se realiza la electroforesis de los geles a 120 voltios por 30 minutos.
6. Los productos amplificados se observan en cuarto oscuro con un transiluminador de luz azul y se comparan los cortes con el patrón (Su *et al.*, 2006).

Anexo 12: Aislamiento de *T. gondii* en ratonesSolución fisiológica (ClNa al 0,85 %)

0,85 g de Cl Na

100 ml de agua destilada

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Procedimiento:

1. El material sospechoso (homogenato de snc) se resuspende con penicilina G potásica y estreptomycin (10.000 UI y 100 mg respectivamente por cada 100 ml).
2. Se inoculan los ratones por vía subcutánea utilizando agujas 25G (0,5 ml por ratón).
3. A la semana se realiza un lavado con 1 ml de solución fisiológica estéril la cavidad peritoneal. Se coloca una gota en un portaobjeto, se monta con cubreobjeto y se observa al microscopio. La ausencia de taquizoítos no indica necesariamente que el animal no se haya infectado.
4. Los ratones se observan hasta los 30 días p.i. Se controlan diariamente en busca de signos clínicos, si hay muertos antes de finalizar el período de observación se examina cerebro en busca de quistes para confirmar la presencia de parásitos.
5. Al finalizar el período de observación se extrae sangre de los ratones y se examina el suero a fin de detectar anticuerpos específicos por IFI

con conjugado anti-Ig G de ratón (Sigma-Aldrich, Nº de Catálogo F9006).

6. De los animales seropositivos se obtiene el cerebro y se observa en fresco. Si se detectan quistes, se cuentan y se hace una suspensión. Se inoculan 500-1000 taquizoítos por ratón con el fin de mantener la cepa.
7. Se sacrifican a los animales conservados y se reinocula al observar signos clínicos. O bien estipulando un período de acuerdo a la virulencia de la cepa.