

CONCORDANCIA ENTRE TRES PRUEBAS INMUNOSEROLÓGICAS Y VALIDACIÓN DEL USO DE LA PRUEBA DE ELISA-P30 PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA *TOXOPLASMA GONDII* EN CERDOS NATURALMENTE INFECTADOS.

Pardini, L.^{1,2}; Maksimov, P.³; Herrmann, D.³; Bacigalupe, D.¹; Rambeaud, M.^{1,2}; Machuca, M.⁴; Moré, G.^{1,2}; Basso, W.^{1,2}; Schares, G.³; Venturini, MC¹

Laboratorio de Inmunoparasitología¹, FCV-U.N.L.P., La Plata, Buenos Aires, Argentina. 60 y 118. CONICET².

Institute of Epidemiology Friedrich-Loeffler-Institut - Federal Research Institute for Animal Health³

Cátedra de Patología Especial⁴ laispardini@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una zoonosis producida por *Toxoplasma gondii*, que afecta a animales domésticos y silvestres (2). La carne de cerdo es una importante fuente de infección para el hombre (1). En los últimos años, debido a las nuevas reglamentaciones a nivel mundial sobre bienestar animal, se han incorporado cambios en los sistemas de cría (4) que han generado la reemergencia de esta enfermedad en las explotaciones porcinas. Por eso sería importante disponer de pruebas sensibles y específicas para el diagnóstico de rutina.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la concordancia entre tres pruebas inmunoserológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis en cerdos y validar la prueba de enzimoimmunoensayo con proteína P30 (ELISA-P30) para su uso en cerdos naturalmente infectados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 300 sueros de cerdos reproductores y en terminación provenientes de 7 granjas intensivas a campo y 18 granjas intensivas en confinamiento. Los sueros analizados se seleccionaron al azar de un total de 602, con el programa Microsoft Excell. Se utilizaron controles positivos y negativos de cerdos infectados experimentalmente.

Pruebas serológicas

Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Se utilizaron como antígenos taquizoítos de la cepa RH de *T.gondii* cultivados en células VERO. Los sueros se diluyeron en solución buffer de fosfatos (PBS) considerándose la dilución 1:50 como positiva. Se utilizó conjugado comercial anti-IgG de cerdo diluido 1:100 en PBS. Los lavados se realizaron con PBS.

Enzimoimmunoensayo con proteína P30 (ELISA-P30): Se sensibilizaron placas de ELISA con 5 µg/ml de proteína P30 de *T.gondii* purificada por cromatografía de afinidad y diluida en buffer de bicarbonato. Los sueros se diluyeron 1:100 y se incubaron a 37°C-30 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS-T (PBS-Tween20 0,05%). Se incubaron con conjugado comercial anti-IgG-peroxidasa 1:4000. Como sustrato se usó peróxido de hidrógeno en presencia de TMB (tetrametilbenzidine) en buffer de acetato de sodio y ácido cítrico. La lectura se realizó con filtro de 450nm. Se consideraron positivos a un index de 0,1.

Western blot (WB)

Se utilizaron taquizoítos de *T.gondii* en una concentración de 2×10^7 ml, se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% y luego se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se cortaron e incubaron con los sueros diluidos 1:100 en solución de bloqueo 1h a temperatura ambiente. Luego se lavaron con PBS-T e incubaron con conjugado anti-IgG peroxidasa 1:250. Se consideraron positivas las muestras donde se evidenció la proteína P30 (3,5) y las bandas de 13, 22 y 42 kDa coincidentes con las observadas en el control positivo experimental.

La concordancia entre las pruebas fue evaluada mediante el software Epidat 3.1. El valor K > a 0,45 fue considerado aceptable para un 95% de confianza.

RESULTADOS

Se detectaron anticuerpos para *T.gondii* en el 44,33% (133/300) de los sueros analizados por IFI, en el 43,66% (131/300) por ELISA-P30 y en el 53,33% (160/300) por WB.

La concordancia entre IFI y ELISA-P30 fue de 0,70, para IFI y WB fue de 0,53 y para WB y ELISA-P30 fue de 0,67.

DISCUSIÓN

Se obtuvo una buena concordancia entre IFI y ELISA-P30; el uso de ésta última prueba sería de mayor practicidad para estudios poblacionales.

La prueba de WB es una prueba muy sensible y específica que puede utilizarse como prueba confirmatoria para la detección de anticuerpos para *T.gondii* en cerdos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aize Kijlstra y col. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat, International Journal for Parasitology (2008). 38:1359-1370.
2. Dubey, J.P., Toxoplasmosis in pigs- The last 20 years. Veterinary Parasitology (2008) doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.018
3. García JL. Y col. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humor from experimentally infected pigs. Research in Veterinary Science (2008) . 84237-242
4. Kijlstra A. y col.. *Toxoplasma gondii* Infection in Animal Friendly Pig Production Systems. (2004). Investigative ophthalmology and Visual Science. 45:3165-3169
5. Saavedra G.M y col. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Swine from Slaughterhouses in Lima, Peru, and Georgia, U.S.A. J. Parasitol. 90:902-904.