APLICACIÓN DE PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE ABORTOS POR *TOXOPLASMA* EN GANADO OVINO

Hurtado A., Aduriz G., Moreno B., Barandika J. y García-Pérez A.L.

Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, NEIKER. Berreaga 1, 48160 Derio, Bizkaia, ahurtado@neiker.net

INTRODUCCIÓN

De entre los abortos de tipo infeccioso *Toxoplasma gondii* es considerado una de las causas más importantes. El ganado ovino se infecta a través de alimentos contaminados por ooquistes excretados por gatos jovenes. En la mayoría de los casos la infección cursa de forma subclínica en la oveja, de manera que pasa desapercibida. Además un contacto previo con la enfermedad confiere inmunidad frente a reinfecciones. Sin embargo, cuando la infección tiene lugar por primera vez durante la gestación, *T. gondii* constituye una de las principales causas de aborto y mortalidad neonatal (1) con las consiguientes implicaciones económicas. Estudios previos realizados mediante exámen histológico y análisis serológico de fetos determinaron el importante papel que juega *T. gondii* en la etiología de los abortos ovinos en la Comunidad Autónoma del País Vasco (2). Sin embargo, el diagnóstico de la toxoplasmosis ovina es difícil de realizar basándonos en la epidemiología al ser ésta similar a la que se presentan en otros procesos causantes de aborto, y las lesiones macroscópicas del feto no son concluyentes. El exámen microscópico puede esar comprometido por la autolisis, y finalmente, la serología fetal depende del desarrollo inmunológico del feto (3). Es por esto que hemos desarrollado una técnica de PCR para la detección de DNA de *Toxoplasma* en tejidos fetales, y completar el protocolo laboratorial del diagnóstico de los abortos en NEIKER. Como parte de un estudio más amplio para el diagnóstico de las causas de aborto ovino, en este trabajo se exponen los resultados de la aplicación de esta técnica de PCR a los casos remitidos durante la paridera 1999-2000, y se comparan con los obtenidos por histología y serología.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Las muestras estudiadas consistieron en fetos (encéfalo, bazo, pulmón, hígado, riñón y líquido fetal), placentas, hisopos vaginales, sueros sanguíneos y sangres enteras de sus madres, procedentes de 32 explotaciones. Con estas muestras se realizaron una serie de análisis para el estudio de la causa de aborto:

Análisis anatomopatológico e histopatológico. Muestras de tejido fetal se fijaron en formol y fueron incluidas en parafina. Secciones de 4 µm se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Análisis serológico. La presencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma* en fluido fetal y sueros maternos se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta (Toxospot IF; Bio-Merieux), utilizando conjugado anti IgG ovino (SIGMA).

Otros agentes abortivos. Se investigó la presencia de otros agentes abortivos: *Chlamydia*, *Brucella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Ehrlichia phagocytophila* (fiebre por garrapatas), virus de la enfermedad de Border (BD) y fiebre Q mediante técnicas microbiológicas, serológicas, parasitológicas, etc (2).

Extracción de DNA y amplificación por PCR. Aproximadamente 1 g. de tejido fetal fue homogeneizado en buffer TE. 400 µl de esta suspensión se digirieron con proteinasa K y SDS, y el DNA se extrajo con fenol/cloroformo. Para determinar la presencia de DNA de *Toxoplasma* en diversos tejidos fetales se ha seleccionado la región comprendida entre el 18S y el 5.8S rRNA (ITS1) con alta variabilidad interespecífica pero altamente conservada dentro de la especie (99% entre cepas de *T. gondii*) y presente con 110 copias (4). Así mismo, y para reducir al máximo la probabilidad de contaminación sin detrimento de la sensibilidad de la técnica se ha usado una PCR anidada en un solo tubo. La especificidad de la técnica se determinó mediante análisis de DNA de organismos filogenéticamente próximos (*Neospora caninum* y *Sarcocystis sp.*) y la sensibilidad por diluciones seriadas de DNA de la cepa tipo de *T. gondii* RH. Tras la puesta a punto, se amplificaron 250 ng de DNA de cada muestra por PCR anidada en un solo tubo con cebadores específicos para la región intergénica 18S-5.8S rRNA (ITS1) de *T. gondii*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La PCR amplificó un fragmento del tamaño esperado (227 pb) de la región ITS1 a partir de DNA de la cepa tipo de *T. gondii* RH, sin embargo no se obtuvo ningún producto con DNA de *Sarcocystis sp.* ni *N. caninum*. Mediante diluciones seriadas se estableció un límite de detección de 0.1 pg (equivalente a 1 organismo) para DNA puro de *T. gondii* RH, y de 1 pg en presencia de DNA ovino.

Una vez establecidas la especificidad y sensibilidad de la técnica se analizaron un total de 53 fetos, de los que se procesaron por PCR 145 muestras de tejidos fetales. De éstas, 36 pertenecientes a 9 fetos y 1 mortinato procedentes de 8 explotaciones fueron positivos (Tabla 1), sugiriendo que *T. gondii* estaba implicado en los abortos ocurridos en el 25% de las explotaciones estudiadas. De entre los distintos tejidos fetales analizados se obtuvo un mayor porcentaje de PCR-positivos en muestras de encéfalo (9 de 9), placenta (3 de 3) y pulmón (8 de 9). El hecho de que el 100% de muestras de encéfalo fueran positivas por PCR estaría en concordancia con la mayor frecuencia con que se observan lesiones histológicas asociadas a toxoplasmosis en este tipo de tejido. Sin embargo, se observaron lesiones compatibles con infección por *T. gondii* consistentes en focos de gliosis compuestos por un centro necrótico eosinofílico a veces mineralizado, rodeado de células inflamatorias, en el encéfalo de 5 de estos fetos PCR-positivos. Por PCR se detectó DNA de *Toxoplasma* en todas las placentas disponibles para los casos positivos, pero al no disponer de muestra de placenta de los otros 7 animales es difícil sacar conclusiones sobre su idoneidad para el análisis por PCR. La serología fetal demostró la presencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma* en 12 de las 41 muestras de fluido fetal analizadas. Nueve de ellas correspondían a fetos con lesiones histológicas asociadas a *Toxoplasma* y/o positivas por PCR (Tabla 1). No se confirmó la presencia de ningún otro agente abortivo entre las muestras positivas a *Toxoplasma*.

En todos los casos en que los resultados de histología y serología fueron positivos (HP^+ IFI^+) o negativos (HP^- IFI^-), la PCR fué del mismo signo. En los 4 casos en los que la serología fue positiva en ausencia de lesiones histológicas, uno fue también positivo por PCR; de los otros 3, en uno se detectaron títulos muy bajos (1/8) y de los otros dos, con títulos altos, sólo se pudo procesar por PCR muestra de bazo (única muestra disponible) que no es el tejido en el que se obtuvo mayor porcentaje de positivos. Además, dada la distribución focal del parásito, el análisis de una sola

muestra de tejido reduce la probabilidad de que ésta contenga el parásito y por tanto se pueda amplificar con éxito su DNA. El estado autolítico de otros 18 fetos impidió el exámen histopatológico. De entre éstos, 3 fueron positivos tanto por PCR como por serología. Además, 1 fue positivo por PCR en todos los órganos analizados pero negativo por IFI. Se trataba de un feto de 16 cm, lo que sugiere que se trataba de un aborto al comienzo de la gestación con lo cual el feto no era aún inmunocompetente, lo que explicaría el resultado negativo de IFI.

Tabla 1. Resultados de PCR para *T. gondii* en relación con histología (HP) y serología fetal (IFI)

Histología (HP)	Serología (IFI)	No. de fetos	No. PCR positivos §
+	+	5	5
-	-	22	0
+	-	0	0
-	+	4	1
-	NR	4	0
autolítico	+	3	3
autolítico	-	9	1
autolítico	NR	6	0

NR, test no realizado
§ Feto positivo por amplificación de DNA de *T. gondii* por PCR en al menos un tejido.

La ventaja de las técnicas de PCR y serología es su capacidad de detectar la infección por *Toxoplasma* incluso cuando el tejido está autolítico. Sin embargo la PCR presenta la ventaja adicional frente a la serología de detectar DNA de *T. gondii* independientemente del estado inmunológico del feto, además de poder identificar una infección transplacentaria en el caso de mortinatos en los que se sospeche que hayan tomado calostro y que darían falsos positivos por IFI. Así mismo, y dado que existen discrepancias a la hora de establecer un título de anticuerpos umbral indicativo de infección en fluidos fetales, la PCR aporta un resultado más concluyente. En conclusión, la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR en nido en un sólo tubo demuestran su utilidad para el diagnóstico de los abortos ovinos asociados a *Toxoplasma*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco (proyecto SPE1999012). A. Hurtado disfruta de una beca postdoctotal del INIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buxton D. 1991. Toxoplasmosis. *En:* Diseases of sheep, ed. Martin WB, Aitken ID, 2nd ed., pp.49-58. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
2. García-Pérez AL, Juste JA, *et al.* 1998. Revisión de la casuística de abortos ovinos del trienio (96-98) en NEIKER (sima). Producción Ovina y Caprina XIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC) XXIII:321-324.
3. Dubey JP, Emond JP, *et al.* 1987. J Am Vet Res 48: 1239-1243.
4. Homan WL, Limper L, Verlaan M, *et al.* 1997. Parasitol Res 83: 285-289.