

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Optimización de ensayos de ELISA indirecto y Dot Blot para la detección de anticuerpos anti- *Toxoplasma gondii* en felinos (*Felis catus domesticus*) con las proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autores:

Samantha Mariela Montalván Pérez

Jairo Orlando Castro Atariguana

Director:

Antonio Javier Vallecillo Maza

ORCID:  0000-0001-9141-0176

Cuenca, Ecuador

2023-07-06

Resumen

La Toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria causada por *Toxoplasma gondii*, cuyo hospedador definitivo es el gato doméstico, por lo general la infección tiene un curso sin manifestaciones clínicas, aunque en algunos casos puede producir trastornos digestivos, neuronales y reproductivos. La infección por *T. gondii* se puede adquirir mediante el consumo de agua o alimentos contaminados con oocistos eliminados por felinos domésticos a través de las heces, por ello es importante su diagnóstico, ya que, en el gato el parásito se reproduce de manera sexual, permitiendo así una mayor diversidad de genes en el *T. gondii* y en sus próximas generaciones. Varios estudios sugieren alternativas diagnósticas prometedoras para identificar anticuerpos anti-*T. gondii* en gatos con el uso de proteínas recombinantes en ensayos como ELISA indirecto y Dot Blot, **en** esta investigación se logró optimizar ambos ensayos para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* en muestras serológicas de gatos domésticos, utilizando proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7 de *T. gondii*. Se obtuvieron resultados favorables en el ELISA indirecto utilizando como protocolo a la combinación de antígeno al TgSAG2, placa Multisorp, bloqueo BSA, diluyente leche descremada y como sustrato ABTS. Para el protocolo de Dot Blot la mejor combinación fue con el antígeno TgSAG2, membrana PVDF, sustrato DAB, dilución en solución de BSA y bloqueo con BSA. En cuanto al tipo de ensayo no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el ensayo ELISA y Dot Blot, demostrando que ambos son idóneos para diagnosticar infección por *T. gondii* en corto tiempo y a costos reducidos.

Palabras clave: toxoplasmosis, proteínas recombinantes, ELISA indirecto, Dot Blot, diagnóstico



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Toxoplasmosis is caused by the single-celled parasite *Toxoplasma gondii*, whose definitive hosts are domestic cats. This infection tends to show some clinical symptoms. In some cases, it might produce some digestive, neuronal, and reproductive disorders. *T. gondii* infection might be acquired through contaminated water or food containing oocysts, therefore, its diagnosis is important, since in the cat the parasite reproduces sexually, thus allowing a greater diversity of genes in *T. gondii* and in its next generations. Several studies suggest promising alternatives to identify *T. gondii* antigens in cats using recombinant proteins in tests like indirect ELISA and Dot Blot, this research reaches to optimize that tests to detect antibodies anti-*T. gondii*. In our serologic samples from domestic cats, using recombinant proteins TgSAG2 and TgSAG7 from *T. gondii*. It obtained great results, the results in indirect ELISA using as the protocol of the combination of the antigen TgSAG2 Multisorp plaque, BSA, and as substrate ABTS. For the protocol of Dot Blot, the best combination was with the antigen TgSAG2 membrane PVDF. Substrate DAB and dilution in BSA and blocking with BSA. With respect to the test there were no significant differences between the test of indirect ELISA, and Dot Blot, showing that both methods are suitable for the diagnosis of infection by *T. gondii* in a short period of time and with a minimum amount of money.

Keywords: toxoplasmosis, recombinant proteins, indirect ELISA, Dot Blot, diagnosis



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	11
Objetivos	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Revisión de la literatura	13
2.1.Etiología y taxonomía	13
2.2.Morfología	13
2.2.1.Ooquistes	14
2.2.2.Taquizoitos.....	14
2.2.3.Bradizoitos.	14
2.3.Estructura antigénica de T. gondii	16
2.3.1.Antígenos de superficie (SAG (Surface AntiGens))	16
2.3.2.Antígenos del micronema (MIC (MICroneme proteins))	16
2.3.3. Antígenos de las rhoptrias (ROP (RhOPtrias proteins)).....	16
2.3.4.Antígenos de gránulos densos (GRA)	17
2.4.Diversidad genética y epidemiología molecular.	17
2.5.Ciclo biológico	17
2.6.Transmisión.....	20
2.7.Signos clínicos	20
2.8.Diagnóstico	21
2.8.1.Aislamiento del parásito mediante la inoculación de animales o bioensayo.....	21
2.8.2.Aislamiento del parásito en cultivos celulares.....	22
2.8.3.Histopatología.	22
2.8.4.Inmunodiagnóstico	23
2.8.4.1.Prueba de Sabin y Feldman	23
2.8.4.2.Hemaglutinación.....	24
2.8.4.3.Prueba de aglutinación modificada (MAT)	24
2.8.4.4.Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	24
2.8.4.5.Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	25
2.8.4.6.Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima o ELISA indirecto.....	26

2.8.4.7. Dot Blot	26
2.9.Tratamiento.....	27
3. Materiales Y Métodos.....	27
3.1. Optimización del ensayo de ELISA indirecto con las proteínas TgSAG2 y TgGRA7	27
3.1.1.Materiales físicos y equipos de laboratorio	28
3.1.2.Materiales biológicos.....	28
3.1.3.Materiales químicos.....	28
3.1.4 Procedimiento	29
3.2.Optimización del ensayo de Dot Blot	30
3.2.1.Materiales físicos y equipos de laboratorio	30
3.2.2.Materiales biológicos.....	31
3.2.3.Materiales químicos.....	31
3.2.4.Procedimiento	32
4. Resultados	34
4.1.Evaluación de la calidad y estimación de la cantidad de los antígenos	34
4.2.Optimización de los ensayos de ELISA indirecto.....	34
4.3.Optimización de los ensayos de Dot Blot	39
5. Discusión	44
6. Conclusiones.....	46
7. Recomendaciones	47
8. Referencias.....	48
Anexos.....	53

Índice de figuras

Figura 1: Dibujo esquemático de ooquiste no esporulado y esporulado de <i>T. gondii</i>	10
Figura 2: Dibujo esquematizado del taquizoito y bradizoíto de <i>T. gondii</i>	11
Figura 3: Tejido de bazo perteneciente a un canguro rojo con múltiples quistes (bradizoitos) de <i>T. gondii</i> con inmunoreactividad, La reacción positiva es mostrada de color purpura fuerte (40X).....	12
Figura 4: Ciclo biológico del <i>T. gondii</i>	12
Figura 5: Etapas infecciosas de <i>T. gondii</i> . Se muestran la biología, infección y la replicación de las tres etapas infecciosas de los parásitos en sus respectivos hospederos	12
Figura 6: Antígenos recombinantes TgGRA7 y TgSAG2.....	34
Figura 7: Gráfico dotplot de los valores de densidad óptica del ensayo de ELISA indirecto usando antígeno TgSAG2 con placa MaxiSorp.....	35
Figura 8: Gráfico dotplot de densidad óptica del ensayo de ELISA indirecto usando antígeno TgGRA7 con placa MaxiSorp.....	35
Figura 9: Gráfico dotplot de los valores de densidad ópticas del ensayo de ELISA indirecto usando antígeno TgSAG2 con placa MultiSorp.....	16
Figura 10: Gráfico dotplot de los valores de densidad ópticas del ensayo de ELISA indirecto usando antígeno TgGRA7 con placa MultiSorp.....	17
Figura 11: Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgSAG2 en la membrana Nitrocelulosa	20
Figura 12: Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgGRA7 en la membrana Nitrocelulosa	20
Figura 13: Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgSAG2 en la membrana PVDF	21
Figura 14: Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgGRA7 en la membrana PVDF	24

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza del ELISA indirecto.....	38
Tabla 2. Resultados del análisis de varianza del ensayo Dot Blot.....	42
Tabla 3. Resultados test de Duncan, comparación entre ensayo ELISA indirecto y Dot Blot.....	43

Agradecimientos

Agradeciendo primeramente a Dios por la familia y amigos que me ha dado y ha puesto en mi camino, para apoyarme y cuidarme, darme ánimos y fuerza en cada una de mis caídas y desfortunios, a los que me enseñaron a salir adelante y han celebrado también mis victorias. Agradecemos también a nuestra alma máter a la Universidad de Cuenca y en especial a la carrera de Medicina Veterinaria y docentes que la conforman, por su compromiso con sus estudiantes y por todos los conocimientos aprendidos, los mismos que me servirán para ayudar a la ciudadanía y a mis pacientes.

Samantha Montalván- Jairo Castro

Dedicatorias

A mis padres Wilson y María quienes me han dado la vida y han hecho todo lo posible para que sea una persona de bien, con valores y responsabilidad, a mis abuelos y familiares que me alentaron a continuar con su apoyo emocional y económico. A mis amigos presentes y pasados, con quienes hemos compartido conocimiento, alegrías y tristezas. A mi tutor el Dr. PhD Antonio Vallecillo el cual me enseñó a ser paciente y que lo importante de la vida es aprender y siempre tener un pensamiento crítico, que un error no está mal, pero si el dejar de intentar por temor a equivocarse. A mis pacientes por cuyo amor y admiración a ellos; escogí la carrera, por ellos seguiré luchando y aprendiendo cada día más para poder salvarlos y buscar su bienestar en este mundo indolente.

Samantha Mariela Montalván Pérez

Dedico esta tesis a mis padres, Orlando Y Rosa quienes han sido el mayor apoyo y pilares fundamentales durante mi carrera profesional; a mis hermanos Isaac y Linda por su apoyo incondicional que me han dado. A mi abuelita Zoila y a mi abuelito Isaac quienes me han visto crecer y me han apoyado en mis trabajos junto con sus consejos inolvidables. A mi amiga Samantha quien siempre me ha ayudado durante toda mi carrera. A mi mejor amigo Wilmer mi fiel confidente y próximamente colega. A mis mascotas, Puka Y Nabuco mis fieles compañías.

Jairo Orlando Castro Atariguana

Glosario

4CN	4-Chloro-1-naphthol
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)
A-HRP	Proteína A-peroxidasa de rábano picante
BG	β -D-galactosidasa
BSA	Albúmina sérica bovina
DAB	Hidrato de tetraclorhidrato de díaminobencidina
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
FA	Fosfatasa alcalina
FC	Fijación del Complemento
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
IFI	Prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos
IFNγ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-12	Interleucina-12
KCl	Cloruro de potasio
KH₂PO₄	Dihidrógeno fosfato de potasio
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAT	Prueba de aglutinación modificada
MIC	Proteínas de Micronema
MJ	Unión móvil (<i>Moving Junction</i>)
Na₂CO₃	Carbonato sódico
NaCl	Cloruro de sodio
NaH₂PO₄	Fosfato dihidrógeno de sodio
NaHCO₃	Hidrogeno de sodio carbonatado
NiCl₂	Cloruro de níquel
PBS	Solución buferada de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PCR-RFLPs	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
PV	Vacuola parásitofera
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
PVM	Membrana de vacuola parásitofera
RON	Cuello de roptrias
ROP	Proteínas de roptrias
SAG	Antígenos de superficie
SRS	Secuencias relacionadas
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris-HCl	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol-acido clorhidrico
VIF	Virus de inmunodeficiencia felina

Introducción

La Toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria, causada por un protozoo intracelular llamado *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), el cual es capaz de infectar a cualquier mamífero, avese incluso peces. Su hospedero definitivo es el gato, en donde el parásito se reproduce de manera sexual y se producen los ooquistes, los cuales son la forma infectiva del toxoplasma y al ser eliminados a través de las heces de los gatos completan su ciclo biológico (1).

Su presencia a nivel mundial, se le atribuye a su carácter zoonótico y su rápida capacidad de infección, el cual se puede transmitir de manera vertical de la madre a sus hijos o también de manera horizontal a través del consumo de agua y alimentos contaminados con este parásito, siendo el último el medio más común de contagio (2).

La Toxoplasmosis generalmente es de curso asintomático, con signos muy sutiles, comunes a otras infecciones. La seroprevalencia se relaciona con las condiciones de vida, higiene, estado inmune y hábitos alimenticios (1). Los métodos de diagnóstico de la Toxoplasmosis más comunes son a través de análisis serológicos en los cuales se detectan anticuerpos específicos contra *T. gondii*, pero el acceso a estos análisis es caro, lento y laborioso, con el existente riesgo de infección en el laboratorio. Además, para analizar un gran número de muestras de suero animal no es adecuado el uso de pruebas de aglutinación comerciales debido a su alto costo. Gracias a los últimos avances en proteómica se ha logrado identificar la estructura antigénica de *T. gondii* y han permitido el desarrollo de varias proteínas antigénicas recombinantes útiles para identificar al parásito, convirtiéndose en un método diagnóstico más barato y eficaz.

La mayoría de las pruebas de rutina realizadas con antígenos de taquizoitos cultivados en ratones o cultivos de tejidos suelen ser difíciles de estandarizar, por lo que el uso de proteínas recombinantes es un método alternativo para obtener resultados específicos y sensibles a nivel diagnóstico, el desarrollo y optimización de esta herramienta de diagnóstico puede resolver rápidamente este problema. Una vez que se comprende completamente el potencial de este método diagnóstico se lo puede considerar como una mejor alternativa y mucho más barata en comparación con el uso de antígenos naturales, con la generación y desarrollo de nuevos algoritmos de diagnóstico para *T. gondii* (2).

Objetivos

Objetivo general

Optimizar los ensayos de ELISA y Dot Blot basados en los antígenos recombinantes TgSAG2 y TgGRA7 de *Toxoplasma gondii*, para su uso en la identificación de anticuerpos en gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) potencialmente expuestos a esta parasitosis.

Objetivos específicos

- Identificar las condiciones en donde las muestras de suero positivos y negativos muestren mayor diferencia en los valores de densidad óptica y menor señal de fondo en los ensayos de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos de gatos contra los antígenos recombinantes TgSAG2 y TgGRA7.
- Identificar las condiciones en donde las muestras de suero positivos y negativos muestran mayor diferencia en los valores de intensidad de la señal y menor de fondo en ensayos de DotBlot para la detección de anticuerpos de gatos contra los antígenos recombinantes TgSAG2 y TgGRA7.
- Comparar la capacidad para identificar gatos seropositivos a *Toxoplasma gondii* de los ensayos de ELISA y Dot Blot optimizados para la detección de anticuerpos con el uso de los antígenos TgSAG2 y TgGRA7.

Revisión de la literatura

2.1. Etiología y taxonomía

El agente etiológico de la Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), un parásito intracelular obligado que habita en cualquier animal, incluyendo el hombre. *T. gondii* fue descrito por Nicolle y Monceaux., en 1908; cuando lo aislaron en el hígado y bazo de un roedorsalvaje africano llamado *Ctenodactylus gondii*, identificaron un parásito intracelular, en su inicio creyeron que se trataba de *Leshmania*, tiempo después lo denominaron *Toxoplasma gondii* por su forma arqueada (griego *Toxon*; arcos y del roedor; *gondii*) (3). Simultáneamente, Spledore descubre el mismo parásito en un conejo de laboratorio en São Paulo, Brasil (2).

La clasificación del género *Toxoplasma* se basa en el hospedador; con ello se enunciaron nueve especies: *T. alencari*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. bahiensis*, *T. gondii*, *T. hammondi*, *T. pardalis*, *T. ranae*; y *T. serpai*. Después de varios años observaron que los ciclos biológicos y sus características inmunológicas eran similares por lo que, se les agrupó bajo una misma especie: *T. gondii* (28). El *T. gondii* se incluye dentro del *phylum* *Aplicomplexa*, clase *Sporozoea*, subclase *Coccidia*, orden *Eucoccidia*, suborden *Eimeriina*, Familia *Sarcocystidae* y subfamilia *Toxoplasmatinae* (2).

2.2. Morfología

T. gondii muestra diferentes formas celulares de diferenciación dependiendo de la etapa de su ciclo celular, las cuales son importantes desde el punto de vista de transmisión e invasión de este organismo (30). Este protozoo mide entre 4-8 μm de largo por 2-4 μm de ancho, tiene forma de medialuna con un extremo aguzado y el otro romo. No tiene ni cilios o flagelos. En su extremo anterior presenta una estructura típica el “complejo apical” constituida por un anillo polar, roptrias y micronemas. Su núcleo es vesicular y central y mide 1 a 1,5 μm de diámetro. Su citoplasma es vacuolar y contiene aparato de Golgi, numerosos ribosomas, retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias. En su ciclo biológico generalmente tiene su forma de medialuna, aunque también se presenta en forma de ooquiste que le ayuda a resistir condiciones ambientales, es decir, el toxoplasma tiene forma de medialuna (taquizoitos y bradizoitos) y forma de ooquistes (27).

Se han descrito tres estadios infecciosos del *T. gondii*: esporozoítos u ooquistes, taquizoitos y bradizoitos.

2.2.1.Ooquistes

Los ooquistes son la forma del toxoplasma resistente al medio ambiente, son esféricos y miden sin esporular 10-12 μm de diámetro y esporulados miden unos 11-13 μm de diámetro. Cada ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes y cada uno de estos tiene cuatro esporozoítos en su interior los cuales miden 6-8 μm , con un núcleo subterminal y abundantes micronemas, roptrias, gránulos de amilopectina y lípidos (28). Los ooquistes pueden permanecer viables hasta por 18 meses dependiendo de las condiciones de humedad presentes (31).

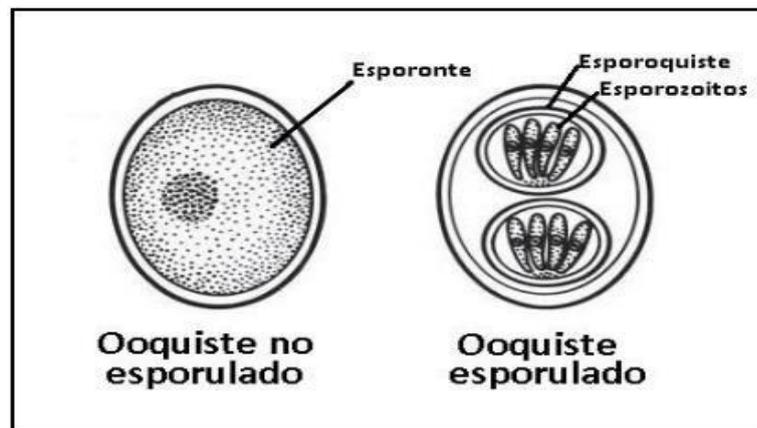


Figura 1. Dibujo esquemático de ooquiste no esporulado y esporulado de *T. gondii* (26).

2.2.2.Taquizoítos.

El taquizoíto es la forma infecciosa asexual, de apariencia arqueada, miden de 6-8 μm y tienen forma de medialuna, con un extremo anterior conoidal y un extremo posterior redondeado (29). Contiene un núcleo, una sola mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, así como un apicoplasto. Además, tiene una distribución polarizada hacia el extremo apical de organelos como el conoide, roptrias, gránulos densos y micronemas, que parecen estar involucrados en los procesos de motilidad, secreción e invasión celular (31).

2.2.3.Bradizoítos.

Los bradizoítos y esporozoítos están dentro de los quistes tisulares de diverso tamaño. La estructura de éstos difiere del taquizoíto ya que éste carece de lípidos y el número de roptrias y gránulos densos es inferior, mientras que el número de micronemas y gránulos de amilopectina son superiores. Los bradizoítos son más delgados, con un núcleo posterior y menos susceptibles a las enzimas proteolíticas (28).

El parásito se encuentra rodeado del películo, una membrana plasmática relacionada con secreción, motilidad y evasión de la respuesta inmune (33). En la invasión a la célula hospedera el parásito secreta componentes de varios organelos secretores como las roptrias; las que secretan contenido para alterar la membrana y facilitar la penetración a la célula hospedadora, los orgánulos densos; cuyo contenido impide la fusión lisosomal, protege a los parásitos de los mecanismos intracelulares de defensa (34) y los micronemos; los cuales

alojan en su interior proteínas adhesivas (MIC) que favorecen la adhesión y motilidad del parásito sobre la membrana de la célula hospedera (30).

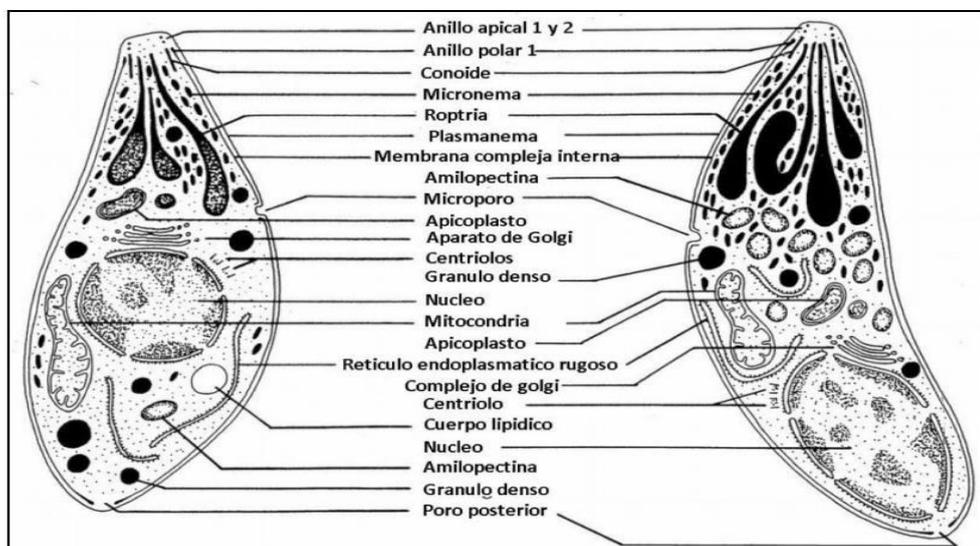


Figura 2. Dibujo esquematizado del taquizoito y bradizoíto de *T. gondii* (27).

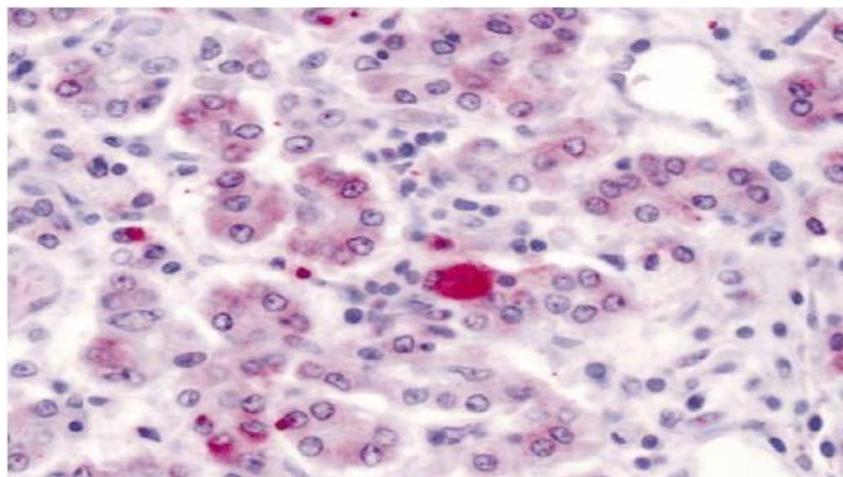


Figura 3. Tejido de bazo perteneciente a un canguro rojo con múltiples quistes (bradizoítos) de *T. gondii* con inmunoreactividad. La reacción positiva es mostrada de color púrpura fuerte (40X) (27).

2.3. Estructura antigénica de *T. gondii*

Por varias décadas, se ha investigado acerca de la estructura antigénica completa de *T. gondii*, hasta la fecha se han dilucidado los antígenos que intervienen en las diferentes etapas de invasión del parásito en el hospedero (36). La finalidad es desarrollar fármacos que bloqueen la invasión parasitaria y crear vacunas que estimulen la producción de anticuerpos específicos contra *T. gondii*; así como también el desarrollar nuevas herramientas para su diagnóstico (35)

Los antígenos de *T. gondii* se encuentran tanto en la superficie de membrana como el citosol, en los orgánulos secretores del parásito y en el interior de la vacuola parasitófora, se han identificado cuatro grupos principales de antígenos de *T. gondii* (35).

2.3.1. Antígenos de superficie (SAG (*Surface AntiGens*))

La superficie del *T. gondii* esta recubierta de proteínas ligadas a glucosilfosfatidilinositol (GPI) reguladas por el desarrollo. Entre ellas están las proteínas SRS (**SAG1-Related Sequences**) que median la adhesión a las células del hospedero y sobre las que actúa la respuesta inmune del mismo para regular la virulencia del parásito, entre estas proteínas se encuentran, SAG1, SAG2 A/B, SAG3 y SRS3, que se expresan en la superficie de los taquizoitos (14), mientras que SAG2D y BSR4 son específicos de los bradizoitos (2).

2.3.2. Antígenos del micronema (MIC (*MICroneme proteins*))

La producción de estos antígenos depende de la concentración intracelular de iones de calcio. Estos forman complejos adhesivos o de manera individual, secretarán e integrarán al micronema, estas proteínas le sirven al parásito para la adhesión y la alteración de la integridad de la membrana celular del hospedero, facilitando la penetración del parásito. Participan en la fijación, motilidad, invasión y un papel sinérgico en el proceso infeccioso (26).

2.3.3. Antígenos de las roptrias (ROP (*RhOPtrias proteins*))

Los antígenos del cuello de las roptrias (RON (*RhOptri Neck*) y de las roptrias (ROP (*RhOptrias Proteins*)) son proteínas que facilitan el plegamiento coronal de la célula hospedera y la formación de vacuolas parasitóforas. Estos poseen un péptido señal y como mínimo un anclaje GPI (Glycosyl-phosphatidylinositol), provocando la asociación de membrana. Los antígenos ROP se asocian a la formación de membranas vacuolares parasitóforas y las proteínas RON participan en la creación del complejo MJ (*Moving Junction*)(31).

2.3.4. Antígenos de gránulos densos (GRA)

Estos antígenos tienen un peso molecular bajo, son proteínas secretadas por vesículas granulares y cumplen un papel importante en las modificaciones estructurales de las PV (*Parásitophorous Vacuole*). En la construcción de microtúbulos, red nanotubular interna y de la PVM (*Parásitophorous Vacuole Membrane*), donde se desarrollan los parásitos *T. gondii* (18).

2.4. Diversidad genética y epidemiología molecular.

T. gondii debido a su amplia gama de hospederos a los que es capaz de infectar, se lo considera como un parásito inusual, antes del desarrollo de marcadores genéticos se realizaron numerosos estudios en ratones para agrupar los aislados de *T. gondii* según su patogenicidad. En los años de las décadas de 1980 y 1990 se desarrollaron métodos para identificar diferencias genéticas entre los aislados de *T. gondii* procedentes de humanos y animales, clasificándolos en tres linajes o tipos genéticos (I, II, III), donde el tipo I es el más virulento y parece ser el más frecuente en la enfermedad congénita en humanos y 100 % letales en ratones, mientras que el tipos II es el más común en humanos y el tipo III es el más frecuente en animales siendo estos dos últimos generalmente a virulentos (30). genoma de *T. gondii* es haploide de 61,6 megabases y 592 cM, constituido en unidades genéticas de 104 kbp/cM y 14 cromosomas, compuesto por 7.793 genes y 63.495.144 pares de bases (31).

La recombinación genética se logra por la etapa sexual del ciclo biológico, en el intestino del gato, demostrado en infecciones experimentales ya que requiere que el gato ingiera dos cepas del parásito, en el mismo intervalo de tiempo. Actualmente se reconocen 12 haplogrupos y en algunas áreas, como Sudamérica, hay genotipos atípicos con polimorfismos únicos que no se incluyen en esta clasificación. En Europa y Norteamérica predomina el genotipo II, en Sudamérica los genotipos atípicos son los más prevalentes. En relación con las cepas atípicas de *T. gondii*, estudios recientes (47) han revelado que se puede producir una reinfección con un genotipo atípico en hembras previamente infectadas por *Toxoplasma* y resultar en una transmisión congénita, cuya tasa de infección se ve incrementada cuando las hembras se infectan con una cepa atípica en comparación con las infectadas con el genotipo II (45).

2.5. Ciclo biológico

T. gondii es un parásito heteroxeno. Los felinos actúan como hospedador definitivo ya que en él se desarrolla la reproducción sexual, mientras que en otros mamíferos o aves actúan como hospedadores intermediarios (45). El ciclo biológico (*Ver figuras 4 y 5*) de *T. gondii*

consta de tres fases: la enteroepitelial la que ocurre en el hospedador definitivo, la extraintestinal que se da tanto en hospederos intermediarios como definitivos y la esporogónica que ocurre en el medio ambiente (2).

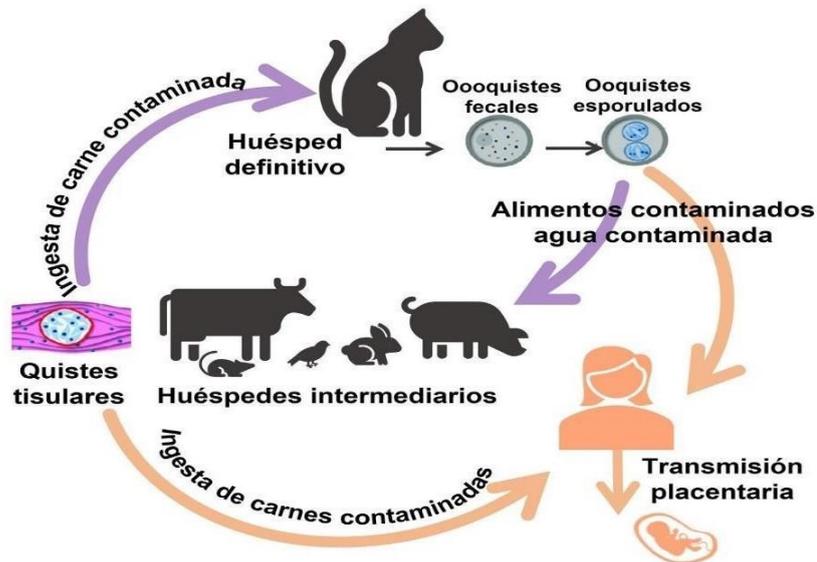


Figura 4. Ciclo biológico del *T. gondii* (39).

Luego de la ingestión de los oocistos por los hospederos definitivos, la pared de los quistes tisulares se disuelve por acción de enzimas proteolíticas durante la digestión, al ser liberados los esporozoitos y bradizoitos ingresan al epitelio intestinal en donde se desarrollan las numerosas generaciones en los cinco tipos o estadios asexuales de la fase enteroepitelial (A,B, C, D y E). El ciclo sexual se inicia 2 días *post*-infección, los merozoitos inician la formación de gametos de 3 a 15 días de la infección, los microgametos femeninos y masculinos se juntan para formar el cigoto que después se convertirá en oocistos e irán al lumen intestinal y finalmente al ambiente a través de las heces del felino hospedador (2).

En cuanto a la fase extraintestinal, tanto en el hospedero definitivo como intermediario, las formas infectivas llegan a la lámina propia del intestino en donde se multiplicarán en el endotelio, fibroblastos, células mononucleares y leucocitos fragmentados, formándose en taquizoitos y luego estos en bradizoitos, los mismos que permanecen dentro de quistes tisulares en varios órganos (hígado, bazo, etc.), dentro de estos quistes los parásitos están protegidos de la respuesta inmune del hospedador produciéndose la fase crónica de la enfermedad. Algunos autores sugieren que cuando se produce la infección por ingestión de taquizoitos por vía oral no son capaces de resistir al jugo gástrico, pero algunos de ellos pueden penetrar en la mucosa bucofaríngea y desencadenar su ciclo biológico.

Ocasionalmente algunos quistes se rompen y se producen nuevas invasiones, pero el hospedador inmunocompetente logra controlar la infección. En ratones se ha observado la formación de nuevos quistes durante la fase crónica de la infección, provocando la recurrencia en la persistencia de títulos de anticuerpos específicos, en los hospedadores. Si el sistema inmunitario decae, el parásito vuelve a comenzar la fase proliferativa y así reactivándose la infección (2).

En la fase esporogónica, los quistes no esporulados, en condiciones óptimas se transformarán en ooquistes esporulados, luego de uno a cinco días se formarán cuatro esporozoítos a partir de los dos inicialmente presentes convirtiéndose en un estadio totalmente infeccioso (1).

El inicio de la infección viene determinado por la virulencia del parásito y la respuesta inmune del hospedador. El control de la enfermedad parece depender de la producción de citoquinas apropiadas, incluyendo IL-12 e IFN γ , y de una adecuada respuesta celular. Tanto IL-12 e IFN γ activan a los macrófagos, los macrófagos producen TNF α . La sinergia entre TNF α e IFN γ en los macrófagos desencadena la producción de especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno que provocan la muerte de los parásitos intracelulares

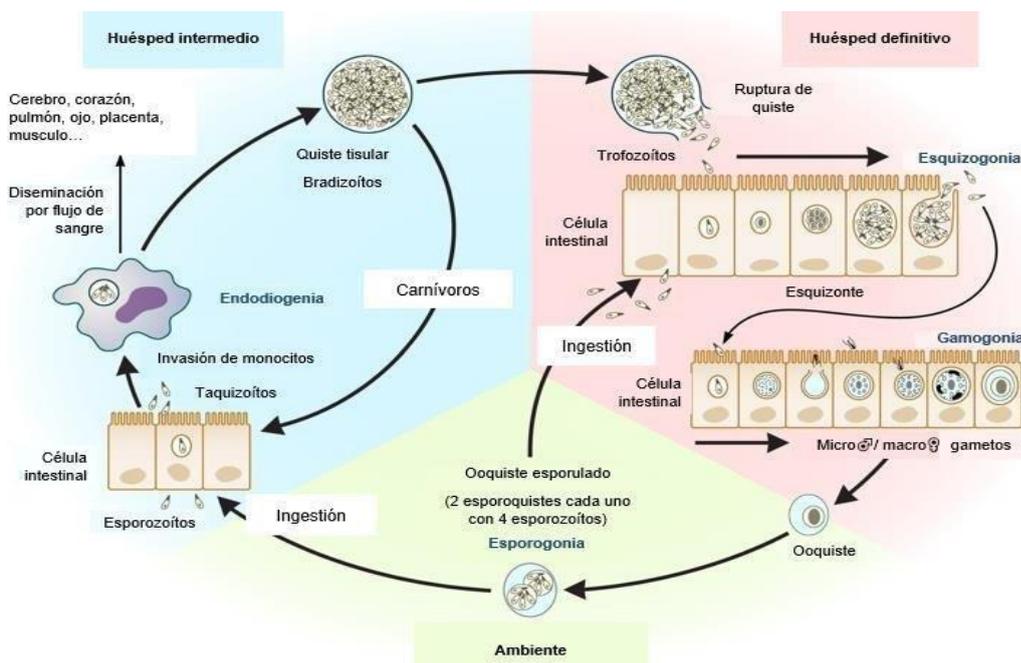


Figura 5. Etapas infecciosas de *T. gondii*. Se muestran la biología, la infección y la replicación de las tres etapas infecciosas de los parásitos en sus respectivos hospederos (40).

En el parásito causan la transformación de los taquizoítos en bradizoítos. Según la especie de hospedero se puede condicionar esta transformación o la persistencia de quistes tisulares; por ejemplo, raramente se encuentran quistes en carne de vacuno o búfalo a

pesar de tener títulos serológicos altos ante antígenos del parásito, con mayor frecuencia se encuentran quistes tisulares en tejidos de cerdo, oveja, cabra y en menor medida en pollos, perros y caballos (45).

2.6. Transmisión

T. gondii puede transmitirse a través de varias vías como, por ejemplo; vía oral por ingestión de taquizoitos tisulares contenidos en la carne, y de ooquistes contaminando agua, frutas y vegetales (5).

Otra forma de transmisión es la vertical, en la cual la madre infectada transmite a sus descendientes a través de la placenta, durante el parto y la leche materna, aunque la transmisión transplacentaria en gatos no es muy frecuente en condiciones naturales. Otras vías de contaminación se pueden dar por el contacto con material contaminado y la mucosa ocular o bucal, así también a través de transfusiones sanguíneas y el trasplante de órganos (1).

2.7. Signos clínicos

La Toxoplasmosis es una enfermedad compleja ya que cubre un amplio intervalo de manifestaciones clínicas que van desde una forma asintomática a infecciones diseminadas en un paciente inmunodeprimido (30). Las manifestaciones clínicas en gatos son poco frecuentes, sin

embargo, su presentación se ha descrito tanto de forma intestinal, ocular, encefálica y generalizada (6). Además, se ha descrito su presentación concomitante con otras patologías, como la infección por el Virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el Virus de la leucemia felina (VLFe), el Virus de peritonitis infecciosa felina, adicionalmente por el uso terapéutico de glucocorticoides (1).

Entre los signos clínicos que se presentan en felinos con Toxoplasmosis esta: la pérdida de peso, letargia, fiebre alta e intermitente entre unos 40,0 a 41,7 °C, emaciación y anorexia, si existe compromiso respiratorio suele presentar también disnea, polipnea, descarga nasal y estornudos. Cuando la infección se encuentra a nivel digestivo este puede ocasionar; diarrea en gatos jóvenes, emesis, ictericia y dolor abdominal a causa de una hepatitis o pancreatitis y colangiohepatitis, un abdomen abultado por la hepatomegalia y ascitis (7).

En caso de que la enfermedad llegue a nivel nervioso; este puede causar daño neuronal, hipotermia, ceguera parcial o total, aumento en el comportamiento afectivo, estupor, incoordinación, llanto anormal, contracción auditiva, movimientos en círculos, tortícolis,

convulsiones, parálisis, somnolencia prolongada, hiperestesia muscular, rigidez en la marcha, cojera, déficit neurológico y dolor articular (8). En gatos con *T. gondii* el compromiso ocular se presenta con midriasis, anisocoria, hifema y reflejo pupilar lento a la luz (9).

En gatas infectadas con *T. gondii* durante su gestación puede causar; placentitis con invasión fetal congénita grave causando abortos espontáneos, nacimientos prematuros y mal formaciones, en gatos jóvenes se puede presentar encefalitis, miositis y miocarditis (10).

2.8. Diagnóstico

En cuanto al diagnóstico clínico de la infección por *T. gondii*, es difícil debido a que su sinología no es específica, existiendo mucha similitud con otras patologías; siendo necesario el uso de métodos diagnósticos complementarios (37). El empleo del diagnóstico complementario es parte importante en la decisión de iniciar o no un tratamiento antiparasitario (29).

Existen varios métodos de diagnóstico directos e indirectos. Entre los métodos directos podemos mencionar exámenes de heces, inoculación en animales de laboratorio, frotis de aspiraciones traqueales, secreciones torácicas o peritoneales (37).

Como métodos indirectos tenemos los basados en la detección de anticuerpos IgM e IgG generados contra el toxoplasma, que han sido las herramientas más usadas y han llevado a discriminar entre una infección primaria, aguda o crónica (30). Como métodos moleculares para la identificación de ADN-*T. gondii* se cuenta con la reacción en cadena de polimerasa (PCR, del Inglés Polymerase Chain Reaction), la prueba basada en el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción de los productos de la reacción en cadena de polimerasa (PCR-RFLP, del Inglés Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) para identificar cepas, el método de fusión de alta resolución para determinar el genotipo de *T. gondii* a partir de muestras biológicas (30). Los métodos inmunológicos que detectan a los isotipos IgM e IgG contra toxoplasma han sido las herramientas más utilizadas y permiten diferenciar una toxoplasmosis activa o aguda de una crónica, a continuación, describiremos algunas pruebas diagnósticas de este parásito (30).

2.8.1. Aislamiento del parásito mediante la inoculación de animales o bioensayo

El diagnóstico de la toxoplasmosis aguda puede hacerse por inoculación de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), material de nódulos linfáticos y otros líquidos o tejidos corporales,

en la cavidad peritoneal de ratones inmunosuprimidos. La presencia de los taquizoitos en el líquido peritoneal de los ratones se detecta por microscopía de contraste de fases de 6-10 días después de la inoculación. Se recomienda realizar un frotis del exudado peritoneal del ratón, la muestra se fija con metanol y se tiñe con colorante de Wright, Giemsa o May-Grunwald y se observa al microscopio (30).

Si no se encuentran toxoplasmas en el líquido peritoneal se lo puede determinar por titulación sérica de anticuerpos anti-toxoplasma a las 4 y 6 semanas *post* inoculación. La sensibilidad de este método en el diagnóstico de toxoplasmosis aguda se ha considerado de casi del 90

%, aunque la detección del parásito en muestras biológicas es muy baja ya que en general los parásitos están a nivel intracelular. Como desventaja de este método es que se requiere de personal especializado en el manejo *T. gondii*, por el riesgo de adquirir la infección, además es necesario esperar algún tiempo para obtener los resultados (39).

2.8.2. Aislamiento del parásito en cultivos celulares.

Los cultivos celulares son usados cada vez más para el diagnóstico y aislamiento de parásitos *in vitro* (39), a partir de muestras de líquido pulmonar, cerebro espinal, etc. Este método permite estudiar la interacción hospedero-parásito, para la búsqueda de factores implicados en la resistencia innata, para la caracterización molecular y genética de los diferentes aislados, para la búsqueda de moléculas candidatas para vacuna y determinar la eficacia de fármacos antiparasitarios (40).

El procedimiento consiste en crecer las células hospederas en medios de cultivo complementados con suero fetal bovino a fin de aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento y en condiciones de 37 °C y con atmósfera de 5 % de CO₂. Cuando las células alcanzan una confluencia del 80 % (es decir que el 80 % del área de la caja de cultivo está cubierta con células), se adicionan los líquidos corporales bajo estudio y se mantienen en cultivo por 5 a 8 días (30).

Según la cantidad de parásitos presentes en la biopsia o líquido corporal de la muestra será la destrucción del monocapa celular, y la cantidad de taquizoitos recuperados en el sobrenadante. En el diagnóstico de líquidos intraoculares, la correlación con el diagnóstico de coriorretinitis y ELISA directo es del 67 % y con cultivo celular es del 91 % (30).

2.8.3. Histopatología.

La detección de taquizoitos en cortes histológicos de biopsias sospechosas es indicativo de una infección activa presente, la detección de quistes tisulares con bradizoitos en muestras histológicas confirma una infección en estado crónico. La presencia de quistes

en la placenta, feto o recién nacidos es indicativa de una infección congénita, según el número de quistes en los cortes histológicos se puede sugerir el caso de una infección activa (30).

Los bradizoitos y taquizoitos se pueden observar con la tinción de Wright, Hematoxilina y Eosina, Ácido peryódico de Schiff, Inmunofluorescencia o tinción con inmunoperoxidasa. Este procedimiento tiene valor diagnóstico, pero son limitados debido a la dificultad de crear un ambiente adecuado para el crecimiento de parásitos *in vivo* como la identificación de taquizoitos por métodos histoquímicos (30).

2.8.4. Inmunodiagnóstico

Actualmente en el mercado existen varias pruebas serológicas que se pueden utilizar para identificar y medir la cantidad de anticuerpos generados debido a la infección por *T. gondii*. Las pruebas de tinción de Sabin-Feldman, Fijación de complemento (FC), el método de hemaglutinación (HA), la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), identifican la presencia de anticuerpos circulantes del isotipo IgG contra *T. gondii*. Pueden detectarse titulaciones positivas de IgG en tan solo 2 a 3 semanas después de la infección y se suele alcanzar su máximo a las 6 a 8 semanas, declinando lentamente hasta una línea basal, la cual generalmente permanece de por vida (30). Es importante tener una titulación sérica de IgM a la vez que la titulación de IgG para establecer si la infección se encuentra en estado activo agudo o crónico (42).

Los métodos para esta determinación son, ELISA indirecto para IgM de doble anticuerpo y el ensayo inmunoabsorbente de IgM (IgM-ISAGA). Estos ensayos son específicos, sensibles y evitan los resultados falsos positivos asociados al factor reumatoide y los anticuerpos antinucleares. La IgA-ELISA es más sensible que la IgM-ELISA en la detección de la infección congénita en el feto y el recién nacido. La titulación positiva de IgM es una indicación de infección aguda. La elevación de IgG sin aumento de la IgM sugiere que existe una infección crónica (latente), si existe un aumento de la IgG o IgM deben valorarse de nuevo titulaciones a las 3 o 4 semanas y se debe de sospechar de una toxoplasmosis activa en el cual se debe iniciar de inmediato del tratamiento antiparasitario (30).

2.8.4.1. Prueba de Sabin y Feldman

También conocida como la prueba del colorante, se basa en colocar a una suspensión de taquizoitos vivos al suero del paciente y después colocar colorante Azul de metileno. Si presenta anticuerpos anti-toxoplasma en el suero, se lisan los parásitos impidiendo que capturen el color y se tiñan, vistas al microscopio como estructuras incoloras (resultado positivo a la presencia de anticuerpos anti-toxoplasma). Cuando no hay anticuerpos anti-toxoplasma, los parásitos permanecen vivos con su membrana intacta y captarán colorante

tiñéndose de color azul (resultado negativo). La principal desventaja de esta prueba es el riesgo de contaminación o accidentes en laboratorio ya que se trabaja con parásitos vivos, siendo necesaria una infraestructura especializada (30).

2.8.4.2. Hemaglutinación

Esta prueba se basa en la propiedad de los anticuerpos anti-*T. gondii* de producir aglutinación en presencia de eritrocitos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito. Si existe aglutinación la prueba es positiva a la presencia de anticuerpos o si la aglutinación es ausente, el resultado es negativo. Las ventajas que ofrece son su rapidez y alta sensibilidad, óptima para usarse en asociación con fijación de Complemento e Inmunofluorescencia indirecta (43).

2.8.4.3. Prueba de aglutinación modificada (MAT)

Para esta prueba se colocan taquizoitos fijados con formaldehído en placas de microtitulación con fondo en forma de U a los cuales se añade el suero diluido. En muestras positivas se observa una capa delgada de aglutinación (semejante a una red), mientras que en las pruebas negativas se produce un sedimento compacto de taquizoitos precipitados en el fondo del pozo (44). Esta prueba detecta anticuerpos IgG, sin limitación de la especie del hospedero, aunque resultados falsos negativos pueden ocurrir durante las primeras etapas de la infección aguda. Tiene gran especificidad y sensibilidad diagnóstica en la mayoría de las especies y se la puede realizar usando fluidos corporales, siendo muy útil en trabajo de campo (30).

2.8.4.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Consiste en la fijación de los taquizoitos a un portaobjeto, los cuales se ponen en contacto con el suero del paciente y posteriormente a anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes, por ejemplo, Fluoresceína. La reacción antígeno-anticuerpo se observa con el uso de un microscopio de fluorescencia, tomando una coloración amarillo verdoso brillante (Fluoresceína) en caso de que sea positivo caso contrario los negativos tendrán un color rojo sin fluorescencia. La fluorescencia la da el fluorocromo que está conjugado a los anticuerpos. Puede existir resultados falsos negativos en presencia de Toxoplasmosis congénita, en pacientes

inmunosuprimidos o en casos de Toxoplasmosis ocular, además pueden darse falsos positivos por presencia de factor reumatoide y anticuerpos antinucleares, ya que estos causan fluorescencia no específica en la detección de IgM, siendo recomendable tener en cuenta estas determinaciones (30).

2.8.4.5. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Este método utiliza anticuerpos conjugados a una enzima, el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de crear una reacción de óxido-reducción (Peroxidasa), en donde el sustrato se torna en un producto colorido. El antígeno o los anticuerpos se absorben a una fase sólida insoluble (microplacas de poliestireno). Existen diversos ensayos de ELISA; directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos nos permiten determinar antígenos en fluidos biológicos a excepción del método indirecto en el que solo se detectan anticuerpos. En el método directo el anticuerpo está dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima, en cambio, en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el primer anticuerpo el cual ya reacciona con el antígeno. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG), por su estabilidad y reproductibilidad de sus resultados (30).

Este método tiene una mayor sensibilidad diagnóstica que las pruebas de colorante de Sabin y Feldman e IgM-IFI, ya que en estudios serológicos realizados en donde dan resultados negativos, con la técnica de ELISA indirecto el 92.8 % de dichos sueros fueron positivos debido a su capacidad de detectar bajas concentraciones de antígenos de *T. gondii*. Es una prueba rápida y sencilla para detectar antígenos circulantes o bien anticuerpos anti-toxoplasma clase IgG o IgM en suero, que nos permite distinguir una infección reciente de una infección pasada (30). El método ELISA indirecto detecta del 70 al 80 % de los casos infectados congénitamente, un aumento de la titulación de IgM que se extiende más allá de la primera semana es indicativo de infección aguda, ya que el promedio de duración de la IgM materna es de 3 a 5 días. Además, se puede determinar IgG e IgM contra *T. gondii*, siendo usada con éxito en el serodiagnóstico de una variedad de infecciones (30).

En los últimos 30 años se han analizado varios antígenos recombinantes del *T. gondii*; los antígenos de gránulos densos (GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7 y GRA8), de proteínas de las roptrias (ROP1 y ROP2), proteína de la matriz (MAG1), proteínas de los micronemos (MIC2, MIC3, MIC4 y MIC5) y los antígenos de superficie (SAG1 y SAG2), se evaluaron como marcadores de diagnóstico en seres humanos y animales mediante la prueba de ELISA para detectar anticuerpos específicos IgG e IgM (30). Las combinaciones de antígenos recombinantes han mostrado más sensibilidad y especificidad diagnóstica que el uso de un solo antígeno. Por ejemplo, las combinaciones de SAG2A, GRA2, GRA4, ROP2, GRA8 y GRA7 son potencialmente útiles para detectar anticuerpos IgG en una infección recientemente adquirida, así como las

proteínas ROP1, SAG1, GRA7, GRA8 y GRA6 son prometedores para detectar anticuerpos específicos de IgM, mientras que las proteínas GRA7 y GRA8 se utilizan para detectar anticuerpos IgA específicos (30). En un estudio se identificó una proteína específica de esporozoítos relacionada con la embriogénesis (TgERP), que puede reaccionar con anticuerpos específicos de ooquistes, y ser usado para detectar una infección temprana por esporozoítos implicando a los ooquistes como fuente de infección (46).

2.8.4.6. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima o ELISA indirecto.

El ensayo ELISA indirecto se utiliza comúnmente para detectar y cuantificar la cantidad de anticuerpos presentes en el suero. En esta prueba el soporte se encuentra unido al antígeno específico contra el que van dirigidos los anticuerpos que se están buscando en la muestra. Se inicia agregando la muestra de suero y si el anticuerpo está presente, se unirá al antígeno que ya estaba adherido al soporte, para después hacer un lavado y eliminar los restos que no se hayan unido al antígeno, posteriormente se agregará un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con una enzima, y este se unirá al anticuerpo, solo si este está presente en la muestra del paciente. Después del segundo lavado en el cual se eliminará todo el conjugado que no se unió, se adicionará el sustrato incoloro y este se teñirá más o menos en dependencia de la cantidad de conjugado que se encuentra presente (13).

2.8.4.7. Dot Blot

La técnica de Dot Blot es la simplificación de los métodos Southern Blot, Northern Blot o Western Blot, las cuales son técnicas de biología molecular. En el Dot Blot las biomoléculas a ser detectadas no se separan por cromatografía, la gota que contiene la molécula para ser detectada se coloca directamente sobre una membrana ya sea Nitrocelulosa o PVDF, esto es seguido por la detección de sondas de nucleótidos (Southern y Northern Blot) o anticuerpos (Western Blot), brindando gran ahorro de tiempo; aunque no ofrece información sobre el tamaño de las moléculas, por lo que solo puede confirmar la presencia o ausencia de las biomoléculas que pueden ser detectadas por las sondas de ADN o anticuerpos (15).

En el caso del Southern y Northern Blot, son técnicas eficientes basadas en la transferencia de los fragmentos de ADN/ARN al papel por acción del vacío o capilaridad que no solo facilita la transferencia, también la adhesión a la membrana o filtro (14). Estas técnicas permiten realizar ensayos rápidos con muchas secuencias clonadas por su homología con una sonda radioactiva. Los ADN clonados a probar se los coloca uno a

lado del otro sobre un filtro que se hibrida con una sonda de ADN/ARN marcado radiactivamente, si la secuencia está en un clon particular, la mancha que indica ese clon se pone de manifiesto con la autorradiografía (15). Sin embargo, cuando los reactantes son reemplazados por antígenos el ensayo de Dot Blot permite la detección colorimétrica de anticuerpos específicos presentes en muestras de sueros (15).

2.9. Tratamiento.

Anteriormente el tratamiento utilizado para *T. gondii* consistía en la combinación de Sulfadiazina y Pirimetamina. Recientemente se ha sugerido que la Clindamicina a dosis de 20-25 mg/kg/día (dividido en dos dosis) es el tratamiento de elección para la Toxoplasmosis felina. Aunque se presupone que el uso de la Clindamicina obvia el uso de la Pirimetamina, estudios realizados en pacientes humanos sugieren que la terapia dual es necesaria para mantener la eficacia del tratamiento. El panorama terapéutico en gatos no es muy claro todavía, aunque la combinación de Clindamicina con Pirimetamina a dosis de 1 mg/kg/día proporcione una terapia más efectiva. Es importante señalar que el uso de Pirimetamina a veces puede provocar una mielosupresión en gatos, por lo que se recomienda el suministro de Ácido fólico a dosis de 5 mg/kg/día durante todo el periodo de tratamiento (43).

3. Materiales Y Métodos

En el estudio se utilizaron 39 muestras de suero sanguíneo de gatos (*Felis catus domesticus*) seleccionados de acuerdo con las lecturas de densidad óptica obtenidas en un ensayo previo de ELISA indirecto no optimizado en el que se emplearon proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7, los sueros son pertenecientes al banco de sueros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

3.1. Optimización del ensayo de ELISA indirecto con las proteínas TgSAG2 y TgGRA7

Se usó dos tipos de placas, dos soluciones de bloqueo, dos soluciones de dilución de los sueros y dos tipos de sustratos, en un total de 16 combinaciones (4 variables con dos niveles cada una de ellas) y con dos mezclas de los sueros con los valores de densidad óptica altos (A) y bajos (B), adicionalmente como control negativo (N) no se usó suero.

3.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Placas de 96 pozos [**P1** (MaxiSorp, Nunc, No. cat.: 442404) y **P2** (MultiSorp, Nunc, No. cat.:467340)].
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas.
- Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones.
- Agitador orbital.
- Potenciómetro (pHmetro).
- Balanza analítica.
- Lector de placas de ELISA.
- Computadora.

3.1.2. Materiales biológicos

Muestras de suero sanguíneo.

Proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7 de *T. gondii*, proporcionados por el Dr. Antonio J. Vallecillo, del Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca.

3.1.3. Materiales químicos

Soluciones para la sensibilización de las placas, consiste en Buffer de carbonatos (100 mM de Na₂CO₃ (Merck, No. cat.: 106393); 100 mM de NaHCO₃ (Merck, No. cat.: 144558), pH 9.6) con 0.1 µg de la proteína TgSAG2 o 0.2 µg de la TgGRA7 por pozo (1 µg/ml o 2 µg/ml, respectivamente).

Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7.4, (137 mM de NaCl (Sigma, No. cat.: S3014); 2.7 mM KCl (Sigma, No. cat.: 746436); 10 mM NaH₂PO₄ (Fisher, No. cat.: S369-1); 1.8 mM KH₂PO₄ (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4).

Solución para el lavado de las placas (PBS-T0.05) (PBS, pH 7.4 y 0.05% de Tween 20 (Sigma, No. cat.: P1379)).

Solución para el bloqueo de las placas **B1** (PBS-T0.05-M3) (PBS-T0.05; 3 % de Leche descremada (Ahold® Instant Nonfat Dry Milk, Foodhold U.S.A.)).

Solución para el bloqueo de las placas **B2** (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3% de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001)).

Solución para la dilución de los sueros **D1** (PBS-T0.05-M3) (PBS-T0.05; 3 % de Leche descremada (Ahold® Instant Nonfat Dry Milk, Foodhold U.S.A.)).

Solución para la dilución de los sueros **D2** (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3% de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001)).

Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 100 ng/ml de Proteína A-HRP-(Horseradish peroxidase) (MP Biomedical, No. cat.: 0855901).

Solución del sustrato para la peroxidasa **S1** (Solución de ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)) (100 mM de Ácido cítrico (Sigma, No. cat.: 791725), pH 4.5; 1 mg/ml de ABTS (Sigma, No. cat A1888) y 1:1,000 (v/v) de una solución de H₂O₂ al 30%(Fisher, No. cat H325-4).

Solución del sustrato para la peroxidasa **S2** (Solución de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)) (100 mM de Ácido cítrico (Sigma, No. cat.: 791725), 100 mM Acetato de sodio (Sigma, No. cat.: S2889) pH 5.0; 0.1 mg/ml de TMB (Sigma, No. cat 860336) y 1:1,000 (v/v) de una solución de H₂O₂ al 30 % (Fisher, No. cat H325-4).

Solución de paro para la solución de sustrato **S2** (2 M de Ácido sulfúrico (Pharmaco-Aaper, No. cat.: 290000ACS)).

3.1.4 Procedimiento

Paso 1: Para el ensayo ELISA indirecto se inició con la sensibilización de ambos tipos de placas **P1** (MaxiSorp) y **P2** (MultiSorp) por duplicado usando en total 4 placas sensibilizadas. Para realizar la solución sensibilizadora se preparó un total de 100 µl de solución para la proteína TgSAG2 a una concentración de 1 µg/ml y 100 µl de solución para la proteína TgGRA7 a una concentración de 2 µg/ml. A las placas se las sensibilizó solo las filas A, B, E Y F, para luego incubarlos por toda la noche (14-16h) a una temperatura de 4 °C. **Ver diagrama 1 en Anexo 1.**

Paso 2: Al finalizar la incubación se retiró la solución sensibilizadora de las placas, para continuar con el bloqueo de estas, se colocaron 125 µl de la solución de bloqueo 1 (**B1**) en la mitad de cada una de las placas y 125 µl de solución de bloqueo 2 (**B2**) en la otra mitad de las placas, para después ser incubadas por 2 horas a una temperatura de 23 a 25 °C en estático. **Ver diagrama 2 en Anexo 1.**

Paso 3: Una vez concluido el bloqueo de las placas, se realizó el primer lavado de las placas con su respectiva solución de lavado repitiendo tres veces durante 5 min en agitación a temperatura ambiente. Luego del lavado se colocó la solución de dilución 1 (**D1**) BSA en la mitad de cada una de las placas P1 y P2; y la dilución 2 (**D2**) Leche descremada en la otra mitad de las placas. Posteriormente se colocaron los sueros de

titulación alta (**A**) baja (**B**) y sin suero (**N**) en las placas, a una dilución de sueros de 1:50 en la solución para dilución. **Verdiagrama 3 en Anexo 1.**

Paso 4: Las placas con las muestras de sueros se incubaron por 1 hora, en agitación constante a temperatura ambiente, acabada la incubación se realizó tres lavados, de 5 min con la solución de lavado.

Paso 5: luego de los lavados, se adicione 50 µl de la solución con la proteína A-HRP, y se las incubó por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante.

Paso 6: Posteriormente se procedió con el lavado correspondiente con la solución de lavado, 3 lavados de 5 min por cada lavado.

Paso 7: A continuación, se adicionó 50 µl de la solución de Sustratos: ABTS (**S1**) en las filas 1, 2, 3, 7, 8 y 9 de las placas; y TMB (**S2**) en las filas 4, 5, 6, 10, 11 y 12 de las placas, para incubarlos por unos 15 minutos a temperatura ambiente, en estático y protegido de la luz. **Verdiagrama 4 y 5 en Anexo 1**

Paso 8: Finalizado el periodo de la incubación se procedió a realizar la lectura en el lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 410 nm para el caso del Sustrato 1 (ABTS). Para el caso del Sustrato 2 (TMB) antes de realizar su lectura a una onda de 450nm se adicionó 50µl de la solución de paro.

3.2. Optimización del ensayo de Dot Blot

Se utilizaron dos tipos de membranas (PVDF y Nitrocelulosa), dos soluciones de bloqueo, dos soluciones de dilución de los sueros y dos tipos de sustratos, en un total de 16 combinaciones (4 variables con dos niveles cada una de ellas) con las dos mezclas de los sueros con los valores de densidad óptica alta, intermedia y baja.

3.2.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

Porciones (7 X 60 mm) de membranas de PVDF [**M1** (Thermo scientific, No. cat.: 88520)] y Nitrocelulosa [**M2** (GL Healthcare Life science, No. cat.: 10600064)]

Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas

Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones

Agitador orbital

Potenciómetro (pHmetro)

Balanza analítica

Lector de placas de ELISA

Computadora

3.2.2. Materiales biológicos

Muestras de suero sanguíneo

Proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7 de *T. gondii*.

3.2.3. Materiales químicos

Soluciones para la sensibilización de las membranas, consiste en Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7.4, (137 mM de NaCl (Sigma, No. cat.: S3014); 2.7 mM KCl (Sigma, No. cat.: 746436); 10 mM NaH₂PO₄ (Fisher, No. cat.: S369-1); 1.8 mM KH₂PO₄ (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4) con 250 µg/ml de las proteínas TgSAG2 y TgGRA7 (2.5 µg en 10 µl para cada *dot*).

Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7.4, (137mM de NaCl (Sigma, No. cat S3014); 2.7mM KCl (Sigma, No. cat 746436); 10 mM NaH₂PO₄ (Fisher, No. cat S369-1); 1.8 mM KH₂PO₄ (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4)

Solución para el lavado de las membranas (PBS-T0.05) (PBS, pH 7.4 y 0.05% de Tween 20(Sigma, No. cat.: P1379))

Solución para el bloqueo de las membranas **B1** (PBS-T0.05-M3) (PBS-T0.05; 3 % de Lechedescremada (Ahold® Instant Nonfat Dry Milk, Foodhold U.S.A.))

Solución para el bloqueo de las membranas **B2** (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3 % de BSA(Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001))

Solución para la dilución de los sueros **D1** (PBS-T0.05-M3) (PBS-T0.05; 3 % de Leche descremada (Ahold® Instant Nonfat Dry Milk, Foodhold U.S.A.))

Solución para la dilución de los sueros **D2** (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3% de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001))

Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 100 ng/ml de Proteína A-HRP-(Horseradish peroxidase) (MP Biomedical, No. cat.: 0855901)

Solución del sustrato para la peroxidasa **S1** [Solución 2.5 µg/ml de DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (Sigma, No. cat.: D5637)) en 100 mM de

Imidazol (Acris organic, No. cat.: 12202-1000), pH 7.0; 10 mM de NiCl₂ y 1:1,000 (v/v) de una solución de H₂O₂ al 30 % (Fisher, No. cat H325-4)]

Solución del sustrato para la peroxidasa **S2** [Solución 500 µg/ml de 4CN (4-Chloro-1-naphthol, (Sigma, No. cat.: C8890), previamente disuelto a 3 mg/ml en Metanol (Fisher chemical, No. cat A412)) en TBS 1X, pH 7.5 (20 mM de Tris-HCl (Sigma, No. cat.: T4661, 320337), pH 7.5; 500 mM NaCl (Sigma, No. cat.: S3014)) y 1:2,000 (v/v) de una solución de H₂O₂ al 30% (Fisher, No. cat H325-4).

3.2.4. Procedimiento

Para el método de Dot Blot se inició con la preparación de las membranas de PVDF (**M1**) y Nitrocelulosa (**M2**), de los cuales se utilizaron un total de 24 tiras de cada tipo de membrana, todas las membranas se dividieron en 6 áreas de 7 X 7 mm con lápiz, con una zona restante de 18 mm para identificarlos.

Paso 1: Se inició con el proceso de la sensibilización de las membranas, para las M1 se activaron sumergiéndolas en Metanol, mientras que las M2 se las activaron con agua destilada. En las 3 primeras áreas de ambos tipos de membranas se colocaron 10 µl de solución con proteína TgSAG2 (250 µg/ml) y en las otras 3 zonas restantes, de igual forma se colocaron 10 µl de la solución de la proteína TgGRA7 (250 µg/ml) y se las dejó secar a temperatura ambiente, durante toda la noche protegidas del polvo. **Ver diagrama 1 en Anexo B.**

Paso 2: Después de la sensibilización de las membranas con las proteínas recombinantes, se continuó con el bloqueo de éstas, para lo cual se separaron 12 membranas de PVDF con 12 membranas de Nitrocelulosa, a las que se colocó en un recipiente con la solución de bloqueo 1 en base a BSA. Y las 24 porciones de membranas restantes en otro recipiente que contenía la solución de bloqueo 2 con Leche descremada, y en ambos casos fueron incubadas por una hora en agitación constante a temperatura ambiente (± 23 °C). **Ver diagrama 2 en Anexo B.**

Durante el paso dos también se procedió a descongelar las mezclas A y B de sueros sanguíneos y se diluyeron 1:100 en 1 ml de la solución de dilución de los sueros sanguíneos D1 y D2. La solución D1 se colocó en un recipiente y la solución D2 en otro recipiente.

Paso 3: Una vez concluido el bloqueo de las membranas, se separan en dos subgrupos de 12 tiras, para luego sumergirlas a un grupo en la dilución D1 y las otras 12 tiras en la dilución D2, para incubarlos por 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. **Ver diagrama 3 en Anexo B.**

Paso 4: Luego de la incubación, se retiró la solución de los sueros diluidos de los recipientes para posteriormente realizar 3 lavados, por 5 min cada lavado en agitación constante.

Paso 5: Después las tiras fueron incubadas en la solución con la proteína A-HRP, en agitación constante a temperatura ambiente por 1 hora. Una vez concluida la incubación se procedió a realizar 3 lavados por 5 min, en agitación constante.

Paso 6: Una vez finalizados los lavados, se prepararon las respectivas soluciones de sustratos S1 Y S2, cuidadosamente se colocaron las membranas y se mantuvieron en incubación en agitación por 5 min en cada una de las soluciones de los sustratos. **Ver diagrama 4 y 5 en Anexo B.**

Paso 7: Finalmente se realizó el lavado dos veces por 5 min en agua destilada estéril. Las membranas lavadas se dejaron secando a temperatura ambiente, se ordenaron y fijaron a un soporte de papel, para proceder con el escaneo.

Paso 8: Las imágenes se analizaron mediante el software libre Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) con el cual se evaluó la intensidad de la señal obtenida en los ensayos Dot Blot.

Todos los resultados obtenidos tanto en el ensayo de ELISA Indirecto y Dot Blot fueron sometidos al análisis de varianza o ANOVA para identificar diferencias significativas entre sus medias cuyos valores son significativos con un p valor menor a 0.05. Para analizar las correlaciones dentro de cada una de sus variables se realizaron test de Duncan para establecer diferencias significativas. Se utilizó el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics para Windows, versión 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) para analizar todos los datos.

4. Resultados

4.1. Evaluación de la calidad y estimación de la cantidad de los antígenos

Las proteínas TgSAG2 y TgGRA7 obtenidas y purificadas mediante el método de Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados (IMAC) antes de emplearse en los ensayos de ELISA indirecto y Dot Blot fueron resueltas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, para evaluar la calidad de las proteínas (integridad y ausencia de contaminantes) (Ver **Figura 6**) y estimar la cantidad de ambos antígenos teniendo como referencia una curva de concentración de BSA fracción V (Resultado no mostrado).

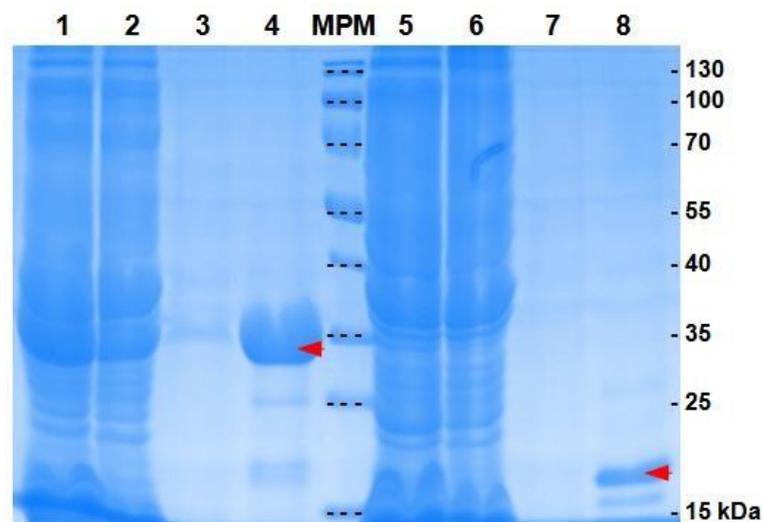


Figura 6. Antígenos recombinantes TgGRA7 y TgSAG2. Imagen de SDS-PAGE los extractos solubles de las cepas recombinantes de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Carriles 1 y 5), la fracción no pegada de la IMAC (Carriles 2 y 6), último lavado de la resina IMAC (Carriles 3 y 7) y fracción eluida (Carriles 4 y 8). Las puntas de flecha indican en las fracciones eluidas la presencia de las proteínas TgGRA7 (Carril 4) y TgSAG2 (Carril 8). Carril MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, No. cat.: 26616).

4.2. Optimización de los ensayos de ELISA indirecto

Con los antígenos obtenidos se procedió al desarrollo de los ensayos para la optimización del ELISA indirecto, con los materiales e insumos mencionados y los procedimientos descritos en la sección de materiales y métodos. A continuación, se muestran en cada una de las Figuras (7 a 10) los distintos gráficos de dispersión de los datos obtenidos del ensayo ELISA indirecto con sus respectivas variables en donde las combinaciones que mostraron mayor diferencia en los valores de densidad óptica y menor señal de fondo en

los ensayos se marcan en los recuadros de color rojo.

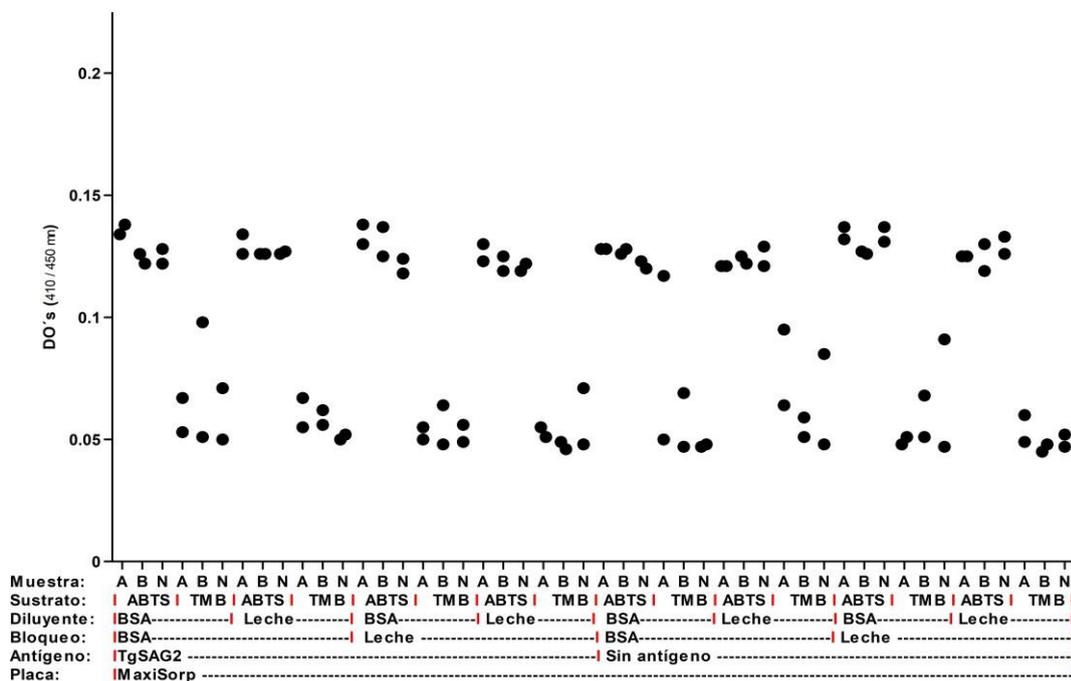


Figura 7. Gráfico *dotplot* de los valores de densidad óptica del ensayo de ELISA indirecto usando antígeno TgSAG2 con placa MaxiSorp. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) en los puntos de dispersión entre las variables evaluadas (Antígeno, Bloqueo, Diluyente, Sueros y Sustratos) pues no hay una correcta dispersión en base a los sueros altos (A) en contraste con los sueros bajos (B) o sin sueros (N) al usar como antígeno recombinante a TgSAG2.

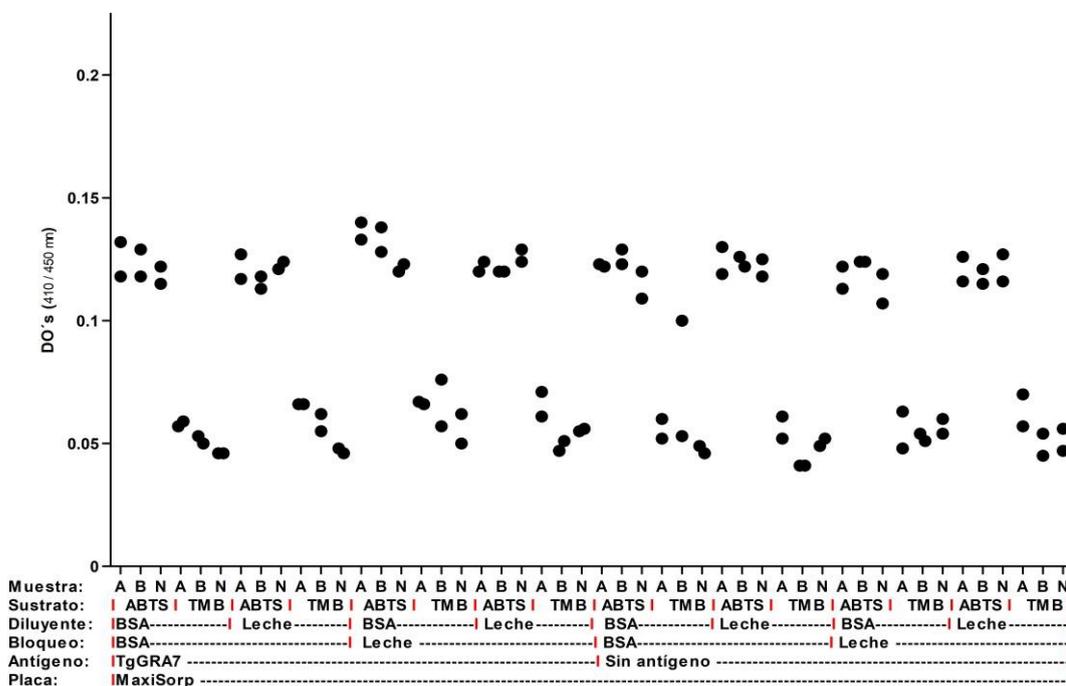


Figura 8. Gráfico *dotplot* de densidad óptica del ensayo de ELISA indirecto usando antígeno TgGRA7 con placa MaxiSorp. No se encontró diferencia significativa ($P \geq 0.05$) pues al observar los

Como se muestra en la **Figura 10** al usar la placa de tipo MultiSorp con la proteína recombinante TgGRA7 se observó una dispersión en los resultados al realizar el bloqueo con BSA, como solución de dilución al BSA y como sustrato al ABTS, se puede observar diferencial al comparar entre los sueros de titulación altos (A), bajos (B) y sin suero (N) de igual manera estos contrastan al momento de compararlos con los resultados de los pozos que no contenían antígeno, como se muestra en los cuadros de color rojo y azul.

Al realizar la comparación entre las variables propuestas para realizar el ELISA indirecto, con ayuda del modelo estadístico ANOVA y Test de Duncan se obtuvo:

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.25	9	0.03	142.78	<0.0001
Membrana	3.6E_03	2	1.8E_03	9.39	0.0001
Sueros	0.23	1	0.23	1222.46	<0.0001
Sustrato	1.5E_04	1	1.5E_04	0.76	0.3830
Dilución	8.1E_05	1	8.1E_05	0.42	0.5158
Bloqueo	3.9E_03	3	1.3E_03	6.85	0.0002
Antígeno	4.2E_03	1	4.2E_03	22.04	<0.0001
Error	0.03	182	1.9E_04		
Total	0.28	191			

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza del ELISA indirecto.

Se observan diferencias significativas con un (p valor < 0.05) tanto en la muestra, sustrato, antígeno y placa en relación con las otras variables analizadas. Tomar en cuenta estos pasos al momento de realizar el ensayo ELISA indirecto con el fin de obtener mejores resultados diagnósticos y evitar falsos positivos.

Al utilizar las placas para realizar el ELISA indirecto se observa diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) mostrando que la placa MultiSorp es la más adecuada para realizar diagnóstico de exposición y posible infección de *T. gondii* en comparación con la placa MaxiSorp (**Ver Anexo G.a**).

Los resultados obtenidos del ELISA indirecto para detectar antígenos anti-*T. gondii* en gatos se pudo observar diferencia significativa entre ambos antígenos en donde el antígeno TgSAG2 ($p \leq 0.05$) mostró mayor diferencia entre los valores de DO de los sueros A (Altos) y B (Bajos) en comparación con el antígeno TgGRA7 (**Ver Anexo G.c**).

En el bloqueo de placas se encontró mayor diferencia significativa al usar como bloqueo al BSA ($p \leq 0.05$) en comparación con la leche descremada (**Ver Anexo G.d**).

Como solución de dilución para el ensayo de ELISA indirecto, se obtuvo mayor efectividad al utilizar como dilución a la albúmina sérica bovina o BSA ($p \leq 0.05$) en comparación con la leche descremada, mostrando diferencia estadística significativa (**Ver Anexo G.e**). Finalmente, al realizar el ensayo de ELISA indirecto en cuanto al sustrato, se usaron dos

sustratos, el ABTS y el TMB, el sustrato con el que se obtuvieron mejores resultados fue ABTS ($p \leq 0.05$) en comparación con TMB, mostrando diferencia significativa y mejores resultados de dispersión entre sueros de titulación alta con los sueros de titulación baja o sin sueros (**Ver Anexos G.f**).

4.3.Optimización de los ensayos de Dot Blot

A continuación, se muestran los distintos diagramas de dispersión, como resultado del ensayo Dot Blot con sus respectivas variables, en donde se puede observar las combinaciones con mayor diferencia significativa, en sus valores de intensidad de la señal (se marcan en los recuadros de color azul).

Los resultados obtenidos al utilizar la membrana de Nitrocelulosa con la proteína recombinante TgSAG2, no se obtuvo ninguna dispersión de puntos significativa, ya sea utilizando como bloqueo al BSA o leche descremada, tampoco con el uso de BSA o leche descremada como solución de dilución, no se observó respuesta alguna al momento de colocar los dos tipos de sustratos DAB o 4CN, mostrando respuesta nula a los sueros de titulación alta, bajas o sin suero, incluso se observó mayor intensidad de fondo en muestras sin suero demostrando nulidad en los resultados (Véase **Figura 11**). Como se muestra en la **Figura 12** al utilizar la membrana de Nitrocelulosa con la proteína recombinante TgGRA7, no muestra resultados favorables ni se observa diferencia en la intensidad de los sueros con titulaciones altas (A), bajas (B) o sin suero (N), con ninguno de los dos sustratos (DAB o 4CN), ni con el uso de las diluciones (BSA o leche descremada), tampoco reacción a ninguno de los bloqueos (BSA o leche). Se observan resultados no válidos.

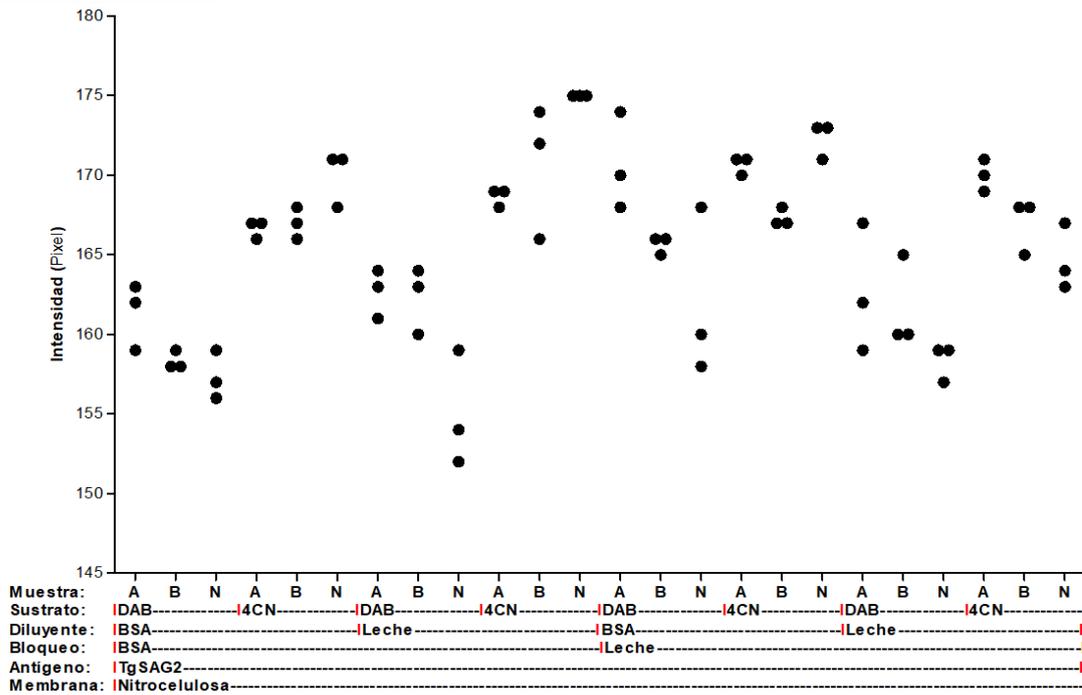


Figura 11. Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgSAG2 en la membrana Nitrocelulosa. No muestra ninguna diferencia significativa entre variables (Antígeno, Bloqueo, Diluyente, Sueros y Sustratos).

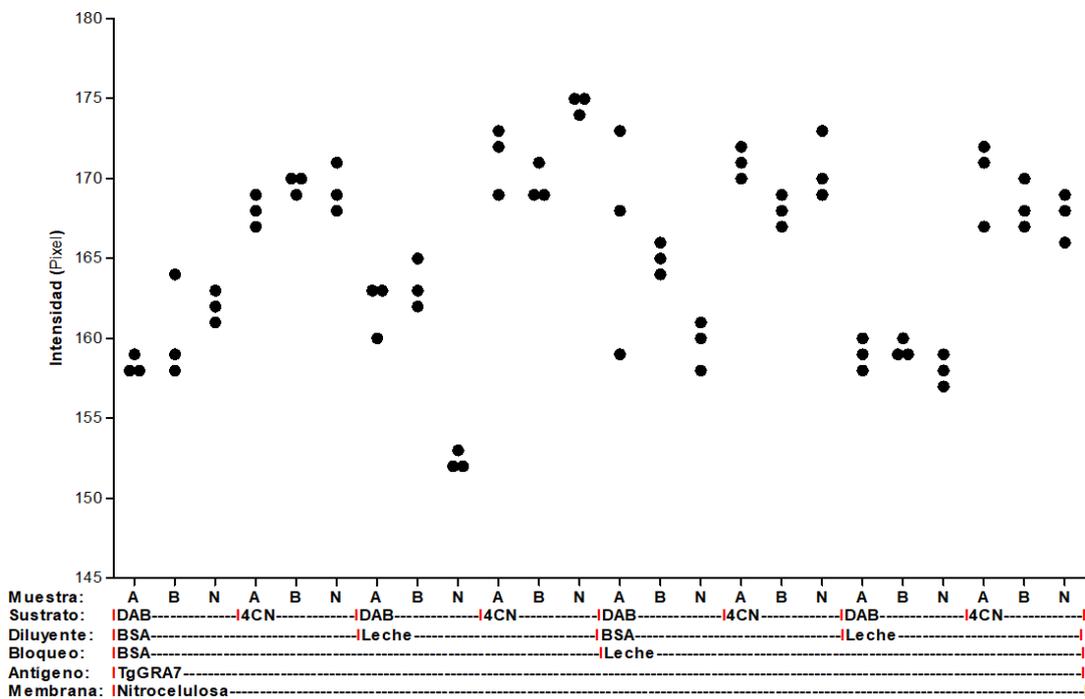


Figura 12. Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgGRA7 en la membrana Nitrocelulosa. No muestra ninguna diferencia significativa entre variables (Antígeno, Bloqueo, Diluyente, Sueros y Sustratos).

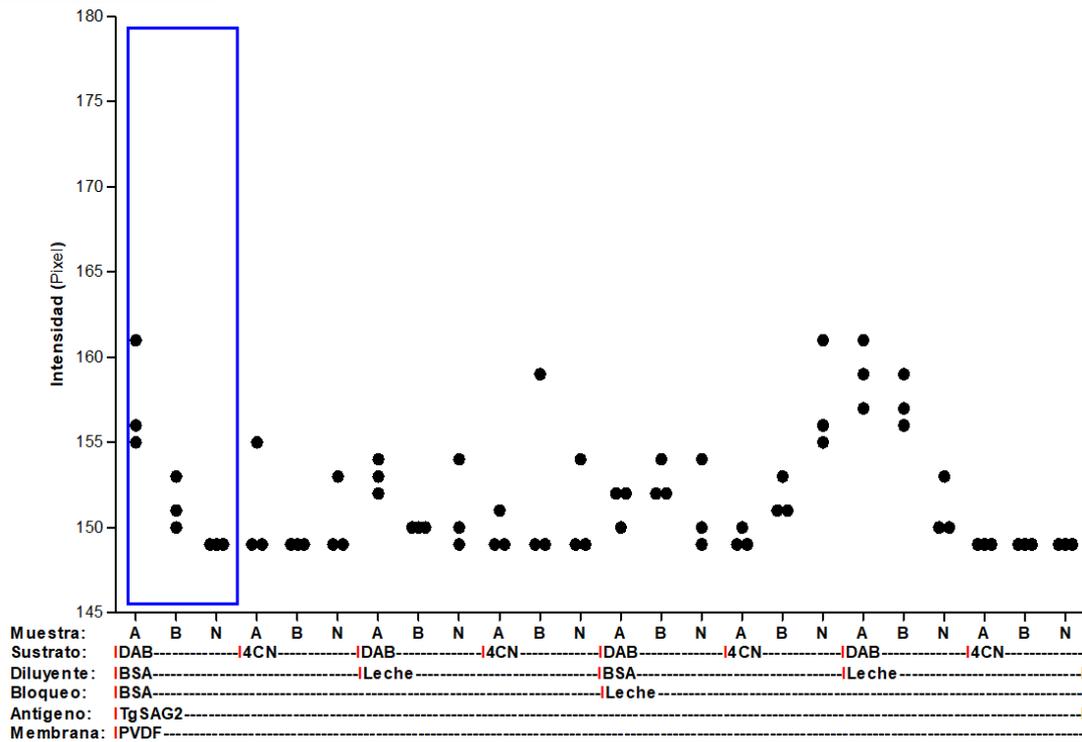


Figura 13. Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgSAG2 en la membrana PVDF. Se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sus variables (bloqueo BSA, diluyente BSA, sustrato DAB). Existe contraste entre sueros altos (A) en comparación con los sueros bajos (B) y sin suero (N).

De igual manera los resultados obtenidos con el uso de la membrana PVDF y la proteína recombinante TgGRA7 (**Figuras 13 y 14**), los valores (Pixel) de intensidad del color de la zona de detección son más altos en los sueros de titulación alta (A) en comparación con los sueros de titulación baja (B) o sin suero (N), al utilizar como sustrato a la solución con DAB, como solución de dilución al BSA y como solución de bloqueo con BSA.

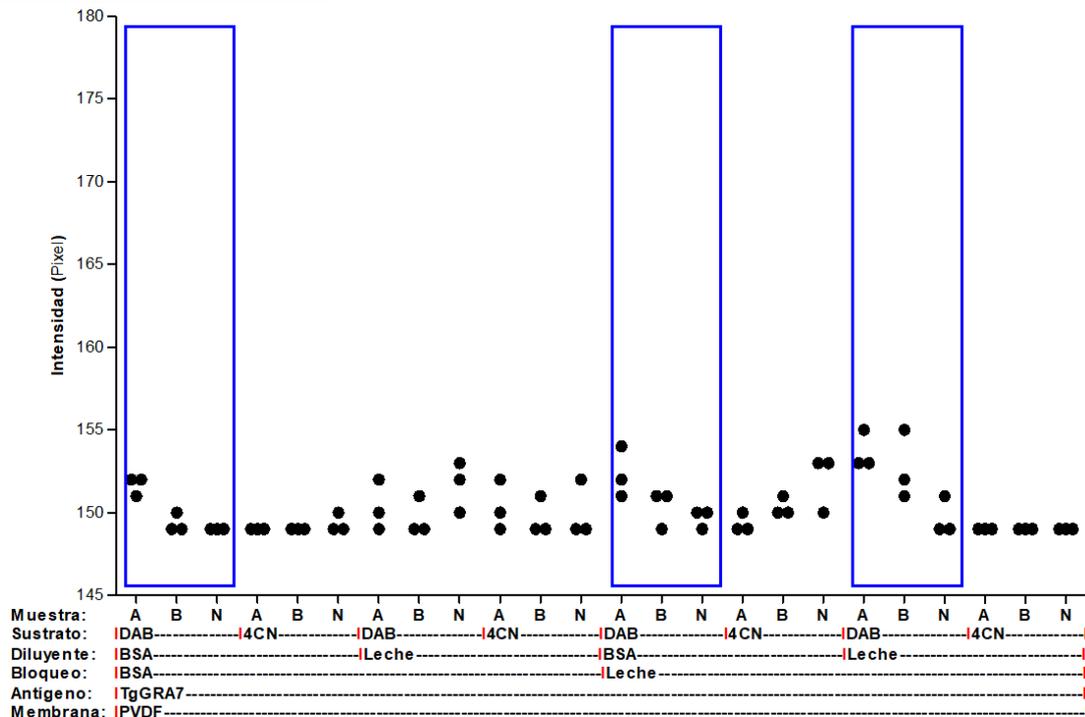


Figura 14. Diagrama de dispersión de las puntuaciones obtenidas con Dot Blot usando antígeno TgGRA7 en la membrana PVDF. Se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sus variables (bloqueo BSA, diluyente BSA, sustrato DAB).

Al momento de realizar el análisis estadístico ANOVA y Test de Duncan para el ensayo de Dot Blot se obtuvieron los siguientes resultados:

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5262.40	7	751.77	50.50	<0.0001
Membrana	4902.04	1	4902.04	329.27	<0.0001
Sueros	33.81	2	16.91	1.14	0.3259
Sustrato	287.04	1	287.04	19.28	<0.0001
Dilución	2.67	1	2.67	0.18	0.6732
Bloqueo	20.17	1	20.17	1.35	0.2476
Antígeno	16.67	1	16.67	1.12	0.2929
Error	1310.10	88	14.89		
Total	6572.50	95			

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza del ensayo Dot Blot.

Se observan diferencias significativas con un (p valor < 0.05) tanto en membrana y en sustrato en relación con las otras variables analizadas. Tomar en cuenta estos pasos al momento de realizar el ensayo Dot Blot con el fin de obtener mejores resultados diagnósticos y evitar falsos positivos o viceversa.

Los resultados obtenidos en el ensayo Dot Blot para detectar antígenos anti-*T. gondii* en gatos indican que; al realizar la comparación estadística entre membranas, la membrana de Nitrocelulosa ($p \leq 0.05$) es la más idónea para realizar diagnóstico de exposición a *T. gondii* (Ver Anexo H.a).

En cuanto a la comparación de ambos antígenos, tanto el antígeno TgSAG2 como el antígeno TgGRA7 no mostraron significancia estadística ($p \geq 0.05$) al usarse uno o el otro en el Dot Blot (**Ver Anexo H.c**). Por otro lado, al evaluarse el agente de bloqueo de las membranas se encontró mayor diferencia significativa al usar como bloqueo a la leche descremada ($p \leq 0.05$) en comparación con la albúmina sérica bovina o BSA (**Ver Anexo H.d**), y como aditivos en la solución de dilución no se observó diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre la leche descremada y BSA (**Ver Anexo H.e**). Como sustrato se obtuvieron mejores resultados con 4CN ($p \leq 0.05$) en comparación con el DAB (**Ver Anexo H.f**).

Finalmente, en la comparación de los dos tipos de ensayos, tanto con el uso del ELISA indirecto como el Dot Blot con ayuda del modelo estadístico ANOVA y Test de Duncan para comparar la capacidad de identificar gatos seropositivos a *T. gondii*, no hubo diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre el ensayo de ELISA indirecto y Dot Blot, así que ambos pueden emplearse en la identificación de felinos expuestos y potencialmente infectados por *T. gondii*. El uso de cualquiera de estas pruebas dependerá de las condiciones en las que se encontraría el Médico Veterinario para realizarlas, en especial cuando es trabajo de campo; el uso del ensayo Dot Blot sería ideal pues no requiere equipos sofisticados y sus resultados son rápidos.

Error: 0.5776 gl: 282

Método	Medias	n	E.E.
Elisa	3.9E-04	192	0.06 A
Dot Blot	6.0E-04	96	0.08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 3. Resultados test de Duncan, comparación entre ensayo ELISA indirecto y Dot Blot.

Discusión

En esta investigación se presenta el proceso de optimización de un ensayo de ELISA indirecto para identificar anticuerpos anti-*T. gondii* con el empleo de las proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7, indicando las condiciones más adecuadas del ensayo que favorecen a obtener mejores valores de densidad óptica en los sueros positivos a la presencia de anticuerpos en contraste a los valores de los sueros negativos, ausencia de suero o antígeno.

Se ha demostrado que el ensayo de ELISA indirecto es sensible y específico a nivel diagnóstico para identificar la exposición a *T. gondii*; según Cay y colaboradores (48) la proteína recombinante TgGRA7 es un marcador serodiagnóstico prometedor para la infección por *T. gondii* en gatos, sin embargo, en la presente investigación se encontró que la proteína TgSAG2 bajo las condiciones experimentales optimizadas permite identificar de manera más clara la presencia de anticuerpos, de manera similar a lo descrito por Rengifo C, y colaboradores (50) quienes utilizaron un ELISA indirecto comercial para determinar la seroprevalencia de la infección por *T. gondii* en 456 perros domésticos en Panamá y también con lo reportado por Alalí, Sevínç & Ceylan (51) donde utilizaron antígeno recombinante TgSAG2 en un ensayo de ELISA indirecto para identificar perros seropositivos en Turquía, que en el 33,8 % de los perros incluidos en el estudio fueron positivos a la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*.

Existen varios antígenos recombinantes (SAG1, SAG2, ROP2, ROP4, GRA1, GRA2, GRA5, GRA7) que se han reportado para el serodiagnóstico de *T. gondii* en humanos y animales utilizando ELISA indirecto, entre ellos se sugiere que GRA7 es un buen antígeno para el diagnóstico serológico, ya que se expresa en taquizoitos y bradizoitos de *T. gondii*, e induce fuertes respuestas de anticuerpos ya sea en etapas tempranas o tardías de la infección (49). Mientras que la proteína SAG2 es la segunda proteína en abundancia en la superficie del parásito y al igual que la SAG1, solo está presente en el estadio de taquizoito, es reconocida por los sueros de animales y humanos infectados aguda y crónicamente, y muestra una respuesta más fuerte en los individuos en fase aguda. Se cree puede estar involucrada en los procesos de invasión celular, específicamente en la reorientación apical del parásito.

En cuanto al diagnóstico con Dot Blot para identificar anticuerpos contra *T. gondii*, los resultados fueron positivos, pudiendo ser considerado para el desarrollo de un test diagnóstico sencillo y económico, sin necesidad de equipos sofisticados preferible en trabajo de campo, un estudio realizado por Costa JG. y colaboradores (47) confirman el uso de membranas de Nitrocelulosa para el diagnóstico de toxoplasmosis, debido a la capacidad de absorción de la membrana de proteínas, no solo en el diagnóstico de toxoplasma sino también

con varias infecciones por bacterias, virus y otros parásitos, como su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en zonas remotas, sin mayor demanda de infraestructura y equipamiento (47)

Conclusiones

Se optimizó el ensayo ELISA indirecto y se identificó la combinación del tipo de placa de 96 pozos, agente bloqueante, diluyente de los sueros y los sustratos respectivos que evidencia que las muestras de suero positivos y negativos a la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* mostraron mayor diferencia entre los valores de densidad óptica/intensidad del reconocimiento y menor señal de fondo en los ensayos útiles para identificar la posible exposición a *T. gondii* en los gatos, con el uso de las proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7.

Se optimizó el ensayo Dot Blot, identificando la combinación del tipo de membrana adecuado, agente bloqueante, diluyente de los sueros y los sustratos respectivos que permite evidenciar que las muestras de suero positivos y negativos a la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* mostraron mayor diferencia entre los valores de densidad óptica del reconocimiento y menor señal de fondo en los ensayos útiles para identificar la exposición a *T. gondii* en los gatos, con el uso de las proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7.

Se comparó la capacidad para identificar gatos seropositivos a *Toxoplasma gondii* entre los ensayos de ELISA indirecto y Dot Blot optimizados para detectar anticuerpos con el uso de los antígenos recombinantes TgSAG2 y TgGRA7, demostrando que ambos ensayos son útiles para el diagnóstico del *T. gondii*.

Recomendaciones

1. Realizar la toma de muestras serológicas de manera adecuada, transportarlas y almacenarlas de forma correcta para obtener resultados de mejor calidad y confiables, reduciendo así posibles falsos positivos o viceversa.
2. Validar previamente ambos métodos tanto el ensayo ELISA indirecto como del Dot Blot utilizando sueros de calidad, colectados de animales con previo diagnóstico (Directo o indirecto) de Toxoplasmosis.
3. Usar ambas proteínas en mayor concentración en el ensayo de Dot Blot para obtener resultados más claros.
4. Validar los tiempos empleados para cada paso de ambos los ensayos.

Referencias

- Grandia R, Enterna A, Cruz J. Toxoplasmosis en *Felis catus*: Etiología, epidemiología y enfermedad. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2013;24(2):131–149. Disponible en: <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i2.2469>.
- Dubey J. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Beltsville, Maryland: Taylor y Francis Group CRC Press; 2010. p. 313.
- Nicolle C, Manceux L. On a Leishman body infection (or related organisms) of the gondi Int JParásitol. 2009;39(8):863-486. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.001>
- Ferra B, Holec-Gasior L, Galewska. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens in the serodiagnosis of toxoplasmosis in domestic and farm animals. Animals 2020;10(8):1245. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ani10081245>.
- Sabaj V, Galindo M, Silva D, Sandoval L, Rodríguez JC. Analysis of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 gene (SAG2). Relevance of genotype I in clinical toxoplasmosis. Mol Biol Rep. 2010;37(6):2927-2933. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9854-2>.
- Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. Int J Parásitol. 2013;43(2):107-113. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.012>.
- Salant H, Spira DT. A cross-sectional survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Jerusalem cats. Vet Parásitol. 2004;124(3-4):167-177. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.011>.
- Gorman G. T. Algunos antecedentes sobre toxoplasma y toxoplasmosis. Monogr. Med. Vet., 1993;15(1-2). Disponible en: <https://revistaderechoambiental.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/5003>
- Gómez, F. Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alto Urgell. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universitat de Barcelona. Departament de Biologia Animal; 2004. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/786>
- Durlach R, Martino P. *Toxoplasma gondii*: Infección en Perros y Gatos [Internet]. Veterinaria Argentina 2009. Disponible en: <https://www.veterinariargentina.com/revista/2009/08/toxoplasma-gondii-infeccion-en-perros-y-gatos/>
- Durlach R, y otros. Consenso argentino de toxoplasmosis congénita 2020. Med. Buenos Aires. 2021;81:.257-268. Disponible en: <https://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol81-21/n2/257.pdf>

De la Torre B, Aceves M, Díaz D. Toxoplasmosis. Revista Médica MD 2011;3(2):78-84. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2011/md112f.pdf>

Ríos J, Mercadillo P y otros. ELISA y sus aplicaciones en dermatología. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2012;10(3):212-222. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2012/dcm123j.pdf>

Cabrera, Osmir, y otros. Dot Blot para determinar la identidad antigénica en vacunas conjugadas contra *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F. Vaccinmonitor. 2017;26(1):1-7 Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2017000100001

Lleonart ME, Sanchez R., Martón-Duque P. Ramón y Cajal R. Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnóstico anatomopatológico. Patología Molecular. 1997. Disponible en: <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n3/13.pdf>.

Teimouri, Aref, y otros. Development, optimization, and validation of an in-house Dot- ELISA rapid test based on SAG1 and GRA7 proteins for serological detection of *Toxoplasma gondii* infections. Infect Drug Resist. 2019;12:2657-2669. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/IDR.S219281>

Zedong W, y otros. Production and evaluation of recombinant granule antigen protein GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cattle. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(9):734-739. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1749>

Sabaj V, y otros. Analysis of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 gen (SAG2). Relevance of genotype I in clinical toxoplasmosis. Mol Biol Rep. 2010;37(6):2927-2933. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9854-2>.

Ferra G, Holec-Gąsior L, Grażlewska W. Toxoplasma gondii recombinant antigens in the serodiagnosis of toxoplasmosis in domestic and farm animals. Animals (Basel). 2020;10(8):1245. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ani10081245>.

Radman N, Gamboa M, Mastrantonio F. Parasitología comparada. Modelos parasitarios. Parte I. Protozoos. 1ra ed. Buenos Aires:Editorial Universidad Nacional de La Plata; 2023.p. 23.

Nagel SD; Boothroyd J. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. J. Biol. Chem. 1989;264(10):5569-5574. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83584-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83584-0).

Manger ID, Hehl AB, Boothroyd J. The surface of toxoplasma tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. Infect Immun. 1998;66(5):2237-4422. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/IAI.66.5.2237-2244.1998>.

- Schwarz JA, y otros. A novel rhoptry protein in *Toxoplasma gondii* bradyzoites and merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;144(2):159-166. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.011>.
- Cortez E, y otros. Immunolocalization of an osteopontin-like protein in dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and its association with the parasitophorous vacuole. *Micron.* 2008;39(1):25-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.08.007>.
- Wang Z. Production and evaluation of recombinant granule antigen protein GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cattle. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(9):734-973. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1749>.
- Neves DP, y otros. *Parásitología humana*. 11ava ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 163.
- Ochoa-Amaya J. Toxoplasmosis Sistémica en un Canguro Rojo (*Macropus rufus*) Cautivo. *Int. J. Morphol.* 2012;30(1):70-76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000100012>.
- Chandrawathani P, Nurulaini R, Premaalatha B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs, goats, cattle, dogs, and cats in peninsular Malaysia. *Trop Biomed.* 2008;25(3):257-258. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/24201868_Seroprevalence_of_Toxoplasma_gondii_antibodies_in_pigs_goats_cattle_dogs_and_cats_in_peninsular_Malaysia
- González del Carmen M, Mondragón M, González S, Mondragón R. Induction, and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2009;11(6):967-982. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01304.x>
- Galván-Ramírez M. de la L, Flores R. *Toxoplasmosis humana*. 1ra ed. Guadalajara: Ecorfan-México, S.C., 2017; 607-8324. p. 11
- Ferguson DJ; HutchinsonmWM, Siim JC. The structural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 1975;83(5):491-505. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1975.tb00130.x>
- Kasper LH. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1989;57(3):668-672. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/iai.57.3.668-672.1989>
- Russeell DG, Sinden RE. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidiansporozoites. *J Cell Sci.* 1981;50:345-359. Disponible en: <https://doi.org/10.1242/jcs.50.1.345>.
- Chatturuedi S, y otros. Constitutive Calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J Biol Chem.* 1999; 274(4):2424-2431. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2424>.
- Sam-Yellowe T. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and

- intracellular survival. *Parásitol Today*. 1996;12(8):308-316. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)10030-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)10030-2).
- Mercier C, Adjogble KDZ, Däubener W, Delaww MFC. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol*. 2005;35(8):829-849. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>.
- Bojorque P. Actualización de la seroepidemiología de *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Cuenca. [Tesis Maestría]. Cuenca: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias;2016. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25508/1/Tesis.pdf>.
- Comunicar salud. Avances en la lucha contra la toxoplasmosis, ciclo biológico del *Toxoplasma gondii*. [Internet] CS. 2022. Disponible en: <https://www.comunicar-salud.com.ar/2022/05/11/avances-la-lucha-contra-la-toxoplasmosis/xbig>.
- Sabin AB, Olitzky PK. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science*. 1937;85(2205):336-338. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.85.2205.336>.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1566-1570. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1566-1570.2001>.
- Stajner T. Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. *J Clin Microbiol*. 2013;51(8):2686-2690. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.01077-13>.
- Naot Y, Desmonts G, Remington JS. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. *J Pediatr*. 1981;98(1):32-36. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(81\)80528-8](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(81)80528-8).
- Díaz-Rojas YK, Ramírez-Pérez V. Toxoplasmosis felina y su tratamiento. [Tesis Grado]. Ibagué: Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia;2021. Disponible en: https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/34673/1/2021_toxoplasmosis_felina_tratamiento.pdf.
- Medina-Hernández JD. Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carnes destinadas al consumo humano en la ciudad de Ibagué usando PCR anidada (n-PCR) del gen B1. [Tesis Grado]. Ibagué: Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias; 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33023.02724>.
- Berdión-Camaño E del M. Un parásito intracelular: *Toxoplasma gondii*. [Tesis Grado]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia; 2015. Disponible en:

<https://eprints.ucm.es/id/eprint/48567/>

Hill D, y otros. Identification of a sporozoitespecific antigen from *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 2011;97(2):328-337. Disponible en: <https://doi.org/10.1645/GE-2782.1>.

Costa JG, Vilariño M.J. Semiquantitative Dot Blot with the GRA8 antigen to differentiate the stages of toxoplasmosis infection. J Microbiol Methods. 2018; 149:9-13. Disponible en:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.04.015>.

Cai Y, y otros. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. J Parasitol. 2015;101(1):37-40. <https://doi.org/10.1645/14-575.1>.

Jacobs D. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. 1998;91(2):237-429. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00204-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00204-1).

Rengifo C, y otros. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pets from metropolitan regions of Panama. Parasite. 2017; 24:9. Disponible en: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017009>

Alalí F, Sevínç S, Ceylan O. Seroprevalence of canine toxoplasmosis in Konya province, Turkey. Bozok Vet Sci. 2021;2(2):23-28. Disponible en: <https://dergipark.org.tr/en/pub/bozokvetsci/issue/67184/1039227>

Anexos

Anexo A. Diagrama del procedimiento para el ensayo de ELISA indirecto.

Diagrama 1. Sensibilización (TgSAG2 o TgGRA7 / Sin antígeno).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Diagrama 2. Bloqueo (B1 BSA / B2 Leche).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Diagrama 3. Dilución sueros (D1 BSA (A, B, N) / D2 Leche (A, B, N)).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
B	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
C	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
D	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
E	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
F	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
G	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
H	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N

Diagrama 4. Sustrato (S1 ABTS / S2 TMB).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
B	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
C	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
D	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
E	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
F	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
G	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N
H	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N

Diagrama 5. Combinaciones de variables (para TgSAG2 y TgGRA7).

1. P1/B1/D1-A/S1 2. P1/B1/D1-B/S1 3. P1/B1/D1-N/S1	4. P1/B1/D1-A/S2 5. P1/B1/D1-B/S2 6. P1/B1/D1-N/S2	7. P1/B2/D1-N/S1 8. P1/B2/D1-B/S1 9. P1/B2/D1-M/S1	10. P1/B2/D1-A/S2 11. P1/B2/D1-B/S2 12. P1/B2/D1-N/S2
13. P1/B1/D1-A/S1 14. P1/B1/D1-B/S1 15. P1/B1/D1-N/S1	16. P1/B1/D1-A/S2 17. P1/B1/D1-B/S2 18. P1/B1/D1-N/S2	19. P1/B2/D1-N/S1 20. P1/B2/D1-B/S1 21. P1/B2/D1-M/S1	21. P1/B2/D1-A/S2 22. P1/B2/D1-B/S2 24. P1/B2/D1-N/S2
25. P1/B1/D2-A/S1 26. P1/B1/D2-B/S1 27. P1/B1/D2-N/S1	28. P1/B1/D2-A/S2 29. P1/B1/D2-B/S2 30. P1/B1/D2-N/S2	31. P1/B2/D2-A/S1 32. P1/B2/D2-B/S1 33. P1/B2/D2-N/S1	34. P1/B2/D2-A/S2 35. P1/B2/D2-B/S2 36. P1/B2/D2-N/S2
37. P1/B1/D2-A/S1 38. P1/B1/D2-B/S1 39. P1/B1/D2-N/S1	40. P1/B1/D2-A/S2 41. P1/B1/D2-B/S2 42. P1/B1/D2-N/S2	43. P1/B2/D2-A/S1 44. P1/B2/D2-B/S1 45. P1/B2/D2-N/S1	46. P1/B2/D2-A/S2 47. P1/B2/D2-B/S2 48. P1/B2/D2-N/S2

1. P2/B1/D1-A/S1 2. P2/B1/D1-B/S1 3. P2/B1/D1-N/S1	4. P2/B1/D1-A/S2 5. P2/B1/D1-B/S2 6. P2/B1/D1-N/S2	7. P2/B2/D1-A/S1 8. P2/B2/D1-B/S1 9. P2/B2/D1-N/S1	10. P2/B2/D1-A/S2 11. P2/B2/D1-B/S2 12. P2/B2/D1-N/S2
13. P2/B1/D1-A/S1 14. P2/B1/D1-B/S1 15. P2/B1/D1-N/S1	16. P2/B1/D1-A/S2 17. P2/B1/D1-B/S2 18. P2/B1/D1-N/S2	19. P2/B2/D1-A/S1 20. P2/B2/D1-B/S1 21. P2/B2/D1-N/S1	22. P2/B2/D1-A/S2 23. P2/B2/D1-B/S2 24. P2/B2/D1-N/S2
25. P2/B1/D2-A/S1 26. P2/B1/D2-B/S1 27. P2/B1/D2-N/S1	28. P2/B1/D2-A/S2 29. P2/B1/D2-B/S2 30. P2/B1/D2-N/S2	31. P2/B2/D2-A/S1 32. P2/B2/D2-B/S1 33. P2/B2/D2-N/S1	34. P2/B2/D2-A/S2 35. P2/B2/D2-B/S2 36. P2/B2/D2-N/S2
37. P2/B1/D2-A/S1 38. P2/B1/D2-B/S1 39. P2/B1/D2-N/S1	40. P2/B1/D2-A/S2 41. P2/B1/D2-B/S2 42. P2/B1/D2-N/S2	43. P2/B2/D2-A/S1 44. P2/B2/D2-B/S1 45. P2/B2/D2-N/S1	46. P2/B2/D2-A/S2 47. P2/B2/D2-B/S2 48. P2/B2/D2-N/S2

Anexo B. Diagrama del procedimiento para el ensayo Dot Blot:

Diagrama 1. Sensibilización (**TgSAG2** y **TgGRA7**). Se colocarán tres spots o gotas de antígeno de cada una de las 2 proteínas en cada porción de membrana.

1.1. MP1/B1/D1-A/S1	2.1. MP1/B1/D1-A/S2	3.1. MP1/B2/D1-A/S1	4.1. MP1/B2/D1-A/S2
1.2. MP1/B1/D1-B/S1	2.2. MP1/B1/D1-B/S2	3.2. MP1/B2/D1-B/S1	4.2. MP1/B2/D1-B/S2
1.3. MP1/B1/D1-N/S1	2.3. MP1/B1/D1-N/S2	3.3. MP1/B2/D1-N/S1	4.3. MP1/B2/D1-N/S2
5.1. MP1/B1/D2-A/S1	6.1. MP1/B1/D2-A/S2	7.1. MP1/B2/D2-A/S1	8.1. MP1/B2/D2-A/S2
5.2. MP1/B1/D2-B/S1	6.2. MP1/B1/D2-B/S2	7.2. MP1/B2/D2-B/S1	8.2. MP1/B2/D2-B/S2
5.3. MP1/B1/D2-N/S1	6.3. MP1/B1/D2-N/S2	7.3. MP1/B2/D2-N/S1	8.3. MP1/B2/D2-N/S2

Diagrama 2. Solución de bloqueo (**B1 BSA** / **B2 Leche**).

1.1. MP1/B1/D1-A/S1	2.1. MP1/B1/D1-A/S2	3.1. MP1/B2/D1-A/S1	4.1. MP1/B2/D1-A/S2
1.2. MP1/B1/D1-B/S1	2.2. MP1/B1/D1-B/S2	3.2. MP1/B2/D1-B/S1	4.2. MP1/B2/D1-B/S2
1.3. MP1/B1/D1-N/S1	2.3. MP1/B1/D1-N/S2	3.3. MP1/B2/D1-N/S1	4.3. MP1/B2/D1-N/S2
5.1. MP1/B1/D2-A/S1	6.1. MP1/B1/D2-A/S2	7.1. MP1/B2/D2-A/S1	8.1. MP1/B2/D2-A/S2
5.2. MP1/B1/D2-B/S1	6.2. MP1/B1/D2-B/S2	7.2. MP1/B2/D2-B/S1	8.2. MP1/B2/D2-B/S2
5.3. MP1/B1/D2-N/S1	6.3. MP1/B1/D2-N/S2	7.3. MP1/B2/D2-N/S1	8.3. MP1/B2/D2-N/S2

Diagrama 3. Solución para la dilución sueros (**D1 BSA (A, B, N)** / **D2 Leche (A, B, N)**).

1.1. MP1/B1/D1-A/S1	2.1. MP1/B1/D1-A/S2	3.1. MP1/B2/D1-A/S1	4.1. MP1/B2/D1-A/S2
1.2. MP1/B1/D1-B/S1	2.2. MP1/B1/D1-B/S2	3.2. MP1/B2/D1-B/S1	4.2. MP1/B2/D1-B/S2
1.3. MP1/B1/D1-N/S1	2.3. MP1/B1/D1-N/S2	3.3. MP1/B2/D1-N/S1	4.3. MP1/B2/D1-N/S2
5.1. MP1/B1/D2-A/S1	6.1. MP1/B1/D2-A/S2	7.1. MP1/B2/D2-A/S1	8.1. MP1/B2/D2-A/S2
5.2. MP1/B1/D2-B/S1	6.2. MP1/B1/D2-B/S2	7.2. MP1/B2/D2-B/S1	8.2. MP1/B2/D2-B/S2
5.3. MP1/B1/D2-N/S1	6.3. MP1/B1/D2-N/S2	7.3. MP1/B2/D2-N/S1	8.3. MP1/B2/D2-N/S2

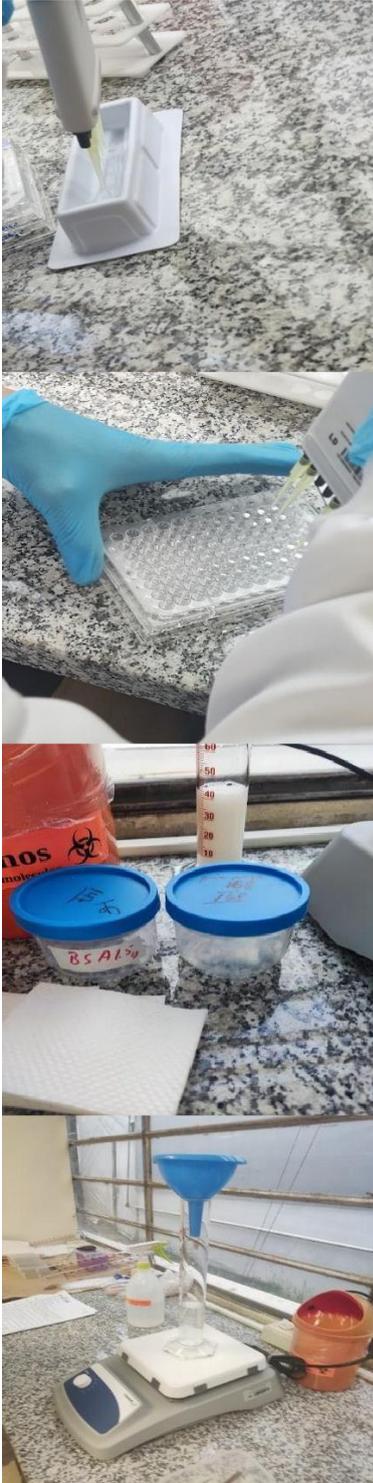
Diagrama 4. Solución de sustrato (**S1 DAB** / **S2 4CN**).

1.1. MP1/B1/D1-A/S1	2.1. MP1/B1/D1-A/S2	3.1. MP1/B2/D1-A/S1	4.1. MP1/B2/D1-A/S2
1.2. MP1/B1/D1-B/S1	2.2. MP1/B1/D1-B/S2	3.2. MP1/B2/D1-B/S1	4.2. MP1/B2/D1-B/S2
1.3. MP1/B1/D1-N/S1	2.3. MP1/B1/D1-N/S2	3.3. MP1/B2/D1-N/S1	4.3. MP1/B2/D1-N/S2
5.1. MP1/B1/D2-A/S1	6.1. MP1/B1/D2-A/S2	7.1. MP1/B2/D2-A/S1	8.1. MP1/B2/D2-A/S2
5.2. MP1/B1/D2-B/S1	6.2. MP1/B1/D2-B/S2	7.2. MP1/B2/D2-B/S1	8.2. MP1/B2/D2-B/S2
5.3. MP1/B1/D2-N/S1	6.3. MP1/B1/D2-N/S2	7.3. MP1/B2/D2-N/S1	8.3. MP1/B2/D2-N/S2

Diagrama 5. Combinaciones de variables (para TgSAG2 y TgGRA7).

1.1. MP1/B1/D1-A/S1	2.1. MP1/B1/D1-A/S2	3.1. MP1/B2/D1-A/S1	4.1. MP1/B2/D1-A/S2
1.2. MP1/B1/D1-B/S1	2.2. MP1/B1/D1-B/S2	3.2. MP1/B2/D1-B/S1	4.2. MP1/B2/D1-B/S2
1.3. MP1/B1/D1-N/S1	2.3. MP1/B1/D1-N/S2	3.3. MP1/B2/D1-N/S1	4.3. MP1/B2/D1-N/S2
5.1. MP1/B1/D2-A/S1	6.1. MP1/B1/D2-A/S2	7.1. MP1/B2/D2-A/S1	8.1. MP1/B2/D2-A/S2
5.2. MP1/B1/D2-B/S1	6.2. MP1/B1/D2-B/S2	7.2. MP1/B2/D2-B/S1	8.2. MP1/B2/D2-B/S2
5.3. MP1/B1/D2-N/S1	6.3. MP1/B1/D2-N/S2	7.3. MP1/B2/D2-N/S1	8.3. MP1/B2/D2-N/S2
9.1. MN2/B1/D1-A/S1	10.1. MN2/B1/D1-A/S2	11.1. MN2/B2/D1-A/S1	12.1. MN2/B2/D1-A/S2
9.2. MN2/B1/D1-B/S1	10.2. MN2/B1/D1-B/S2	11.2. MN2/B2/D1-B/S1	12.2. MN2/B2/D1-B/S2
9.3. MN2/B1/D1-N/S1	10.3. MN2/B1/D1-N/S2	11.3. MN2/B2/D1-N/S1	12.3. MN2/B2/D1-N/S2
13.1. MN2/B1/D2-A/S1	14.1. MN2/B1/D2-A/S2	15.1. MN2/B2/D2-A/S1	16.1. MN2/B2/D2-A/S2
13.2. MN2/B1/D2-B/S1	14.2. MN2/B1/D2-B/S2	15.2. MN2/B2/D2-B/S1	16.2. MN2/B2/D2-B/S2
13.3. MN2/B1/D2-N/S1	14.3. MN2/B1/D2-N/S2	15.3. MN2/B2/D2-N/S1	16.3. MN2/B2/D2-N/S2

Anexo C. Procedimiento del ensayo de ELISA indirecto.

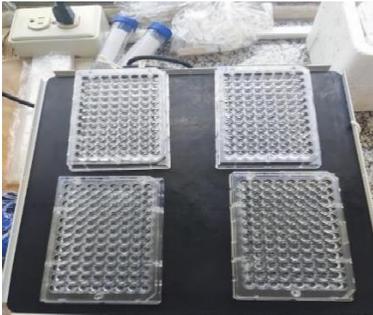


Anexo a Preparación de la solución de los antígenos. Preparación de las Soluciones para la sensibilización de las placas, consiste en Buffer de carbonatos con proteína TgSAG2 y TgGRA7

Anexo b Sensibilización de ambos tipos de placas MaxiSorp y MultiSorp con la solución sensibilizadora por pozo.

Anexo c Soluciones de bloqueo: B1 (Leche descremada) y B2 BSA (Albúmina sérica bovina)

Anexo d Preparación de la solución de lavado para posteriormente realizar el lavado a temperatura ambiente.



Anexo e. Cuatro placas sensibilizadas para posterior incubación.



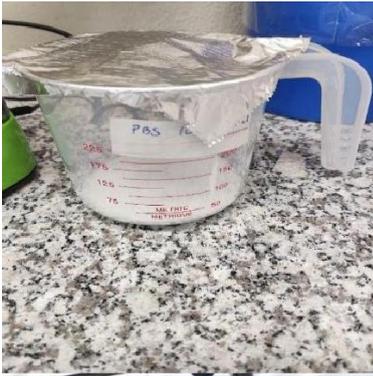
Anexo f. Colocación de la solución de dilución 1 (BSA) en la mitad de cada una de las placas; y la dilución 2 (Leche descremada) en la otra mitad de las placas.



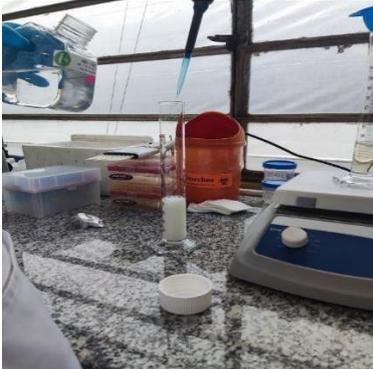
Anexo g. Preparación de las soluciones de los sueros con su respectivo etiquetado.



Anexo h. Incubación de las placas con los sueros en agitación constante.



Anexo i. Pesaje y medición para elaboración de soluciones de lavado de placas



Anexo j. Medición de las soluciones de dilución solución de dilución 1 (BSA) y la dilución 2 (Leche descremada)



Anexo k. Medición y preparación de las soluciones de bloqueo para los 2 tipos de placas.



Anexo l. Lavado de las placas con su respectiva solución de lavado



Anexo m. Preparación de sustratos y regulación de pH.

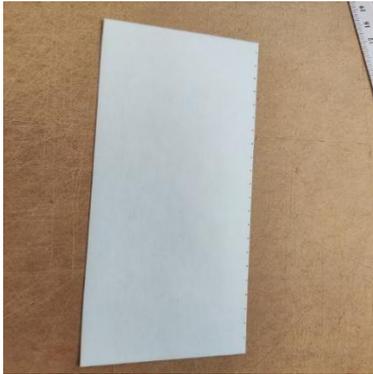


Anexo n. Sustratos obtenidos previamente para uso en los 2 tipos de las placas



Anexo ñ. Solución de Sustratos: Sustrato 1 (ABTS) y Sustrato 2 (TMB)

Anexo D. Procedimiento del ensayo de Dot Blot.



Anexo a. Toma de medidas de las membranas de Nitrocelulosa y PVDF para corte a manera de tiras.



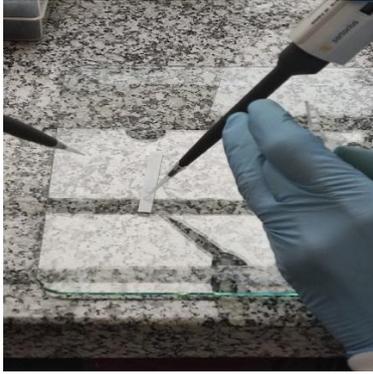
Anexo b. Preparación de tiras de membranas PVDF y Nitrocelulosa



Anexo c. Tiras obtenidas con un total de 24 tiras de cada tipo de membrana.



Anexo d. Preparación de las tiras para su activación, para su posterior colocación de solución con proteína TgSAG2 y TgGRA7



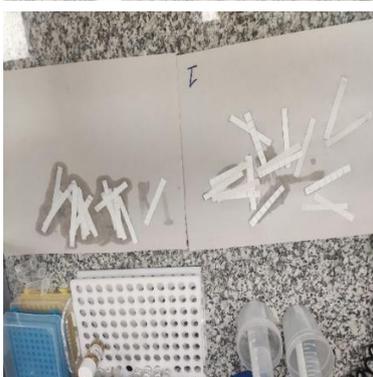
Anexo e. Colocación de solución con los antígenos TgSAG2 y TgGRA7 en cada área que fue marcada.



Anexo f. Bloqueo de las tiras de Nitrocelulosa y PVDF en agitación constante a temperatura ambiente



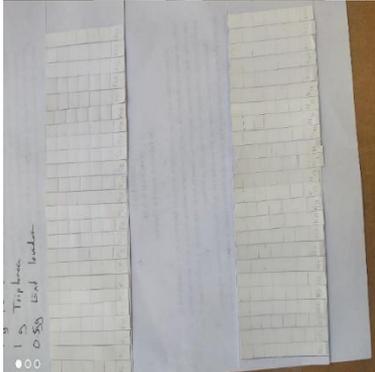
Anexo g. Preparación de las tiras para lavado



Anexo h. Secado de las tiras de Nitrocelulosa y PVDF



Anexo i. Colocación de las tiras Nitrocelulosa y PVDF en un soporte de papel.



Anexo j. Tiras ordenadas y fijadas al soporte de papel para el escaneo y análisis mediante el software libre Image J

Anexo E. Resultados del ensayo de ELISA indirecto.

Actual Temperature:

0,0

Actual Temperature:

0,0

Results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,134	0,126	0,122	0,060	0,051	0,056	0,126	0,126	0,126	0,070	0,060	0,052	Read 1:410
	0,084	0,078	0,077	0,067	0,051	0,071	0,078	0,077	0,080	0,067	0,056	0,050	Read 2:450
B	0,138	0,122	0,128	0,053	0,108	0,053	0,134	0,126	0,127	0,055	0,059	0,052	Read 1:410
	0,083	0,076	0,081	0,053	0,098	0,050	0,084	0,076	0,082	0,055	0,062	0,052	Read 2:450
C	0,128	0,126	0,123	0,052	0,065	0,048	0,121	0,125	0,129	0,068	0,052	0,051	Read 1:410
	0,080	0,081	0,080	0,050	0,069	0,047	0,075	0,078	0,081	0,064	0,051	0,048	Read 2:450
D	0,128	0,128	0,120	0,060	0,050	0,051	0,121	0,122	0,121	0,086	0,086	0,116	Read 1:410
	0,082	0,081	0,075	0,117	0,047	0,048	0,073	0,074	0,076	0,095	0,059	0,085	Read 2:450
E	0,130	0,125	0,118	0,078	0,050	0,059	0,130	0,125	0,119	0,057	0,051	0,078	Read 1:410
	0,082	0,076	0,074	0,050	0,048	0,056	0,082	0,077	0,073	0,055	0,049	0,071	Read 2:450
F	0,138	0,137	0,124	0,073	0,070	0,050	0,123	0,119	0,122	0,053	0,047	0,050	Read 1:410
	0,092	0,090	0,082	0,055	0,064	0,049	0,077	0,074	0,076	0,051	0,046	0,048	Read 2:450
G	0,137	0,127	0,131	0,050	0,051	0,069	0,125	0,119	0,126	0,053	0,046	0,047	Read 1:410
	0,088	0,080	0,085	0,048	0,051	0,047	0,077	0,076	0,081	0,049	0,045	0,047	Read 2:450
H	0,132	0,126	0,137	0,051	0,070	0,096	0,125	0,130	0,133	0,060	0,048	0,051	Read 1:410
	0,087	0,078	0,092	0,201	0,068	0,091	0,081	0,084	0,087	0,060	0,048	0,052	Read 2:450

Actual Temperature:

0,0

Actual Temperature:

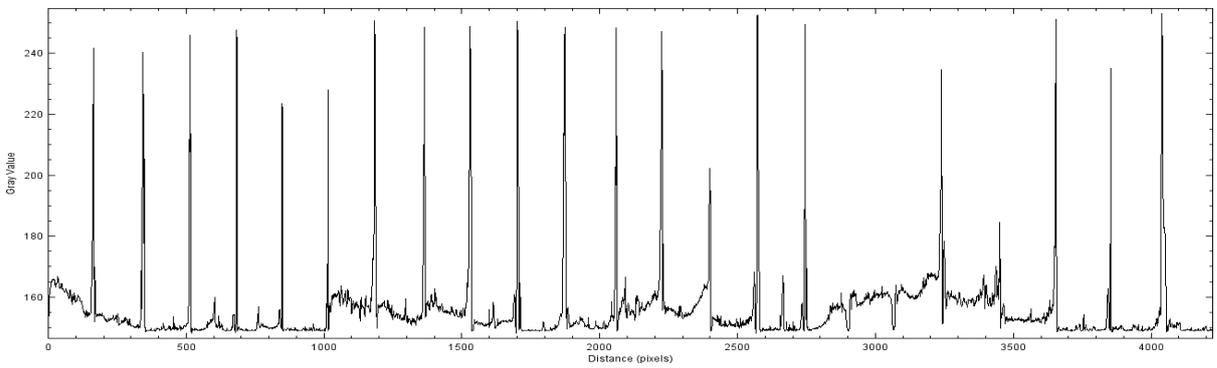
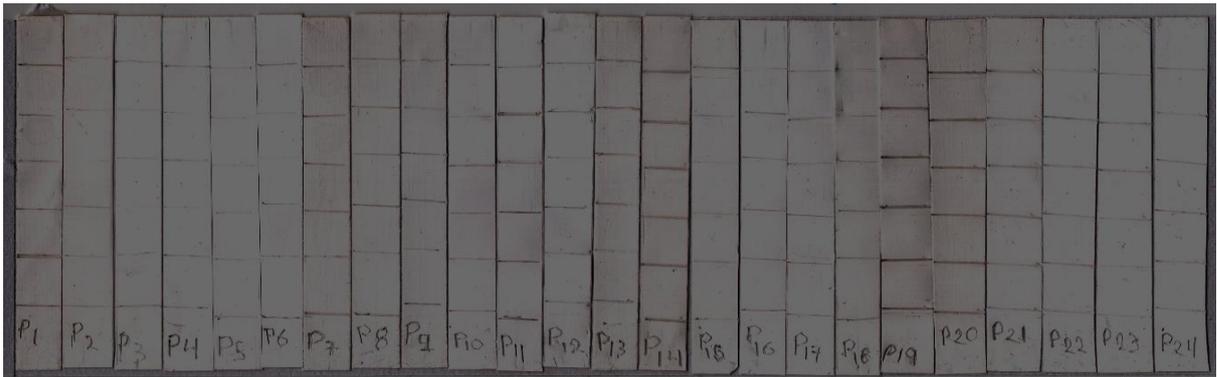
0,0

Results

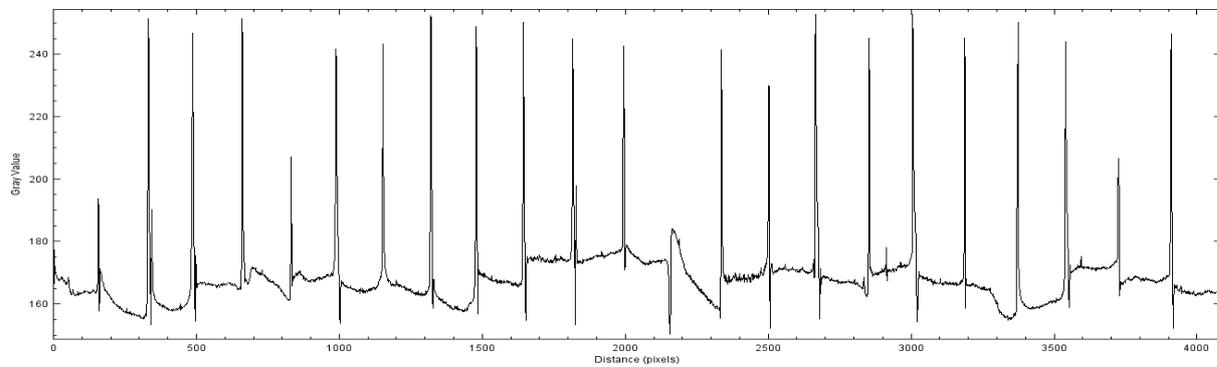
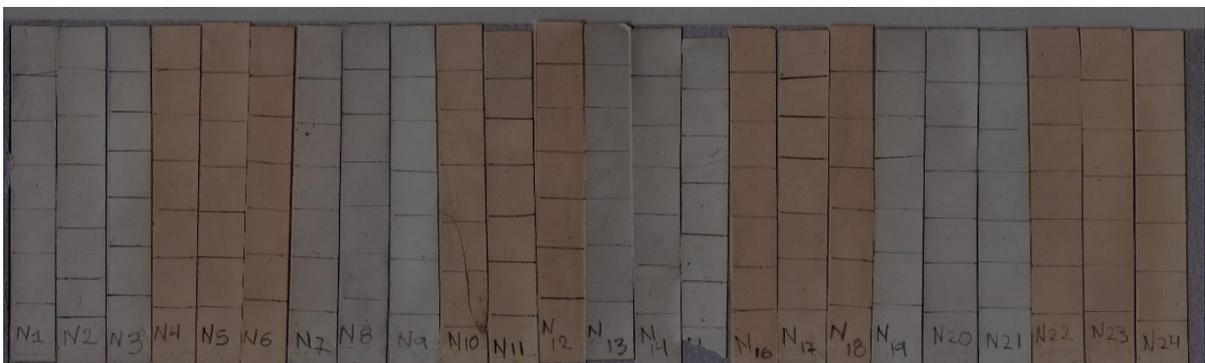
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,132	0,118	0,122	0,054	0,045	0,045	0,127	0,113	0,121	0,052	0,051	0,046	Read 1:410
	0,080	0,072	0,076	0,057	0,053	0,046	0,076	0,069	0,074	0,066	0,055	0,048	Read 2:450
B	0,118	0,129	0,115	0,057	0,061	0,045	0,117	0,118	0,124	0,051	0,050	0,044	Read 1:410
	0,070	0,081	0,075	0,059	0,050	0,046	0,073	0,072	0,075	0,066	0,062	0,046	Read 2:450
C	0,123	0,129	0,120	0,052	0,150	0,050	0,130	0,126	0,125	0,081	0,040	0,045	Read 1:410
	0,075	0,083	0,077	0,052	0,100	0,049	0,083	0,076	0,079	0,142	0,041	0,049	Read 2:450
D	0,122	0,123	0,109	0,062	0,053	0,047	0,119	0,122	0,118	0,051	0,040	0,041	Read 1:410
	0,072	0,076	0,070	0,060	0,053	0,046	0,073	0,077	0,077	0,061	0,041	0,052	Read 2:450
E	0,133	0,138	0,120	0,074	0,301	0,050	0,120	0,120	0,124	0,050	0,043	0,046	Read 1:410
	0,090	0,094	0,074	0,067	0,057	0,050	0,076	0,076	0,082	0,061	0,047	0,055	Read 2:450
F	0,140	0,128	0,123	0,046	0,089	0,067	0,124	0,120	0,129	0,056	0,050	0,047	Read 1:410
	0,089	0,085	0,076	0,046	0,076	0,062	0,081	0,076	0,083	0,071	0,051	0,056	Read 2:450
G	0,113	0,124	0,119	0,066	0,055	0,055	0,126	0,121	0,116	0,048	0,049	0,045	Read 1:410
	0,069	0,085	0,077	0,063	0,054	0,054	0,083	0,079	0,075	0,057	0,054	0,056	Read 2:450
H	0,122	0,124	0,507	0,049	0,066	0,105	0,116	0,115	0,127	0,054	0,044	0,046	Read 1:410
	0,077	0,082	0,148	0,048	0,121	0,060	0,071	0,072	0,077	0,070	0,045	0,047	Read 2:450

Resultados obtenidos de ELISA indirecto mediante el lector de placas de ELISA.

Anexo F. Resultados del ensayo de Dot Blot (Color).



Resultados obtenidos de las membranas de PVDF mediante el software libre ImageJ.



Resultados obtenidos de las membranas de Nitrocelulosa mediante el software libre Image J

Anexo G. Resultados estadísticos Análisis de varianza ELISA indirecto

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
promedio	192	0.88	0.87	14.45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.25	9	0.03	142.78	<0.0001
Suero	3.6E-03	2	1.8E-03	9.39	0.0001
Substrato	0.23	1	0.23	1222.46	<0.0001
Dilución	1.5E-04	1	1.5E-04	0.76	0.3830
Bloqueo	8.1E-05	1	8.1E-05	0.42	0.5158
Antígeno	3.9E-03	3	1.3E-03	6.85	0.0002
Placa	4.2E-03	1	4.2E-03	22.04	<0.0001
Error	0.03	182	1.9E-04		
Total	0.28	191			

Anexo a. Resultados Test de Duncan de ELISA indirecto, placas

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0002 gl: 182

Placa	Medias	n	E.E.	
Maxisorp	0.09	96	1.4E-03	A
MultiSorp	0.10	96	1.5E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo b. Resultados Test de Duncan de ELISA indirecto, muestras sueros

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0002 gl: 182

Sueros	Medias	n	E.E.	
B	0.09	64	1.7E-03	A
N	0.10	64	1.8E-03	A
A	0.10	64	1.7E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo c. Resultados Test de Duncan de ELISA indirecto, antígenos TgGRA7 y TgSAG2

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0002 gl: 182

Antígeno	Medias	n	E.E.	
S/Ant	0.09	72	1.7E-03	A
TgGRA7	0.09	48	2.0E-03	A
S/Antígeno	0.10	24	2.8E-03	A
TgSAG2	0.11	48	2.0E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo d. Resultados Test de Duncan de ELISA indirecto, Bloqueo

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0002 gl: 182

Bloqueo	Medias	n	E.E.	
BSA	0.09	96	1.4E-03	A
LECHE	0.10	96	1.4E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo e. Resultados Test de Duncan de ELISA indirecto, dilución

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0002 gl: 182

Dilución	Medias	n	E.E.	
LECHE	0.09	104	1.4E-03	A
BSA	0.10	88	1.5E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo f. Resultados Test de Duncan de ELISA indirecto, sustrato

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0002 gl: 182

Substrato	Medias	n	E.E.	
TMB	0.06	96	1.4E-03	A
ABTS	0.13	96	1.4E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo H. Resultados estadísticos Análisis de varianza Dot Blot

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
promedio	96	0.80	0.78	2.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5262.40	7	751.77	50.50	<0.0001
Membrana	4902.04	1	4902.04	329.27	<0.0001
Sueros	33.81	2	16.91	1.14	0.3259
Sustrato	287.04	1	287.04	19.28	<0.0001
Dilución	2.67	1	2.67	0.18	0.6732
Bloqueo	20.17	1	20.17	1.35	0.2476
Antígeno	16.67	1	16.67	1.12	0.2929
Error	1310.10	88	14.89		
Total	6572.50	95			

Anexo a. Resultados Test de Duncan de Dot Blot, Membranas

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 14.8875 gl: 88

Membrana	Medias	n	E.E.	
PVDF	150.98	48	0.56	A
Nitrocelulosa	165.27	48	0.56	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo b. Resultados Test de Duncan de Dot Blot, muestra de sueros

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 14.8875 gl: 88

Sueros	Medias	n	E.E.	
N	157.47	32	0.68	A
B	158.00	32	0.68	A
A	158.91	32	0.68	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo c. Resultados Test de Duncan de Dot Blot, antígenos TgGRA7 y TgSAG2

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 14.8875 gl: 88

Antígeno Medias n E.E.

TgGRA7 157.71 48 0.56 A

TgSAG2 158.54 48 0.56 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo d. Resultados Test de Duncan de Dot Blot, bloqueo

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 14.8875 gl: 88

Bloqueo Medias n E.E.

BSA 157.67 48 0.56 A

Leche 158.58 48 0.56 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo e. Resultados Test de Duncan de Dot Blot, dilución

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 14.8875 gl: 88

Dilución Medias n E.E.

Leche 157.96 48 0.56 A

BSA 158.29 48 0.56 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo f. Resultados Test de Duncan de Dot Blot, sustrato

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 14.8875 gl: 88

Sustrato Medias n E.E.

DAB 156.40 48 0.56 A

4CN 159.85 48 0.56 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)