

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Toxoplasma gondii* Y SU  
RELACIÓN CON FACTORES DE RIESGO EN GATOS DE LA CIUDAD DE  
MÉXICO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**ALEJANDRO BESNÉ MÉRIDA**

Asesores:

Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo

Dr. José Juan Martínez Maya

Dra. María Dolores Correa Beltrán

México, D.F. 2006

**DEDICATORIA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A MIS PADRES...*

*A MI HERMANO...*

*A KAREN...*

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: la doctora Dolores Correa Beltrán y los doctores Juan Antonio Figueroa Castillo y José Juan Martínez Maya por su apoyo incondicional y sus amables consejos hacia mi y este trabajo.

A mi jurado: MVZ José Carlos Rosales Ortega, MVZ M. en C. Joaquín Aguilar Bobadilla, MVZ Alberto Ramírez Guadarrama, MVZ Esp. Luís Fernando de Juan Guzmán y Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo.

A todos los profesores que a lo largo de mi carrera me instruyeron y abrieron mi mente para convertirme en un buen Médico Veterinario Zootecnista.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su amistad y cariño hacia mi persona así como su ayuda y consejos para que terminara este trabajo.

A todos los médicos veterinarios de las clínicas que visité y que me ayudaron a conseguir gatos para muestrear y terminar este estudio.

A todos los que trabajan en el Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría en especial a Héctor Luna Pasten por su ayuda en el desarrollo del inmunoensayo.

A toda mi familia que siempre me ha apoyado y querido y que no importando que pase siempre están ahí para ayudarme y aconsejarme.

A Karen, por todo el cariño y amor que me ha dado desde que empecé la carrera, gracias por estar conmigo.

Por último agradezco a todos los gatos, en especial a TAQUI y a DUBEY, que amablemente prestaron una parte de su ser para que este trabajo fuera posible, sin ellos y los demás animales no humanos simplemente nosotros los MVZ no tendríamos razón de existir en este planeta.

Si hay alguien o algunos que por falta de memoria no recordé les pido una disculpa, ustedes saben quienes son y que yo siempre estaré agradecido.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	15
REFERENCIAS.....	21
CUADROS.....	26
ANEXOS.....	29

## RESUMEN

BESNÉ MÉRIDA ALEJANDRO. Frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* y su relación con factores de riesgo en gatos de la ciudad de México. (Bajo la dirección de: Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo, Dr. José Juan Martínez Maya y Dra. Dolores Correa Beltrán).

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de anticuerpos de clase IgG contra *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de México e identificar los posibles factores de riesgo para esta especie. El estudio se llevó a cabo en 169 gatos provenientes de las 16 delegaciones del Distrito Federal. A cada uno se le colectó una muestra de sangre para determinar anticuerpos contra *T. gondii* mediante un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA) y a los propietarios se les aplicó un cuestionario sobre los hábitos alimenticios, higiénicos y de conducta de su gato. La frecuencia total de positivos fue de 37 gatos (21.8%), siendo mayor en las hembras (16.5%) que en los machos (5.3%) ( $P= 0.02$ ). No se encontraron diferencias estadísticas entre los gatos que salen de casa y los que no salen, tampoco entre los que cazan y los que no lo hacen. Se encontraron como posibles factores de riesgo para la infección con *T. gondii* en este estudio: incluir comida cruda en la dieta del gato ( $P= 0.06$ ,  $RM= 2.39$ ,  $IC 0.82 - 6.85$ ) y no limpiar el arenero diariamente ( $P= 0.06$ ,  $RM= 2.18$ ,  $IC 0.87 - 5.55$ ). La frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* encontrada en gatos de la ciudad de México es alta debido a que la población muestreada es exclusivamente doméstica, lo que sugiere una transmisión activa dentro de la urbe.

## INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii*, es un protozoo parásito intracelular obligado perteneciente al Phylum Apicomplexa, que afecta un gran número de especies de sangre caliente y se encuentra ampliamente distribuido en el mundo.<sup>1</sup>

Su importancia radica en que ocasiona toxoplasmosis congénita en los animales y el ser humano, puede provocar abortos, lesiones discapacitantes y la muerte.<sup>2</sup> Los huéspedes definitivos de *T. gondii* son miembros domésticos y silvestres de la familia Felidae; como huéspedes intermediarios se sugieren alrededor de 300 especies de mamíferos, incluido el humano y los mismos felinos, y 30 especies de aves.<sup>3</sup>

En el gato se desarrolla la etapa enteroepitelial (sexual) del ciclo biológico, que culmina con la producción de ooquistes. En los huéspedes intermediarios se efectúa la fase extra intestinal que da origen a quistes en diferentes tejidos.<sup>4</sup>

Existen tres formas principales de transmisión de *T. gondii*: transplacentaria, por ingestión de tejidos con quistes y consumo de alimento o agua contaminada con ooquistes.<sup>1</sup> También hay informes de infección ocasionada por transfusiones sanguíneas, transplantes de órganos y por consumir leche sin pasteurizar.<sup>5</sup>

De las tres vías de infección no se ha podido establecer cual es la más importante y poco se sabe acerca de la transmisión horizontal, de los reservorios más importantes del parásito, así como del impacto epidemiológico de las diferentes fuentes de infección en el humano.<sup>5</sup>

Los gatos son muy importantes dentro de la cadena epidemiológica de *T. gondii*, debido a que son la única especie doméstica que elimina ooquistes

en las heces, y aunque sólo lo hacen durante un corto periodo (3 a 18 días), pueden producir millones de parásitos.<sup>1,4,5</sup>

Por otra parte, se han señalado a las lombrices de tierra, cucarachas y moscas como posibles diseminadoras de ooquistes<sup>3</sup>, sin embargo no hay estudios al respecto.

### **Ciclo biológico**

Los tres estadios infectantes de *T. gondii* son los taquizoitos y bradizoitos encontrados dentro de los quistes tisulares y los esporozoitos contenidos en el ooquiste esporulado, cualquiera de estas tres formas puede ser ingerida por los huéspedes definitivos o intermediarios y comenzar el ciclo.<sup>4,6</sup> Como ya se mencionó anteriormente la reproducción sexual del parásito, típica del Phylum Apicomplexa, sólo ocurre en el epitelio intestinal de los huéspedes definitivos, ahí se producen los ooquistes que son eliminados en las heces y que después de un periodo de esporulación en el ambiente (1 a 2 días) se vuelven infectantes,<sup>3</sup> estos ooquistes esporulados son poco patógenos para el felino pero altamente patógenos para los huéspedes intermediarios.<sup>6</sup>

En los huéspedes intermediarios, una vez ingerida cualquiera de las tres formas infectantes del parásito, se lleva a cabo la reproducción asexual que se caracteriza por originar quistes en diferentes tejidos principalmente corazón, músculo esquelético y sistema nervioso central, estos quistes en la fase aguda de la enfermedad contienen taquizoitos (formas de reproducción rápida) y en la fase crónica, bradizoitos (formas de reproducción lenta).<sup>3</sup>



El periodo prepatente varía de acuerdo al estadio ingerido por el felino, siendo corto (3 a 10 días) cuando son bradizoitos y largo (>18 días) cuando son taquizoitos u ooquistes.<sup>6</sup>

### **Toxoplasmosis en el gato**

La toxoplasmosis en el gato generalmente pasa inadvertida, los signos clínicos pueden ser debilidad, anorexia, fiebre, neumonía, tos, disnea, diarrea, comportamiento agresivo, rinitis y conjuntivitis; en ocasiones ocurre la muerte por toxoplasmosis generalizada. El examen *post mortem*, revela necrosis, predominantemente en los pulmones, hígado, bazo y linfonodos mesentéricos; también se ha observado encefalitis, gliosis, miocarditis y neumonía intersticial.<sup>7-9</sup>

Cabe señalar que *T. gondii* es un parásito oportunista, en animales inmunodeprimidos, enfermos o infectados simultáneamente con virus (leucemia felina o inmunodeficiencia felina), pueden exacerbar una infección crónica, similar a lo que ocurre en seres humanos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana y desencadenar una toxoplasmosis letal.<sup>10</sup>

Generalmente los taquizoitos se presentan durante la fase aguda de la infección, en hembras que se infectan por primera vez, estos pueden atravesar la placenta e infectar al feto (toxoplasmosis congénita). También, durante un corto periodo, los taquizoitos se pueden encontrar en orina, saliva, líquido cefalorraquídeo o semen<sup>3</sup> y experimentalmente, se ha visto que se pueden encontrar en la leche de las gatas.<sup>11</sup>

La seroprevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* en gatos en distintas partes del mundo es variable; en Melbourne, Australia<sup>12</sup> informan del 38.8% de positividad en 103 gatos evaluados por medio de ELISA; en Ohio, Estados Unidos de América<sup>13</sup>, por medio de una prueba de aglutinación modificada encontraron anticuerpos contra el parásito en 133 gatos (48%) de un total de 275 gatos; en Buenos Aires, Argentina<sup>14</sup>, se informa una prevalencia de 19.5% en 169 individuos estudiados por medio de hemoaglutinación indirecta; en Brasil, Lucas *et al.*<sup>15</sup> en Sao Paulo encontraron una ocurrencia de anticuerpos de 17.7% de un total de 248 gatos, mientras que Garcia *et al.*<sup>16</sup> en Paraná observaron una prevalencia de anticuerpos de 73% de 163 gatos, ambos usando una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT); en La Rioja y Madrid, España<sup>17</sup>, la prevalencia observada fue de 32.3% en 585 gatos evaluados por IFAT en contraste con el 45% en 220 gatos encontrado en Barcelona por Gauss *et al.*<sup>18</sup> mediante aglutinación; en Jerusalén, Israel<sup>19</sup> utilizando ELISA, indican una seropositividad de 16.8% en 1,062 gatos; en dos estudios hechos en Japón, uno por Nogami *et al.*<sup>20</sup> y otro por Maruyama *et al.*<sup>21</sup>, ambos utilizando una prueba modificada de aglutinación en látex, se informa de una prevalencia de anticuerpos de 6% en 800 gatos y 8.7% en 471 gatos respectivamente; en Brno, República Checa<sup>10</sup>, mediante IFAT, la prevalencia reportada en promedio es de 62.4% de 390 gatos.

En México, los informes sobre la frecuencia de *T. gondii* en gatos son escasos y variables. Galván *et al.*<sup>22</sup> en la ciudad de Guadalajara, por medio de ELISA, encontraron una seropositividad de 70.8% en 24 gatos.

Guevara<sup>23</sup>, no encontró *T. gondii* al buscar ooquistes en heces mediante exámenes coprológicos en 200 gatos del Distrito Federal. Mondragón<sup>24</sup>,

mediante ELISA no encontró anticuerpos en 21 gatos del D.F. y área metropolitana.

En contraste con lo anterior, Aguilar<sup>25</sup> y Martínez *et al.*<sup>26</sup> en la Ciudad de México, por medio de exámenes coprológicos, encontraron una frecuencia de 7% en 200 gatos y 9.6% de 676 gatos respectivamente.

Las investigaciones realizadas por Dubey *et al.*<sup>13</sup>, Fernández *et al.*<sup>14</sup>, Lucas *et al.*<sup>15</sup>, Gauss *et al.*<sup>18</sup>, Nogami *et al.*<sup>20</sup> y Galván *et al.*<sup>22</sup>, entre otros, señalan como factores de riesgo de infección con *T. gondii* en el gato, el consumo de alimento crudo, el hábito de cazar, acceso al exterior y la convivencia con otros gatos, por lo que en el presente trabajo se analizaron estas variables.

**Objetivo:** Determinar la frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* y su relación con posibles factores de riesgo en gatos de la Ciudad de México.

**Hipótesis:** La frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* presenta variaciones según la exposición a posibles factores de riesgo.

**Justificación:** Debido a la importancia que tiene *T. gondii* en la salud pública y veterinaria, al papel que tienen los gatos domésticos dentro de la cadena epidemiológica de este parásito y a la poca información sobre la seroprevalencia de *T. gondii* en gatos en México, se consideró pertinente determinar la frecuencia de gatos positivos a *T. gondii* e identificar posibles factores de riesgo de infección para esta especie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en gatos provenientes de las 16 delegaciones del Distrito Federal. A cada uno se le colectó una muestra de sangre para determinar la seropositividad a *T. gondii* mediante un ELISA indirecto y a los propietarios se les aplicó un cuestionario (anexo 1) sobre los hábitos alimenticios, higiénicos y de conducta de su gato.

### Animales de estudio

Se seleccionaron pacientes felinos de clínicas veterinarias afiliadas a la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies (AMMVEPE). Se entrevistó a los propietarios, se les expuso el motivo de este estudio y se les invitó a participar, siempre y cuando sus gatos cubrieran los criterios de inclusión.

- Criterios de inclusión: que los gatos hubieran radicado toda su vida en la delegación seleccionada de la Ciudad de México, que fueran mayores de 2 meses, que el dueño lo hubiera tenido desde cachorro y aceptara contestar el cuestionario.
- Criterios de exclusión: que los gatos hayan vivido al menos 1 mes fuera de la delegación seleccionada o de la Ciudad de México.

### Tamaño de muestra

Se realizó un muestreo piloto con 112 gatos (7 por cada delegación), cuyos resultados se utilizaron para calcular el tamaño de muestra final de acuerdo a la ecuación de porcentajes pequeños según Navarro<sup>27</sup>, usando un coeficiente de variación del 0.05 (5%), que arrojó un resultado de 75 gatos. Al

final se muestrearon 169 gatos en total. La raza más frecuente correspondió a Europeo Doméstico (94.1%), mientras que sólo el 2.4% fue de raza Persa, 1.8% Siamés, 0.6% Azul Ruso y 0.6% Bosque de Noruega.

#### Obtención de sangre y suero

A cada gato, previo rasurado y desinfección de la zona, se le puncionó la vena cefálica con una aguja de calibre 22 ó 23, dependiendo del tamaño del gato y se le extrajo 1 mL aproximadamente de sangre<sup>28</sup>, se depositó en un tubo de polipropileno de 1.5 mL (Eppendorf™), se dejó coagular y posteriormente se centrifugó a 100 g / 10 minutos para obtener el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su análisis. Cada tubo se identificó con el mismo número que su respectivo cuestionario.

#### ELISA para la detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero de gatos

El suero se analizó en el laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, por lo que se puso a punto un inmunoensayo enzimático (ELISA) para determinar anticuerpos de clase IgG contra *T. gondii* de acuerdo con la técnica descrita por Correa *et al.*<sup>29</sup>

Como antígeno se utilizaron taquizoitos sonicados de *T. gondii* de la cepa RH a una concentración de 1 µg/µL diluido en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 (anexo 2), y se adicionaron 100 µL de la solución a cada pozo de cada placa de ELISA; se incubaron con el antígeno por 12 horas a 4°C.

Luego de la incubación cada placa se lavó 3 veces con intervalos de 5 minutos en agitación lenta con 200  $\mu$ L por pozo de solución amortiguadora de lavado (PBS -Tween 20) (anexo 2).

Después del lavado, los sitios reactivos libres de cada pozo se bloquearon con 200  $\mu$ L de albúmina sérica bovina diluida al 1% en PBS-Tween 20 y las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C.

Al salir de la incubadora se volvió a lavar cada placa, como se mencionó anteriormente. Posteriormente se diluyó el suero de los gatos (1:400), en PBS-Tween 20, se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de la dilución y se incubaron durante 2 horas a 37°C.

Las placas se volvieron a lavar pasado el tiempo de incubación y se procedió a rellenar cada pozo con 100  $\mu$ L del anticuerpo anti IgG de gato unido a biotina, el cuál se obtuvo según la técnica descrita por Correa *et al.*<sup>30</sup>, diluido 1:100 en PBS-Tween 20, para luego incubar las placas por 2 horas a 37°C.

Se repitió el proceso de lavado de las placas después de la incubación y se rellenó cada pozo con 100  $\mu$ L de una solución 1:4000 de estrepto-avidina peroxidasa diluida en PBS – Tween 20 y se dejó incubando 2 horas a 37°C.

Por último se procedió a revelar las placas, previo lavado, se agregaron 100  $\mu$ L por pozo del cromógeno-sustrato para peroxidasa (anexo 2) y se dejó incubar en la oscuridad por 30 minutos para después detener la reacción con 50  $\mu$ L por pozo de una solución de ácido sulfúrico 2N (anexo 2).

Una vez que la reacción fue detenida se procedió a leer la absorbancia de cada placa en un espectrofotómetro para ELISA a 490 nm.

### Controles para el inmunoensayo enzimático (ELISA)

Como **grupo control negativo** del ensayo, se utilizó el suero de 8 gatos que resultaron negativos a anticuerpos contra *T. gondii* en una prueba comercial que detecta anticuerpos contra este parásito y contra *Chlamydia psittaci* (ImmunoComb<sup>®</sup>, Biogal Galed Labs.), realizada por un laboratorio particular de diagnóstico clínico veterinario. Estos sueros también se analizaron en el ELISA.

Como **control positivo** del ensayo, se utilizó el suero de un gato inoculado con el antígeno sonicado de *T. gondii* mediante un protocolo de inmunización que se explica en el anexo 3.

### Determinación del criterio de positividad en el ELISA

La positividad de una muestra se determinó cuando su valor de absorbancia fue igual o mayor al punto de corte del ensayo. El punto de corte se obtuvo al sumar la media más tres veces la desviación estándar de los valores de absorbancia del **grupo control negativo**. El punto de corte calculado fue de 0.343 por lo que los gatos con absorbancias iguales o mayores se consideraron positivos a *T. gondii*.

### Factores de riesgo



Los factores de riesgo considerados para los gatos muestreados en este trabajo fueron tipo de dieta, hábitos de caza, acceso al exterior, convivencia con otros gatos dentro de la casa, conducta higiénica, edad y sexo.

### Análisis de los datos

La asociación de la seropositividad con los factores de riesgo se determinó mediante la prueba de ji-cuadrada o exacta de Fisher y razón de momios (RM) con intervalos de confianza (IC) al 95%, usando el programa de cómputo Epi INFO 2000.

## RESULTADOS

De los 169 gatos muestreados 37 (21.8%) resultaron positivos a anticuerpos contra *T. gondii*.

En las delegaciones Gustavo A. Madero y Milpa Alta, se observó la mayor frecuencia de gatos seropositivos a *T. gondii* (40%), mientras que en Azcapotzalco y Benito Juárez no se observó ningún gato positivo (cuadro 1).

Se muestrearon 101 hembras y 68 machos. La frecuencia de anticuerpos fue mayor en las hembras (27.7%) que en los machos (13.2%) ( $P=0.025$ ).

Para ver la positividad a *T. gondii* por rango de edad en los gatos muestreados, se conformaron 3 grupos de acuerdo a lo propuesto por Pollard<sup>31</sup> (2005). El promedio de edad fue de  $2.85 \pm 2.65$  años, la frecuencia más alta de animales positivos se observó en el grupo de más de 9 años 1 mes (50%), seguida por los gatos de mediana edad (1 año 1 mes a 9 años) (Cuadro 2).

La información recabada en el cuestionario aplicado a los propietarios de los gatos, se resume a continuación: en relación con la convivencia con otros gatos dentro de la casa se observó que 56.8% (96/169) de los gatos muestreados sí conviven con otros gatos y 43.2% (73/169) no lo hacen; el porcentaje de positivos fue menor en los que sí conviven con otros gatos (15.6%) que en los que no conviven (30.1%) ( $P=0.023$ ), la razón de momios fue de 0.43 (IC 95%= 0.19 – 0.96).

El 64.5% (109/169) de los gatos muestreados sale de casa. No se encontraron diferencias estadísticas ( $P=0.40$ ), entre el porcentaje de animales positivos que salen (23.9%) y los que no (18.3%). La razón de momios fue de 1.40 (IC 95%= 0.6 – 3.31).

En cuanto al lugar donde defecaba el gato se observó que 106 de los 169 gatos (62.7%) defecaban en arenero exclusivamente, 15 gatos (8.8%) lo hacen en arenero y en otro lugar (jardín, patio, azotea, etc.), mientras que el 27.21% (46/169) de la población total defecaba únicamente en otro lugar; sólo en 2 casos (1.2%) los propietarios no sabían en donde defecaba su gato, tanto éstos como los gatos que defecaban en arenero y otro lugar no se tomaron a consideración para el análisis. No se encontró diferencia estadística en la prevalencia a *T. gondii* en relación a si el gato defecaba en arenero exclusivamente o en otro lugar ( $P= 0.86$ ;  $RM= 0.93$ ;  $IC\ 95\%= 0.36 - 2.38$ ) (Cuadro 3).

Se preguntó a los propietarios de los gatos que defecaban en arenero con que periodicidad recogían las heces del mismo: el 13% (16/169) limpia el arenero cada vez que el gato defeca, el 47.2% lo hace al menos una vez al día, el 31.7% al menos una vez a la semana y el 8.10% al menos una vez al mes. Para el análisis se hicieron dos grupos: los que limpiaban diario (cada vez que el gato defecaba y al menos una vez al día) y los que limpiaban con otra periodicidad. La prevalencia fue mayor (31.5%) en el segundo grupo ( $P= 0.06$ ), la razón de momios fue de 2.18 ( $IC\ 95\%= 0.87 - 5.55$ ) (Cuadro 4).

En cuanto al hábito de cazar se observó que 75 (44.4%) de los 169 gatos muestreados salen a cazar, el 45% (76/169) no lo hace y en 18 casos (10.7%) los dueños no sabían si el gato cazaba, los datos de éstos individuos se eliminaron al momento de hacer el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticas ( $P= 0.6$ ), entre la seroprevalencia en gatos que si cazan (22.7%) y la de los gatos que no cazan (19.7%).

De acuerdo con la dieta que reciben, los gatos se clasificaron en 3 grupos: grupo I, alimentados exclusivamente con una dieta comercial (croquetas y/o enlatado) (49.7%); grupo II, gatos que dentro de su dieta se incluía carne y/o vísceras crudas (13%); y grupo III, gatos que dentro de su dieta se incluían sobras de comida casera u otro tipo de alimento (embutidos y cereales, entre otros.) excepto comida cruda (36%) (Cuadro 5).

En el análisis se comparó la prevalencia del grupo II con la de los grupos I y III juntos. La frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* fue mayor en gatos que en su dieta se incluía comida cruda (36.4%) (grupo II), que en los que no se incluía este tipo de alimento (19.3%) (grupos I y III)(P= 0.06). La razón de momios fue de 2.39 (IC 95%= 0.82 – 6.85).

## DISCUSIÓN

La frecuencia de 21.8% de gatos positivos a anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* obtenida en este estudio resultó alta en comparación con los resultados obtenidos por Mondragón<sup>24</sup>, Martínez *et al.*<sup>26</sup>, y Guevara<sup>23</sup> en la Ciudad de México; en estos dos últimos trabajos se buscaron ooquistes en las heces de gatos, por lo tanto no pueden ser comparables con el presente estudio ya que cuando se usan técnicas serológicas, se obtienen prevalencias más altas que cuando se realizan técnicas coprológicas, no obstante sirven de referencia para conocer la frecuencia de *T. gondii* en gatos de la Ciudad de México.

En contraparte, la frecuencia obtenida en este estudio resulta baja si se compara con la encontrada en gatos domésticos de la ciudad de Guadalajara<sup>22</sup> (70.8%), o con el promedio registrado en otras partes del mundo (41.5%), con un rango de 6% a 71%.<sup>5</sup>

La prevalencia de *T. gondii* observada en el presente trabajo se puede considerar alta, ya que la población muestreada es totalmente doméstica, sin embargo la probabilidad de que el ser humano u otro animal haya adquirido la infección por parte de estos gatos positivos es baja, ya que la eliminación de ooquistes dura entre 3 a 18 días y sólo una vez en la vida del gato, al respecto Velasco *et al.*<sup>32</sup>, registraron una seroprevalencia de 31% en personas de la Ciudad de México.

La frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* fue mayor en las hembras (27.7%) que en los machos (13.2%) (P= 0.025), esto difiere de lo reportado por otros investigadores como Sumner *et al.*<sup>12</sup>, Fernández *et al.*<sup>14</sup> y Salant *et al.*<sup>19</sup> quienes no encontraron diferencias significativas en este aspecto, en contraste,

Miró *et al.*<sup>17</sup> encontraron una mayor prevalencia en machos (45.3%), que en hembras (32%). La diferencia estadística encontrada en este aspecto, posiblemente se deba al número de hembras y machos muestreados, ya que no hay estudios en los que se defina si hay alguna predisposición por sexo para adquirir la infección.

En este estudio la seroprevalencia varió con la edad, así, los gatos menores de 1 año tuvieron la más baja frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* y ésta se incrementó conforme a la edad, lo cual concuerda con lo observado por Dubey *et al.*<sup>13</sup>, Lucas *et al.*<sup>15</sup> y Salant *et al.*<sup>19</sup>; esto puede deberse a que entre mayor sea el gato mayor es la posibilidad de que se enfrente a las diferentes fases infectantes de *T. gondii* a lo largo de su vida.

Con respecto a la pregunta del cuestionario acerca de cuantos gatos había en la casa, se pudo observar que el 56.8%, conviven con uno o más gatos dentro de la misma casa, la seroprevalencia en éstos fue menor que la encontrada en aquellos gatos que no convivían con otros gatos, lo cual de acuerdo a la razón de momios calculada, podría considerarse como un factor protector para el gato, esto es contrario a lo observado por Gauss *et al.*<sup>18</sup>

Al respecto Dubey<sup>33</sup> señala que, en el gato, *T. gondii* es más eficiente cuando se transmite por carnivorismo (quistes tisulares), que cuando se transmite por ooquistes.

Otro posible factor de riesgo considerado para la investigación fue el acceso del gato al exterior del lugar donde vivía, ya que al salir de su casa el animal tiene la opción de cazar y en su caso ingerir presas que se consideran huéspedes intermediarios del parásito. En este aspecto, no se encontraron diferencias estadísticas entre los gatos que salen de la casa y los que no,

contrario a lo reportado en Sao Paulo, Brasil<sup>15</sup> y Barcelona, España<sup>18</sup>; esto puede ser explicado debido a la población estudiada, ya que todos los individuos de este estudio son domésticos y alimentados en sus respectivas casas con alimento comercial, por lo que sus necesidades de alimentación estaban cubiertas, además de que no necesariamente si salen de la casa, van a cazar e ingerir lo que capturen.

Los gatos son animales que entierran sus heces en el suelo, al domesticarlos y confinarlos a una casa o departamento se tiene que cubrir esa necesidad con arena o grava dispuesta en un arenero. Dado que los ooquistes infectantes se encuentran en las heces del gato, este recipiente se convierte en otro factor potencial de infección. En esta investigación la presencia de arenero en la casa del gato y la periodicidad de limpieza del mismo se consideraron para realizar el análisis. La prevalencia de gatos positivos a *T. gondii* y que defecan en arenero fue mayor que en los que no defecan en arenero, pero no hubo diferencia estadística, no obstante, sí se encontró diferencia estadística en la frecuencia de seropositivos a *T. gondii* entre aquellos gatos a los que se les aseaba el arenero todos los días y los que no, siendo mayor en los segundos, esto también lo observaron Fernández *et al.*<sup>14</sup> en Buenos Aires, en cambio Galván *et al.*<sup>22</sup> en Guadalajara no encontraron diferencia estadística en su estudio. Este factor se podría considerar como un parámetro indirecto para medir el cuidado del dueño hacía su mascota y por lo tanto la exposición a los diferentes factores para la infección, ya que aquel propietario que se preocupe por limpiar el arenero todos los días en general cuidará a su gato de una manera más adecuada, alimentándolo con comida comercial o no permitiendo que salga de la casa, a diferencia que aquel dueño que limpie el arenero cada

mes y que por consiguiente el cuidado hacia su mascota no sea el mejor, exponiéndolo más a los factores de riesgo.

Varios investigadores entre ellos Dubey *et al.*<sup>13</sup> y Miró *et al.*<sup>17</sup> señalan que el cazar es un factor de riesgo para que los felinos adquieran la infección por *T. gondii*, sin embargo en el presente trabajo no se encontró que esta conducta sea un factor de riesgo para que el gato se infecte con *T. gondii*, a diferencia de lo reportado por Fernández *et al.*<sup>14</sup> quienes sí encontraron una diferencia estadística entre los gatos que cazaban y los que no. Esta diferencia encontrada se debe principalmente a que en otros estudios la población de gatos es tanto doméstica como feral, en cambio en el presente trabajo los animales muestreados son exclusivamente domésticos por lo que el comportamiento de cazar que puedan presentar algunos individuos, se podría inferir que es más una forma de entretenimiento o entrenamiento, en el caso de gatas hacia sus gatitos, y que la mayoría de las veces estos gatos que cazan no ingieren su presa a diferencia de un gato feral, el cual tiene que cazar para sobrevivir y por lo tanto sí ingiere lo que captura.

Como ya se mencionó anteriormente la infección por *T. gondii* en los felinos ocurre principalmente por carnivorismo<sup>4,33</sup>, por lo que el tipo de dieta que se ofrece a los gatos domésticos puede jugar un papel muy importante dentro de la cadena epidemiológica, en este estudio se analizaron 3 tipos de dietas, la prevalencia de gatos seropositivos a *T. gondii* fue mayor (36.4%) en aquellos gatos que consumían carne o vísceras crudas que en los que no ingerían comida cruda, esto concuerda con lo observado por Lucas *et al.*<sup>15</sup>, pero no con lo reportado por Galván *et al.*<sup>22</sup> quienes no encontraron una diferencia significativa en este aspecto. En el presente trabajo se observó que



la ingestión de comida cruda ya sea carne o vísceras sí es un factor de riesgo, lo cuál concuerda con la forma más común en la que se transmite *T. gondii*, que es mediante la ingestión de quistes que se encuentran en diferentes tejidos, principalmente sistema nervioso central, músculo estriado esquelético y cardiaco, y algunos otros órganos que generalmente se proporcionan como comida a los gatos.

Con respecto a la relación entre la seropositividad a *T. gondii* y el consumo de comida comercial exclusivamente y/o la inclusión de sobras de comida casera u otro tipo de alimento (cereales, embutidos, entre otros), no se encontraron diferencias significativas, al igual que en otros estudios hechos por Fernández *et al.*<sup>14</sup> y Lucas *et al.*<sup>15</sup> Esto se debe a que la mayoría de los procesos usados para producir comida comercial exclusiva para gatos utilizan calor (más de 100°C)<sup>15</sup> y los quistes de *T. gondii* que puedan contener las materias primas son destruidos por esta causa, al igual que la comida preparada de manera casera y otros alimentos no exclusivos (atún enlatado, sardinas, embutidos, entre otros) con los que también se alimenta a el gato doméstico.

## CONCLUSIONES

En la presente investigación no se lograron identificar plenamente los factores de riesgo para la transmisión de *T. gondii* que mencionan otros autores, sin embargo, se pueden sugerir el ingerir comida cruda y no limpiar el arenero diariamente, aunque se tiene que tomar en cuenta que estos factores no pueden ser observados individualmente ni ser excluyentes y que además pueden ser aditivos, por ejemplo: un gato que vive solo pero sale a la calle, no caza, pero si le proporcionan comida cruda y no limpian su arenero diariamente no tiene la misma probabilidad de que adquiera al parásito que otro gato con otra combinación de estos factores de riesgo.

Otro variable por la cual no se identificaron estos factores se debe al sesgo en la información proporcionada por al dueño de cada gato ya que algunos propietarios no conocían bien a su gato o la persona que llevaba al gato para que se le tomara la muestra no sabía algunos datos.

El origen de la muestra también puede haber afectado en la identificación de los factores de riesgo, ya que los individuos muestreados son una población exclusivamente doméstica y por lo tanto algunos factores no estaban presentes, sin embargo sí se observó que la frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* es más alta que la que se esperaría en gatos caseros.

Mientras tanto, se recomienda no alimentar a los gatos domésticos con comida cruda, limpiar el arenero diariamente y disponer adecuadamente de las heces para evitar la transmisión de *Toxoplasma gondii* en gatos de la Ciudad de México, así como realizar otros estudios al respecto para identificar los factores de riesgo, tanto en una población doméstica como feral.

## REFERENCIAS

1. Dubey JP. Toxoplasmosis. JAVMA. 1994; 205:1593-1598
2. Ambroise-Thomas P, Petersen E (eds.). Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, Francia. 2000; 324 pp.
3. Apt BW. Toxoplasmosis in developing countries. Parasitology Today. 1985; 1:44-46
4. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 1998; 28: 1019-1024
5. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM, *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 2000; 30:1217-1258
6. Dubey JP. Unexpected oocysts shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: *In vivo* stage conversion and strain variation. Vet. Parasitol. 2005; 133: 289-298
7. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press. Boca Ratón, Florida. 1988. 220 p.p.
8. Dubey JP, Carpenter JL. Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. JAVMA. 1993; 203:1546-1549
9. Henriksen P, Dietz HH, Henriksen SA. Fatal toxoplasmosis in five cats. Vet parasitol. 1994; 55:15-20
10. Svobodová V, Knotek Z, Svoboda M. Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cats. Veterinary Parasitology. 1998; 80: 173-176

11. Powell CC, Brewer M, Lappin MR. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Vet. Parasitol.* 2001; 102: 29–33
12. Sumner B, Ackland ML. *Toxoplasma gondii* antibody in domestic cats in Melbourne. *Aust Vet J.* 1999; 77:447-449
13. Dubey JP, Saville WJA, Stanek JF, Reed SM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *J. Parasitol.* 2002; 88:802-803
14. Fernández F, Ouviaña G, Clot E, Fernandes GR, Codoni C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina, 1993. *Vet Parasitol.* 1995; 59:75-79
15. Lucas SRR, Hagiwara MK, Loureiro VS, Ikesaki JYH, Birgel EH. *Toxoplasma gondii* infection in brazilian domestic cats. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 1999; 41:221-224
16. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, de Oliveira RC. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapita, Estado do Paraná, Brasil. *Ciência Rural, Santa María.* 1999; 29:99-104
17. Miró G, Montoya A, Jiménez S, Frisuelos C, Mateo M, Fuentes I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Vet. Parasitol.* 2004; 126:249-255
18. Gauss CBL, Almería S, Ortuño A, Garcia F, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. *J. Parasitol.* 2002; 89: 1067-1068

19. Salant H, Spira DT. A cross-sectional survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Jerusalem cats. *Vet. Parasitol.* 2004; 124:167-177
20. Nogami S, Moritomo T, Kamata H, Tamura Y, Sakai T, Nakagaki K, Motoyoshi S. Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* en domiciled cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 1998; 60: 1001-1004
21. Maruyama S, Hiraga S, Yokoyama E, Naoi M, Tsuruoka Y, Ogura Y, *et al.* Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* infections among pet cats in Kanagawa and Saitama prefectures. *J. Vet. Med. Sci.* 1998; 60:997-1000
22. Galván-Ramírez ML, Sánchez VG, Vielma SM, Soto MJL. Presence of anti-*Toxoplasma gondii* in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1999; 32: 483-488
23. Guevara CD. Identificación de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en heces fecales de gatos del Distrito Federal, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1986
24. Mondragón BMP. Estudio de la influencia del gato en la seropositividad a *Toxoplasma gondii* en personas, realizado en la ciudad de México y area metropolitana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Univerdidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1993
25. Aguilar OP. Frecuencia de quistes de *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Univerdidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1977

26. Martínez BI, Ruiz GLA, Gutierrez QM, Fernández PAM, Vázquez TO. Frecuencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos de la ciudad de México y area metropolitana. Rev. Mex. Patol. Clin. 1996; 43: 121-127
27. Navarro FR. Introducción a la Bioestadística: Análisis de variables binarias. McGraw-Hill. México.1988
28. Scott PP. The cat in The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals 5<sup>th</sup> ed. UFAW (editor), p. 351. Longman Group Limited.1976
29. Correa D, Mandujano A, Medina Y (eds.). Manual de técnicas modernas en Inmunología. Editado por Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaria de Salud. 2000
30. Correa-Beltrán MD, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Meza-Lucas A, Coballase-Urrutia E, Rico-Torres C, *et al.* Manual de Procedimientos de Laboratorio. Memorias de Curso Teórico Práctico de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos; 2004 abril 26-30; México (D.F.): Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; 2004: 16-19
31. Pollard M. Gatos, Razas, cuidados, historia. pp. 18-19. Parragon. 2005. Queen Street HE. 2005
32. Velasco-Castrejon O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C, *et al.* Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. Sal Púb Méx. 1992; 34: 222-229

33. Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats.  
J. Parasitol. 1996; 82: 957- 961

### Cuadro 1.

Frecuencia por delegación de gatos de la ciudad de México positivos a anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*.

Delegación	Gatos muestreados	Positivos (%)
Álvaro Obregón	10	2 (20)
Azcapotzalco	10	0
Benito Juárez	10	0
Coyoacán	10	2 (20)
Cuajimalpa	10	1 (10)
Cuauhtémoc	11	3 (27.2)
Gustavo A. Madero	10	4 (40)
Iztacalco	10	1 (10)
Iztapalapa	10	3 (30)
Magdalena Contreras	14	2 (14.2)
Miguel Hidalgo	14	4 (28.5)
Milpa Alta	10	4 (40)
Tláhuac	10	3 (30)
Tlalpan	10	3 (30)
Venustiano Carranza	10	3 (30)
Xochimilco	10	2 (20)

### Cuadro 2.

Relación de positividad de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de México con respecto a la edad

Rango de edad (años)	Número de gatos en el rango de edad	Positivos (%)
≤ 1	55	8 (14.5)
1.08 a ≤ 9	108	26 (24)
≥ 9.08	6	3(50)

\* 0.08 años equivalen a 1 mes



### Cuadro 3.

Lugar donde defeca el gato y su relación con la seropositividad a anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*

Lugar	Número de gatos que defecan en ese lugar (%)	Número de positivos (%)
Arenero	106 (62.7)	22 (20.8)
Arenero/otro*	15 (8.9)	5 (33.3)
Otro*	46 (27.2)	9 (19.6)
NS	2 (1.2)	1 (50)

Gatos muestreados = 169

NS = el propietario no sabía donde defecaba sus gato

\* = Jardín, patio, azotea, calle, etc.

### Cuadro 4.

Frecuencia con que se retiraban las heces del arenero y su relación con la seropositividad a anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*

Frecuencia	Número (%)	Número de positivos (%)
Cada vez que el gato defecaba	16 (13)	6 (37.5)
Al menos una vez al día	58 (47.2)	7 (12.1)
Al menos una vez a la semana	39 (10)	12 (30.8)
Al menos una vez al mes	10 (8.1)	4 (40)

Gatos muestreados = 169

### Cuadro 5.

Tipo de dieta con la que se alimentaba a los gatos y su relación con la seropositividad a anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*

Tipo de alimento	Número de gatos alimentados con ese tipo de dieta (%)	Número de positivos (%)
Grupo I	84 (49.7)	18 (21.4)
Grupo II	22 (13)	8 (36.4)
Grupo III	61 (36)	10 (16.4)

Gatos muestreados = 169

Grupo I: gatos alimentados exclusivamente con una dieta comercial (croquetas y/o enlatado).

Grupo II: gatos que dentro de su dieta se incluía carne y/o vísceras crudas.

Grupo III: gatos que dentro de su dieta se incluían sobras de comida casera u otro tipo de alimento (embutidos y cereales, etc.), excepto comida cruda.

### Anexo 1. Cuestionario aplicado al propietario de cada gato

Instrucciones: Llenar un registro por cada gato y anotar el número en el tubo

#### **Datos del Propietario**

Fecha: \_\_\_\_\_ Núm. registro \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

#### **Datos del gato**

Nombre: \_\_\_\_\_

Raza: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ años \_\_\_\_\_ meses Sexo: M H

1.- ¿Cuánto tiempo tiene con el gato? \_\_\_\_\_ meses

2.- ¿Tiene otros gatos? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ (Respuesta afirmativa = preguntar parentesco)

3.- ¿Su gato sale a la calle? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ No sabe \_\_\_\_\_  
(NOTA: si la respuesta es a veces estos será = si)

4.- ¿En que lugar defeca el gato?

Arenero \_\_\_\_\_ Jardín \_\_\_\_\_ No sabe \_\_\_\_\_

Otro \_\_\_\_\_ ¿cuál? \_\_\_\_\_

5.- En caso que el gato defecue en arenero ¿Con que periodicidad retira las heces del mismo?

Cada vez que defeca \_\_\_\_\_ Al menos una vez al día \_\_\_\_\_

Al menos una vez a la semana \_\_\_\_\_ Al menos una vez al mes \_\_\_\_\_

6.- ¿Su gato caza? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ No sabe \_\_\_\_\_ (Respuesta afirmativa = pasar a pregunta 6bis)

6bis.- Tipo de presa: Ratones \_\_\_\_\_ Pájaros \_\_\_\_\_ Lagartijas \_\_\_\_\_

Lugar: \_\_\_\_\_

Frecuencia: \_\_\_\_\_

7.- ¿Con que frecuencia se alimenta al gato de?

	Diario	Nunca	No sabe	Otra
<b>Comida peletizada</b>				
<b>Comida enlatada</b>				
<b>Comida cruda</b>				
<b>Comida cocida</b>				

## **Anexo 2. Soluciones utilizadas en el ELISA para la detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero de gatos**

- Solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6
  1. Pesar 3.18 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y 5.86 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )
  2. Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada
  3. Ajustar el pH a 9.6
  4. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada
  5. Mantener a 4°C
  
- Solución amortiguadora de lavado (PBS-Tween 20 al 0.05%)
  1. Medir 500  $\mu\text{L}$  de Tween 20
  2. Diluir en 1000 mL de PBS(\*\*) pH 7.2
  3. Mantener a 4°C
  
- (\*\*)Solución salina de fosfatos pH 7.2 (PBS)
  1. Medir 800 mL de agua bidestilada
  2. Agregar 100 mL de PB 10x(\*) y 8.75 g de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )
  3. Ajustar el pH a 7.2 una vez disuelto el  $\text{NaCl}$
  4. Aforar a 1000 mL agua bidestilada
  5. Mantener a 4°C
  
- (\*) Preparación del PB 10x:
  1. Pesar 2.62 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y 11.5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
  2. Disolver las sales en 200 mL de agua bidestilada
  3. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada
  4. Mantener a 4°C
  
- Solución bloqueadora de albúmina sérica bovina al 1%
  1. Medir 1 mL de albúmina sérica bovina al 25%
  2. Diluir en 24 mL de PBS-Tween 20
  3. Mantener a -20°C
  
- Solución de cromógeno-sustrato para peroxidasa para ELISA
  1. Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina
  2. Añadir a 5mL de ácido cítrico 0.1M y 5mL de citrato de sodio 0.1M
  3. Añadir 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%NOTA: Esta solución se prepara inmediatamente antes de usarla
  
- Solución de ácido sulfúrico 2N
  1. Medir 850 mL de agua bidestilada
  2. Medir 98.08 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
  3. Disolver el ácido en el agua
  4. Aforar a 1000 mL
  5. Mantener a 4°C

**Anexo 3. Protocolo para la inmunización de un gato con antígeno sonificado de *Toxoplasma gondii***

- Día cero

1. Se obtuvo 1 mL de sangre del gato para referencia
2. El antígeno (10 millones de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH previamente sonicados, diluidos en 1 mL de PBS pH 9.6) se diluyó en 1 mL de adyuvante completo de Freund en una proporción de 1:1
3. La solución se inyectó vía subcutánea en varios puntos del dorso del gato

- Día 7

1. Se obtuvo 1 mL de sangre del gato para referencia
2. El antígeno se diluyó en 1 mL de adyuvante incompleto de Freund en una proporción de 1:1
3. La solución se inyectó vía subcutánea en varios puntos del dorso del gato

- Día 14

1. Se obtuvo 1 mL de sangre del gato para referencia
2. Se inyectó 1 mL de antígeno vía intramuscular

- Día 21

1. Se obtuvo 1 mL de sangre del gato para referencia
2. Se inyectó 0.5 mL de antígeno vía intramuscular

- Día 28

1. Se obtuvo 1 mL de sangre del gato para referencia
2. Se inyectó 0.5 mL de antígeno vía intramuscular

- Día 35

1. Se obtuvo 1 mL de sangre del gato para referencia
2. Se inyectó 0.5 mL de antígeno vía intramuscular

- Día 40

1. Se obtuvo 1 mL de sangre del gato para referencia

Todas las muestras de sangre se dejaron coagular para después obtener el suero y hacer una curva de absorbancia y poner a punto el ELISA.