



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
SALUD ANIMAL

AISLAMIENTO DE *Toxoplasma gondii* DE TEJIDO  
CEREBRAL DE UN BECERRO INFECTADO  
NATURALMENTE EN MÉXICO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS

PRESENTA

DIANA OFELIA CHÁVEZ CRISÓSTOMO

TUTORA: Elizabeth Morales Salinas

COMITÉ TUTORAL: Ma. Dolores Correa Beltrán  
Alfredo Sahagún Ruíz

(México)

(2010)



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIA

A todos los animales utilizados en este trabajo ya que sin ellos no hubiéramos llegado al resultado y a los conocimientos obtenidos, esperando que estos reditúen en la salud animal y humana.

A mi tío Manuel Crisóstomo que ha sido y será una persona fundamental en mi vida.

A la “chiquita” y a “kimba” por hacer alegres y amenos todos mis días.

A todas las personas que estuvieron involucradas de alguna u otra forma en la realización de esta investigación, ya que finalmente sin su apoyo no se hubiese podido realizar.

*Follow your common sense  
you cannot hide yourself  
behind a fairytale forever and ever  
only by revealing the hole truth can we disclose  
the soul of this bulwark forever and ever  
forever and ever*

*Indoctrinated minds so very often  
contain sick thoughts  
and commit most of the evil they preach against*

*Don't try to convince me with messages from god  
you accuse us of sins committed by yourselves  
it's easy to condemn without looking in the mirror  
behind the scenes opens reality*

*Eternal silence cries out for justice  
forgiveness is not for sale  
nor is the will to forget*

*EPICA*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

Al Departamento de Anatomopatología de la FMVZ, UNAM,

Al Centro Agropecuario e Industrial Tizayuca (CAIT),

Al Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP),

Al Laboratorio de Toxicología Genética del Instituto Nacional de Pediatría (INP),

A la Unidad de Microscopia Electrónica del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM,

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM por permitirnos utilizar el Animalario que tienen a su cargo...

...a cada uno gracias por las facilidades brindadas para llevar a cabo las diferentes actividades que se requerían para la realización de esta investigación

Al proyecto PAPIIT No. IN210207 en el cual este trabajo se apoyo

A CONACyT por el apoyo económico que brinda a los alumnos

A mi tutora la Dra. Elizabeth Morales Salinas por la confianza depositada en mí para llevar a cabo este trabajo, por sus comentarios, apoyo, enseñanzas y paciencia durante la realización del mismo

A mi comité tutor formado por la Dra. Dolores Correa y el Dr. Alfredo Sahagún quienes aportaron buenos comentarios para el mejoramiento del proyecto y a los miembros del jurado por sus valiosos comentarios hacia la tesis

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Mario Santa Cruz, al Dr. Rafael Soto Castor y al Dr. José Antonio Vázquez García miembros del CAITSA por su amistad y el apoyo brindado ya que sin el, este trabajo no hubiera finalizado exitosamente.

Por su apoyo Técnico en el área de biología molecular a Claudia Patricia Rico Torres del Laboratorio de Inmunología Experimental del INP, a Félix Sánchez Godoy del laboratorio de Biología Molecular y Celular del Departamento de Aves de la FMVZ, UNAM y al laboratorista Miguel Ángel Martínez Ramírez del Laboratorio de Inmunohistoquímica y Biología molecular del Departamento de Anatomopatología de la FMVZ, UNAM.

Por su apoyo Técnico en el área de manejo de animales de laboratorio a Héctor Luna Pastén y a Rafael López Reboseño del Laboratorio de Inmunología Experimental del INP.

Al laboratorista Luis Antonio Morales Arreola y a su equipo de trabajo en el laboratorio de Histopatología del Departamento de Anatomopatología de la FMVZ, UNAM, por agilizar el procesamiento de las muestras para su evaluación histológica.

Al Dr. Alfredo Sahagún y a la química Elvia Lazo García del Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM por permitirnos trabajar en éste.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, padrinos, abuelitos y tíos por su apoyo, pero especialmente a mi tío Manolo por todo su apoyo y su cariño ya que gracias a eso sigo adelante cada día.

A mis amigos aunque algunos de ellos están muchos kilómetros lejos de aquí, quiero agradecerles su apoyo, cuidados, tiempo y amistad ya que con ello hicieron y han hecho agradables cada uno de los días transcurridos durante esta etapa de mi vida, gracias a: Liliana A., Flor B, Adria P., Gus F., Esteban S., Taiche M., Flavio B., Xitli G., Ceci E., Adriana M., Lucy R., Alex C., Martín M., C. Tixi, Paty M., Enrique C., Ernesto U., Abraham C., Tania B., Daniel "bioloco", Marco G., Luis, Alex BB., Isaac D., Javis, Juan, Ayin, Jaime Eugenio, Don Migue, Enrique A., Jimena, Tania, Ari, Larisa Ch., Dr. Lezama, Víctor, C Vizuet, Alex B., Sandra S, Toño, Bellota A., Rocío R....

... pero en esta ocasión quiero agradecer en especial a Alejandra Arias O., ya que sin su ayuda los días de muestreo se hubieran hecho muy pesados y tardados y el término de este trabajo se hubiera prolongado más.

## ÍNDICE

1. Resumen -----	1
2. Introducción -----	4
2.1. Principales protozoarios que afectan al bovino -----	4
2.2. Toxoplasmosis -----	5
2.3 Ciclo de vida -----	7
2.4 Epidemiología -----	9
2.5 Diagnóstico -----	10
2.6 Aislamientos -----	13
En el huésped definitivo e intermediarios -----	13
En ganado bovino -----	13
2.7 Filogenética y diversidad biológica de <i>Toxoplasma gondii</i> -----	15
3. Justificación -----	17
4. Hipótesis -----	18
5. Objetivo General -----	18
5.1. Objetivos Específicos -----	18
6. Material y métodos -----	19
6.1 Clasificación del estudio -----	19

6.2 Ubicación del estudio -----	19
6.3 Estrategia general -----	19
6.4. ELISA para los bovinos -----	20
6.5. Método humanitario de sacrificio en los becerros-----	22
6.6. Apertura de la cavidad craneana (extracción del encéfalo) -----	22
6.7. Obtención y toma de muestras de los cerebros -----	22
6.8. Animales de laboratorio -----	23
6.9 Muestreo serológico de las ratonas -----	25
6.10 ELISA de los ratones para <i>Neospora caninum</i> -----	25
6.11 ELISA de los ratones para <i>Toxoplasma gondii</i> -----	25
6.12. Obtención de líquido peritoneal de los ratones -----	27
6.13. Necropsia de los roedores -----	28
6.14 Mantenimiento de parásitos aislados -----	28
6.15 Técnica de inmunohistoquímica para <i>N. caninum</i> en tejidos-----	29
6.16 Técnica de inmunohistoquímica para <i>Toxoplasma gondii</i> -----	31
6.17 Ultraestructura de los taquizoitos -----	31
6.18 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para <i>Neospora caninum</i> -	32
Extracción de DNA -----	32
Desarrollo de la PCR -----	32
6.19 PCR para <i>Toxoplasma gondii</i> -----	33
Extracción de DNA -----	33
Cuantificación de DNA -----	34



Desarrollo de la PCR -----	34
6.20 Genotipificación mediante RFLP y secuenciación a partir del producto del PCR obtenido de <i>Toxoplasma gondii</i> -----	36
6.21 Secuenciación del producto de PCR de los genes SAG2 y GRA6 de <i>Toxoplasma gondii</i> -----	36
6.22 Comparación de resultados -----	37
7. Resultados -----	38
7.1. ELISA del muestreo serológico realizado a vacas gestantes -----	38
7.2. ELISA de los sueros de los becerros -----	38
7.3. ELISA de los ratones para <i>Neospora caninum</i> -----	39
7.4. ELISA para IgG contra <i>Toxoplasma gondii</i> de los ratones inoculados con los diferentes cerebros de becerros obtenidos -----	39
7.5. Estudio histológico del tejido cerebral de los becerros y el aborto -----	40
7.6. Datos clínicos de los 18 ratones inoculados con los diferentes cerebros de bovinos y líquido peritoneal de ratones con taquizoitos -----	40
7.7. Hallazgos patológicos de la ratona muerta a los ocho días P.I (Primer roedor muerto) -----	41
7.8. Análisis del líquido peritoneal de la ratona muerta a los ocho días P.I. utilizando la tinción de Giemsa (Primer roedor muerto) -----	41
7.9. Estudio inmunohistoquímico para <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> del líquido peritoneal y tejidos obtenidos del ratón muerto a los ocho días P.I. (Primer roedor muerto) -----	42
7.10. Ultraestructura de los taquizoitos obtenidos -----	42
7.11. Inoculación en 3 ratonas (pases) con líquido peritoneal proveniente del primer ratón infectado y muerto a los ocho días P.I. -----	43

7.12. Hallazgos patológicos de la ratona inoculada con líquido peritoneal con taquizoitos del primer ratón muerto (Segundo ratón muerto) -----	43
7.13. Estudio inmunohistoquímico para <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> de tejidos obtenidos del ratón muerto a los siete días P.I. (Segundo ratón muerto) -----	43
7.14. PCR para <i>Neospora caninum</i> de líquido peritoneal y tejidos de ambos roedores muertos -----	44
7.15. PCR para <i>Toxoplasma gondii</i> de líquido peritoneal -----	44
7.16. PCR-RFLP para los genes <i>SAG2</i> y $\beta$ <i>TUB</i> de <i>T. gondii</i> -----	45
7.17. Secuenciación del producto de PCR con <i>SAG2</i> y <i>GRA6</i> de <i>T. gondii</i> ---	45
8. Discusión -----	47
8.1. Aislamiento de <i>Toxoplasma gondii</i> -----	47
8.2. Hallazgos histológicos de los tejidos obtenidos del becerro y ratones----	49
8.3. Hallazgos clínicos en los ratones -----	51
8.4. ELISA en los ratones para <i>N. caninum</i> -----	51
8.5. ELISA en los ratones para <i>T. gondii</i> -----	52
8.6. Ultraestructura de los taquizoitos -----	53
8.7. Genotipificación del aislamiento de <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR-RFLP para los genes <i>SAG2</i> y $\beta$ <i>TUB</i> con la secuenciación del producto de PCR de los genes <i>SAG2</i> y <i>GRA6</i> -----	54
9. Conclusiones -----	59
10. Referencias -----	60
11. Anexos	
Anexo 1. Gráficas del ELISA (Figuras 1 a 2b) -----	70
Anexo 2. Imagen de cerebro de becerro (Figura 3) -----	71
Anexo 3. Imágenes del primer roedor muerto -----	72

Figura 4. Ratón con pelo hirsuto, poca actividad y movimientos acelerados del tórax -----	72
Figura 5. Fotomicrografía de sección de hígado del primer ratón muerto -----	73
Figura 6. Fotomicrografía de sección de bazo del primer ratón muerto -----	73
Figura 7. Fotomicrografía de sección de mesenterio del primer ratón muerto -----	74
Figura 8. Citología de líquido peritoneal con taquizoitos del primer ratón muerto teñida con Giemsa-----	74
Figura 9. IHQ de líquido peritoneal con taquizoitos positivo a <i>T. gondii</i> del primer ratón muerto -----	75
Figura 10. IHQ de bazo, positiva a <i>T. gondii</i> del primer ratón muerto, en el cual también se aprecian dos acúmulos de taquizoitos -----	75
Figura 11. IHQ de hígado, positiva a <i>T. gondii</i> del primer ratón muerto--	76
Figura 12. IHQ de mesenterio, positiva a <i>T. gondii</i> del primer ratón muerto-----	76
Figura 13. MET de taquizoito de <i>T. gondii</i> , mostrando las roptrias tipo laberintina -----	77
Figura 14. MET de taquizoito de <i>T. gondii</i> , mostrando las roptrias, complejo apical, micronemas, núcleo -----	77
Anexo 4. Imágenes del segundo roedor muerto -----	78
Figura 15. Líquido peritoneal con taquizoitos del segundo ratón muerto --	78
Figura 16. Fotomicrografía de pulmón del segundo ratón muerto -----	78

Figura 17. Fotomicrografía de bazo del segundo ratón muerto -----	79
Figura 18. Fotomicrografía de mesenterio del segundo ratón muerto----	79
Figura 19. IHQ de bazo, positiva a <i>T. gondii</i> del segundo ratón muerto-	80
Figura 20. IHQ de pulmón, positiva a <i>T. gondii</i> del segundo ratón muerto	
-----	80
Anexo 5. Imágenes de pruebas moleculares -----	81
Figura 21. PCR para <i>Neospora caninum</i> -----	81
Figura 22. PCR de <i>b1, sag2, gra6</i> y <i>βtub</i> de <i>T. gondii</i> -----	82
Figura 23. PCR de <i>sag3</i> de <i>T. gondii</i> -----	83
Figura 24. RFLP del aislamiento de becerro con <i>sag2</i> de <i>T. gondii</i> -----	83
Figura 25. RFLP del aislamiento de becerro con <i>βTUB</i> de <i>T. gondii</i> ----	84
Figura 26. Secuencia obtenida con <i>gra6</i> de <i>T. gondii</i> -----	85
Figura 27. Árbol que relaciona al aislamiento de <i>T. gondii</i> del becerro con	
tres cepas de referencia de <i>T. gondii</i> (GT1, ME49 y VEG), genotipos I, II y III,	
respectivamente con <i>gra6</i> -----	86
Figura 28. Comparación del aislamiento obtenido del becerro con tres	
cepas de referencia de <i>T. gondii</i> -----	87
Figura 29. Secuencia obtenida con <i>sag2</i> de <i>T. gondii</i> -----	88
Figura 30. Árbol que relaciona al aislamiento de <i>T. gondii</i> del becerro con	
tres cepas de referencia de <i>T. gondii</i> (GT1, ME49 y VEG), genotipos I, II y III,	
respectivamente con <i>sag2</i> -----	89
Figura 31. Comparación del aislamiento obtenido del becerro con tres	
cepas de referencia de <i>T. gondii</i> -----	90

## 12. Cuadros

Cuadro 1. Diferencias morfológicas y ultraestructurales entre *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* -----12

Cuadro 2. Intentos de aislamiento y aislamientos de *Toxoplasma gondii* de tejidos de ganado infectado naturalmente -----14

Cuadro 3. Distribución del total de ratones utilizados en el trabajo -----24

Cuadro 4. Temperaturas para la PCR de cada uno de los genes utilizados—35

Cuadro 5. Resultados del ELISA para *Neospora caninum* de los establos muestreados -----38

## **AISLAMIENTO DE *Toxoplasma gondii* DE TEJIDO CEREBRAL DE UN BECERRO INFECTADO NATURALMENTE EN MÉXICO**

### **1.- RESUMEN**

La toxoplasmosis afecta a animales de sangre caliente y se considera zoonosis. En animales provoca alteraciones reproductivas, problemas neurológicos, oftalmológicos y respiratorios lo que conlleva a grandes pérdidas económicas. La infección en humanos suele ser asintomática, pero con el tiempo se presentan síntomas que podrían causar la muerte. El objetivo inicial de esta investigación era aislar a *Neospora caninum*, pero finalmente se obtuvo el aislamiento de *Toxoplasma gondii* del cerebro de un becerro infectado naturalmente, el cuál se caracterizó genéticamente y se comparó con otros aislamientos. Para realizar el trabajo se tomaron muestras de suero de 294 vacas Holstein y 4 becerros, hijos de estas vacas. Se obtuvo una becerrea recién nacida clínicamente sana, seronegativa a *Neospora caninum* y *T. gondii*, pero nacida de una madre seropositiva a *Toxoplasma*, se le practicó la eutanasia y se obtuvo el cerebro. Un hemisferio se evaluó por histología resultando sin alteraciones histológicas, el otro se inoculó en ratones Balb/c. Dos ratonas inoculadas murieron, la primera a los 8 días p.i. con el macerado de cerebro de la becerrea y la otra a los 7 días p.i. con el líquido peritoneal del ratón muerto a los 8 días p.i. Se confirmó el aislamiento de *Toxoplasma gondii* por inmunohistoquímica (IHQ), microscopía electrónica de transmisión (MET) y PCR de líquido peritoneal y de varios órganos obtenidos a la necropsia (pulmón, bazo, hígado y mesenterio). Posteriormente, mediante Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) y

secuenciación de los genes *gra6* y *sag2*, se corroboró que el aislamiento corresponde al genotipo I de *Toxoplasma gondii*. Se concluye que es el primer aislamiento de *Toxoplasma gondii* de un becerro infectado naturalmente en México. La información obtenida en este trabajo contribuye a demostrar la existencia de *T. gondii* en los bovinos de éste país.

**Palabras clave:** Aislamiento, *Toxoplasma gondii*, bovinos, PCR, genotipo I, México.

## **ABSTRACT**

The toxoplasmosis concerns animals of warm blood and is considered zoonosis. In animals it provokes reproductive alterations, neurological, ophthalmological and respiratory problems what carries to big economic losses. The infection in human beings is in the habit of being asymptomatic, but with the time they present symptoms that might cause the death. The initial point of this research was to isolate *Neospora caninum*, but finally there was obtained the isolation of *Toxoplasma gondii* of the brain of a naturally infected calf, which was characterized genetically and I compare with other isolations. To realize the work there took samples of whey of 294 cows Holstein and 4 calves, both of the cows that were sampled. There obtained a snapdragon clinical healthy, seronegative newborn to *Neospora caninum* and *T. gondii*, but born of a seropositive mother to *Toxoplasma gondii*, the euthanasia was practised to the calf and the brain was obtained. A hemisphere was evaluated by histology proving without histological alterations, other one was inoculated in mice Balb/c. Two mice inoculated died, the

first one to 8 days p.i. with the softened one of brain of the calf and other one to 7 days p.i. with the liquid peritoneal of the mouse died to 8 days p.i. To confirmed the isolation of *Toxoplasma gondii* we made inmunohistochemistry (IHC), *Transmission electron microscopy* (TEM) and PCR of liquid peritoneal and of several organs obtained by the necropsy (lung, spleen, liver and mesentery). Later, with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and sequence of the genes *gra6* and *sag2*, there was corroborated that the isolation matches to the genotype I de *Toxoplasma gondii*. One concludes that it is the first isolation of *T. gondii* of a calf infected naturally in Mexico. The information obtained in this work the existence helps to demonstrate of *T. gondii* in the bovine ones of this one country.

**Key words:** Isolate, *Toxoplasma gondii*, Cattle, PCR, genotype I, Mexico.



# AISLAMIENTO DE *Toxoplasma gondii* DE TEJIDO CEREBRAL DE UN BECERRO INFECTADO NATURALMENTE EN MÉXICO

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Principales protozoarios que afectan al bovino

*Neospora caninum*, *Sarcocystis spp.* y *Toxoplasma gondii* forman parte de los protozoarios que pueden infectar al ganado, y algunas veces pueden causarles fallas reproductivas.

Diversos estudios epidemiológicos han puesto en evidencia la presencia de *Neospora caninum*, tanto en hospederos definitivos como en intermediarios en México y otros países, demostrando que el parásito tiene distribución mundial. La neosporosis afecta a varias especies: equinos, cabras, ovejas, venados, perros y bovinos, causando problemas neurológicos tales como parálisis de miembros posteriores, encefalitis o alteraciones reproductivas, siendo más evidente el aborto, que conlleva a grandes pérdidas económicas, principalmente en la industria lechera (Sánchez, *et al.*, 2003; Morales, *et al.*, 2001; Salinas, *et al.*, 2005, Dubey, *et al.*, 2007a, Dubey, *et al.*, 1998a; Cuddon, *et al.*, 1992, Barr, *et al.*, 1993, Morales, 1997; Barr, 1991).

De la sarcosporidiosis, *Sarcocystis hominis* es el agente causal en el ganado bovino. La infección clínica ocurre generalmente en los animales adultos, en los cuales pueden encontrarse sarcoquistes o quistes tisulares en los músculos, lo que representa un estado de infección subclínica latente. La infección en animales recién nacidos es rara pero llega a suceder, observándose anemia y muerte neonatal. Puede ocurrir infección fetal y aborto cuando las hembras

gestantes son infectadas con especies muy patógenas de éste protozoario (Anderson *et al.*, 1994).

Un protozoario que ha sido muy controversial con respecto a si afecta o no a los bovinos es *Toxoplasma gondii*. Algunos estudios mencionan que no se han confirmado reportes de abortos o de algún tipo de infección clínica por *T. gondii* en el ganado vacuno, pero se ha logrado el aislamiento de este protozoario en vacas adultas clínicamente normales y en tejidos provenientes de bovinos seropositivos (Dubey, 1986; Dubey, 1992).

## **2.2. Toxoplasmosis**

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un protozoario descrito por primera vez en 1908 en los tejidos de un gundi (*Ctenodoactylus gundi*), un roedor del norte de África. Este parásito pertenece al Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoasida, Orden Eimeriorina y familia Toxoplasmae (Esteban-Redondo *et al.*, 1997, Hill *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2008.).

La toxoplasmosis es una enfermedad con amplia distribución geográfica. Es capaz de infectar a animales de sangre caliente, incluyendo al ser humano, en el cual la enfermedad fue reconocida por primera vez en 1930, por lo que se considera un patógeno zoonótico. En animales provoca alteraciones reproductivas como reabsorción embrionaria, momificaciones, abortos y muerte neonatal. Además provoca problemas neurológicos, oftalmológicos, respiratorios y diarrea. En personas no inmunodeprimidas se ha informado de casos de linfadenopatías, fiebre, debilidad, dolor muscular, cefaléa, uveitis y retinocoroiditis, reducción de la inteligencia y esquizofrenia. En personas inmunodeprimidas como pacientes con

SIDA, mueren por encefalitis. En caso de infección congénita, se presentan abortos y si la gestación llega a término, el feto puede presentar retinocoroiditis, hidrocefalia, calcificaciones intracerebrales y convulsiones (François, 1998, Tenter *et al.*, 2000, Hill *et al.*, 2002, Hill *et al.*, 2005, Mc Allister, 2005, Kim *et al.*, 2008).

En bovinos el primer caso de toxoplasmosis adquirida de forma natural se informó en Ohio, Estados Unidos en 1953 por Sanger y colaboradores. Se menciona que tanto animales jóvenes como adultos infectados con este parásito pueden mostrar signos clínicos como ataxia, debilidad, movimientos de masticación, diarrea, problemas respiratorios, depresión, fiebre, anorexia, baja producción de leche y hasta la muerte. Algunos estudios mencionan que aparentemente *T. gondii* no causa aborto ni muerte neonatal bajo condiciones naturales, pero esto es algo que aún no ha sido bien documentado (Dubey, 1986). Las lesiones que se han observado en vacas infectadas natural y experimentalmente son: metritis, neumonía crónica, miocarditis, focos de necrosis en hígado, leucoencefalomalacia, encefalomiелitis, degeneración de las células de Purkinje y necrosis de la capa granular del cerebro, linfonodos edematosos, hemorragias en miocardio y encéfalo y glomerulonefritis. El parásito tiene afinidad por la mayoría o la totalidad de los tejidos corporales; debido a esto y a que el ganado vacuno es utilizado para consumo humano, se han realizado algunos estudios con derivados cárnicos y lácteos de éste huésped; para 1986 de una muestra de leche se logró aislar a *Toxoplasma* (Dubey, 1986). Actualmente se han hecho estudios serológicos y con la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa los cuales han detectado el DNA de *T. gondii* en productos cárnicos derivados del bovino. WarnekuLASuriya y colaboradores en Londres, Inglaterra en

1998 realizaron un estudio por medio de la PCR para identificar *T. gondii* en carne curada, en el cual de un total de 67 muestras de carne sólo lograron detectar DNA del parásito en una sola muestra. Por otro lado Aspinall *et al.*, en el 2002, en el Reino Unido, evaluaron 71 muestras de carne cruda. De estas solo 4 provenían de bovino, de las cuales solo en una de ellas (25%) se obtuvo DNA de *T. gondii*. Lora y colaboradores en el 2007 en Colombia realizaron un estudio en 60 muestras de carne de res cruda, de las cuales 48 (80%) fueron positivas a la presencia de DNA de *Toxoplasma gondii*. Sin embargo, el papel epidemiológico que juega esta enfermedad con respecto al consumo de la carne o leche procedente de una vaca infectada con dicho protozooario es poco claro (Dubey, 1986, Esteban–Redondo, *et al.*, 1997, Warnekuulasuriya *et al.*, 1998, Aspinall *et al.*, 2002, Hill *et al.*, 2005, Lora *et al.*, 2007).

### **2.3 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de este parásito es indirecto. El huésped definitivo son los miembros de la familia Felidae, como el gato doméstico. Los animales domésticos y salvajes tales como borregos, cabras, bovinos, perros, caballos, delfines, osos, venados, conejos y el ser humano pueden actuar como huéspedes intermediarios. Las vías de infección son vertical o transplacentaria y horizontal, por ingestión de alimento o agua contaminada con ooquistes, o consumir quistes tisulares en carne o vísceras crudas procedentes de algún huésped infectado (Tenter *et al.*, 2000).

En el ciclo se pueden encontrar tres diferentes tipos de estados infectantes: taquizoitos (en grupos), bradizoitos (en quistes) y esporozoitos (en ooquistes) (Hill *et al.*, 2005).

Tanto en los felinos domésticos como en los salvajes (huéspedes definitivos) se producen los estados asexual y sexual, en el caso de este último se producen los ooquistes los cuales serán eliminados a través de las heces (Fayer, 1981).

El ciclo inicia cuando el gato ingiere un quiste y la pared de éste es disuelta por las enzimas proteolíticas del estómago y el intestino. Así los bradizoitos son liberados y penetran las células epiteliales del intestino delgado iniciando numerosas generaciones de ciclo sexual y asexual. A los organismos de esta etapa se les conoce como esquizontes, de ellos son liberados los merozoitos los cuales forman los gametos masculinos y femeninos. Después de que se lleva a cabo la fertilización comienza a formarse la pared del ooquiste alrededor del gameto fertilizado. Cuando los ooquistes están maduros son descargados en el interior del lumen intestinal por la ruptura de las células epiteliales del intestino. Los ooquistes no esporulados son eliminados a través de las heces. Algunos de los bradizoitos que se encuentran en la lámina propia del intestino se convierten en taquizoitos los cuales comienzan a diseminarse hasta infectar diversos tejidos (Dubey, 1994, Dubey, 2004a).

Los huéspedes intermediarios ya sean animales o el humano pueden infectarse con los ooquistes esporulados, con carne o vísceras infectadas con el parásito. Una vez ingeridos, ya sea que los bradizoitos sean liberados del quiste o los esporozoitos del ooquiste, penetran el epitelio intestinal y se transforman en taquizoitos los cuales se multiplican y se diseminan por vía sanguínea o linfática para infectar varios tejidos. Si el humano infectado es una mujer embarazada puede transmitir al protozoario al feto (Dubey, 1994, Dubey, 2004a).

## 2.4 Epidemiología

*T. gondii* es uno de los parásitos más comunes que infectan al ser humano y a los animales de sangre caliente. El parásito se ha encontrado distribuido en todo el mundo desde Alaska hasta Australia. Los estudios seroepidemiológicos realizados en diversas partes del mundo, han puesto en evidencia la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en diversos hospederos, tanto definitivos como intermediarios: oso negro, oso gris, ratones, minks, perros, coyotes, zorros, borregos, cabras, bovinos, cerdos y gatos, entre otros. Además la toxoplasmosis clínica y sub-clínica se ha informado en ciervos, animales ungulados, marsupiales, primates no humanos y mamíferos marinos, demostrando que el parásito tiene distribución mundial (Dubey, 1986, Dubey, 2004a, Hill *et al.*, 2005).

Con respecto a México, en Durango y Colima, se han identificado anticuerpos anti-*T. gondii* en zarigüeyas, ratas, ratones, ardillas, perros y gatos. En estas dos últimas especies, se logró el aislamiento del parásito (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2007, Dubey *et al.*, 2007, García-Márquez *et al.*, 2007, Dubey *et al.*, 2009). *T. gondii* también se ha aislado de aves de traspatio de los alrededores de la ciudad de México (Dubey *et al.*, 2004b). Además se han identificado anticuerpos anti-*T. gondii* en gatos domésticos de Guadalajara (Galván-Ramírez *et al.*, 1999) y de la Ciudad de México (Besné-Mérida *et al.*, 2008) y en ovinos de una zona tropical (Caballero-Ortega *et al.*, 2008a) y del estado de Colima, México (Caballero-Ortega *et al.*, 2008b), así como en conejos de 3 granjas mexicanas (Figueroa-Castillo *et al.*, 2006).

En relación a la población humana en México se han hecho algunos estudios serológicos. Galván Ramírez y colaboradores en el 2005 realizaron un estudio sobre la incidencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en mujeres con gestación de alto riesgo, encontrando un 35% de seroprevalencia de 350 muestras evaluadas del área ginecológica del Instituto del Seguro Social Mexicano. En ese mismo año, Galván Ramírez y otros encontraron un 29% de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* y 3.6% de anticuerpos IgM anti-*T. gondii* de 359 muestras provenientes de donadores de sangre de entre 17 y 57 años de edad en el estado de Jalisco. Por otro lado Vela-Amieva *et al.*, 2005 en un estudio piloto sobre infección congénita por *Toxoplasma gondii* obtuvieron dos casos positivos a anticuerpos IgG anti- *T. gondii* de 1003 muestras de sangre provenientes de recién nacidos en el Distrito federal. De acuerdo a este resultado sugieren una frecuencia de infección congénita con este parásito de aproximadamente 2 casos por cada 1000 bebés recién nacidos en la ciudad de México. Alvarado-Esquivel y colaboradores en el 2006 realizaron un estudio de seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en mujeres gestantes en un hospital público del estado de Durango. De 343 muestras evaluadas el 6.1% de mostró anticuerpos IgG anti-*T. gondii* y 0% para IgM (Galván Ramírez *et al.*, 1995, citado por Tenter *et al.*, 2005, Galván Ramírez *et al.*, 2005, Vela-Amieva *et al.*, 2005, Alvarado-Esquivel *et al.*, 2006).

## **2.5 Diagnóstico**

Para el diagnóstico de toxoplasmosis existen diferentes técnicas, como el Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia

indirecta (IFA), la inmunohistoquímica (IHQ), la histopatología, el aislamiento, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la microscopía electrónica de transmisión (MET).

Por medio de la histopatología se identifican lesiones como edema y necrosis focal en linfonodos con infiltrado inflamatorio de tipo neutrofílico en las áreas de necrosis, congestión y necrosis de las vellosidades intestinales, hepatitis, glomerulonefritis, hemorragias en miocardio, neumonía. En cerebro se puede llegar a observar edema perivascular, calcificaciones, hemorragias, necrosis y focos de microgliosis. La IHQ empleando anticuerpos específicos marcados, se utiliza para confirmar la presencia del parásito en los tejidos y descartar a otros protozoarios con morfología similar como es el caso de *Neospora caninum*. Por otro lado, se utilizan pruebas serológicas, como el ELISA, la IFA, pruebas de aglutinación y Western blot para la medición de anticuerpos IgM o IgG, los que permiten sospechar si la infección tiene curso agudo o crónico (Dubey, 1983, Dubey, 1986, Montoya 2002).

Más recientemente se han utilizado pruebas moleculares como la PCR, la cual es capaz de detectar la presencia de DNA del parásito en diferentes muestras biológicas como son tejido cerebral, sangre o líquido cefalorraquídeo entre otros. Sin embargo debido a que los signos clínicos de esta enfermedad son inespecíficos y no son suficientes para definir el diagnóstico, el aislamiento del protozooario y su caracterización molecular, demuestran la existencia del mismo. Desde 1960, la MET es uno de los métodos que se utilizan para observar ultraestructuralmente las características morfológicas de protozoarios aislados. Con esta herramienta se puede hacer la distinción ultraestructural de *T. gondii* con



respecto a otros protozoarios, como *Neospora caninum* (Cuadro 1) (Dubey, 1983, Dubey, 1986, Terra, *et al.*, 2004).

**Cuadro 1. Diferencias morfológicas y ultraestructurales entre *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*.**

Estadio	Especie	
	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Neospora caninum</i>
<b>Ooquistes</b>	Esférica a oval	Esférica a oval
	10 a 14µm de diámetro	11.7 a 11.3µm. Long. 1.04µm de diámetro
<b>Quistes</b>	Redondos a ovals, no septados y lisos Desde 5 -70µm de diámetro La pared mide <0.5µm aprox.	Redondos a ovals, no septados y contorno irregular, la pared granular espesa 17 -107µm largo y de 1.2, 1-4µm de espesor. La pared mide 0.5 a 4µm de espesor.
<b>Bradizoitos</b>	ovalados o "media luna" 2 x 6µm	ovalados o "media luna" 3-7 x 1-5µm
Membrana celular	1 capa	2 capas
Microtúbulos	22	22
Anillos apicales	2	1
Anillo conoide	1	1
Anillo polar	1	1
Micronemas	36-112	Abundantes
Roptries (usualmente electrodensos)	02 a 08	6 a 12
Compl.de Golgi	1	1
R.E.L.	1	1
R.E.R.	1	1
Núcleo	1	1
Nucleolo	1	1
Mitcondrias	1	1
Microporos	Comunes	De escasos a ausentes
<b>Taquizoitos</b>	ovalados o "media luna" 2 x 6µm	ovalados o "media luna" 3-7 x 1-5µm
Membrana celular	(-) a glicanos	(+) a glicanos. Sup rica en cisterna

(3 capas)	(-) a ConA	(+) a ConA
Microtúbulos	22	22
Anillos apicales	1	2
Anillo conoide	1	1
Anillo polar	1	1/c 1-3 mitocondrias
Micronemas	Pocos (19-38)	<150
Roptries	4-8 anteriores	8-12 anteriores al núcleo
( no electrodensos)	al núcleo	4-6 después del núcleo
Compl.de Golgi	1	1
R.E.L.	1	1
R.E.R.	1	1
Núcleo	1	1
Nucleolo	1	1
Microporos	Comunes	(-) animales ( <i>in vivo</i> ), (+) <i>in vitro</i>

Este cuadro se construyó a partir de las siguientes referencias: Sheffield *et al.*, 1968, Speer and Dubey, 1989, Barr *et al.*, 1991, Lindsay *et al.*, 1993, Dubey and Lindsay, 1996, Jardine, 1996, Dubey *et al.*, 1998a, Dubey *et al.*, 1998b.

## 2.6 Aislamientos

### ❖ En el huésped definitivo e intermediarios

Se han realizado diversos trabajos en diferentes partes del mundo en diferentes especies, como en gatos, aves de corral, delfines, nutrias, entre otros, en los cuales se ha logrado el aislamiento del parásito, a excepción de los bovinos y equinos en los cuales se han hecho pocos estudios y como consecuencia no se han obtenido aislamientos (Dubey, *et al.*, 2005; Cavalcante *et al.*, 2007, Dubey, *et al.*, 2007b,c, Sundar *et al.*, 2008).

### ❖ En ganado bovino

Debido a que se piensa que los bovinos son resistentes a la infección por *T. gondii*, la enfermedad, los problemas reproductivos y el impacto económico que tiene en la ganadería, han sido poco estudiados. Probablemente como

consecuencia se han realizado pocos aislamientos del parásito en este huésped. Desde la identificación de *Toxoplasma gondii* en 1908 hasta 1986 se realizaron diversos intentos para aislar a este protozoario, pero sólo se han obtenido 7 en diferentes partes del mundo (Cuadro 2) (Esteban-Redondo *et al.*, 1997, Dubey, 1986).

**Cuadro 2. Intentos de aislamiento y aislamientos de *Toxoplasma gondii* de tejidos de ganado infectado naturalmente**

<i>País</i>	<i>No. de muestras examinadas</i>	<i>No. de positivos (%)</i>	<b>Tejidos inspeccionados</b>
<b>Argentina</b>	304	74 (24.5)	Retina ☞
		597 (18.2)	Retina ☞
<b>Australia</b>	26	0	Cerebro y retina
<b>Brasil</b>	134	0	Carne, hígado, cerebro y diafragma
	99	0	
<b>Bulgaria</b>	18	0	No referido
<b>Colombia</b>	7	0	Cerebro
<b>Checoslovaquia</b>	85	8**(9.4)	Cerebro y diafragma ☞
	22	0	Cerebro
<b>Dinamarca</b>	30	0	Diafragma, hígado y bazo ☞
<b>Egipto</b>	30	0	Cerebro ☞
<b>República Federal de Alemania</b>	500	0	Diafragma, corazón, cerebro y ojos
	74	0	Diversos tejidos incluyendo 71 corazones
	170	0	Carne molida
	1260*	0	Carne molida
<b>Italia</b>	35	8 (22.8)	Retina ☞
<b>Japón</b>	104	1 (0.9)	Carne
	41	1 (2.4)	Diafragma ☞
<b>Nueva Zelanda</b>	80	0	Diafragma

<b>USA</b>	60	0	Diafragma
	50	0	Lomo de ternera
	100	0	Glándula mamaria
	350*	0	Mezcla de tejidos
<b>USSR</b>	126	0	Diafragma, hígado y bazo

\* Gatos alimentados con estos tejidos, todos los demás fueron inoculados en ratones.

\*\* 4 de cerebro, 2 de diafragma, 1 de diafragma y 1 de cerebro.

☞ Aislamientos efectuados.

Tomado de: Dubey J.P., A review of Toxoplasmosis in cattle, 1986, Vet Parasitol, 22:177-202

Para finales del siglo XX y el inicio del siglo XXI se informaron tres aislamientos de *T. gondii* en vacas. El primero de ellos se obtuvo en los Estados Unidos de América en 1992, del intestino de una vaca Shorthorn infectada naturalmente, la cual presentó títulos de anticuerpos para *T. gondii* de 1:1,600 por la prueba de aglutinación. Al aislamiento se le denominó CT-1 (Dubey, 1992).

Los otros dos aislamientos se lograron del encéfalo de dos fetos abortados, uno en Portugal y el otro en el estado de Washington, Estados Unidos. En estos casos se infectaron células Vero en las cuales se mantiene al parásito (Canada *et al.*, 2002).

## 2.7 Filogenética y diversidad biológica de *Toxoplasma gondii*

Actualmente existen diversas técnicas moleculares para clasificar cualquier microorganismo dentro de un grupo taxonómico. Estas prácticas se basan en el análisis y comparación de secuencias del DNA como las del espacio transcritor interno 1 (ITS1), del espacio intergénico (IGS) o del gen para RNA ribosomal entre organismos que ya estén agrupados en la *taxa* de interés. Estas regiones se utilizan porque están altamente conservadas en el genoma de los organismos vivos (Mugridge *et al.*, 1999, Fazaeli *et al.*, 2000, Gondim *et al.*, 2004).

Con este tipo de estudios se ha confirmado que *T. gondii* pertenece a la familia Sarcocystidae y phylum Apicomplexa, grupo del cual también forman parte *Neospora caninum* y *Hammondia* sp.

Debido a que *Toxoplasma* ha sido ampliamente estudiado existen en la actualidad gran cantidad de marcadores genéticos como son c22-8, c29-2, L358, *pki*, *sag2*, *btb2*, *gra6*, *sag3*,  $\beta$ tub, Apico, entre otros, que han ayudado en la caracterización de aislamientos de este protozooario obtenidos de diferentes partes del mundo a partir de diversos huéspedes intermediarios y definitivos (Su *et al.*, 2006, Dubey *et al.*, 2007b, Sundar *et al.*, 2008).

En diferentes estudios se ha comprobado la diversidad biológica de *T. gondii*, y se ha observado que existe variabilidad en la virulencia de los distintos aislamientos obtenidos hasta el momento. En estudios realizados en roedores, algunos aislamientos de *T. gondii* mostraron ser más virulentos que otros. Debido a esto las cepas de éste parásito han sido clasificadas dependiendo del daño y la rapidez con que causan lesiones, signología e inclusive la muerte de los ratones. Las cepas denominadas tipo I son las más virulentas (RH, VEL, ENT), las tipo II (PTG, ME49, DEG) y tipo III (NTE, VEG, CTG) son de baja virulencia. Hasta ahora se estima que el 95% de los aislamientos están dentro de esta clasificación y el 5% restante esta relacionado a cepas recombinantes. Las cepas GT1 de cabra y CT1 de vaca, aisladas de rumiantes en los trabajos realizados en Estados Unidos fueron clasificadas como cepas tipo I (Windeck *et al.*, 1996, Saeij *et al.*, 2005, Cavalcante *et al.*, 2007, Dubey *et al.*, 2007b, Su, *et al.*, 2006).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que en el intento para aislar a *Neospora caninum* a partir de cerebros de becerros, se aisló a *Toxoplasma gondii*, y como en México y en el mundo la toxoplasmosis en el ganado vacuno ha sido poco estudiada, como consecuencia se han realizado pocos intentos para el aislamiento y el mantenimiento de *Toxoplasma gondii* a partir de esta especie. Debido a esto, las cepas que circulan en México no han sido documentadas en las bases de datos taxonómicos mundiales, como la del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI). Esta información contribuye a demostrar la presencia de este parásito en los bovinos en México.

#### **4. HIPÓTESIS**

Al inocular ratones con tejido cerebral de becerros seropositivos a *Neospora caninum*, entonces se logrará el aislamiento del protozooario.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Aislar a *Neospora caninum* a partir de cerebros de becerros infectados naturalmente.

### **5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Confirmar el aislamiento del parásito por medio de inmunohistoquímica (IHQ) y la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y mantenerlo en pasajes en ratones, cultivo celular y congelado.
- 2.- Caracterizar genéticamente el aislamiento obtenido de *Toxoplasma gondii* y compararlo con otros aislamientos.



## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Clasificación del estudio**

Observacional, descriptivo, transversal y prospectivo.

### **6.2 Ubicación del estudio**

La recolección de muestras serológicas de los bovinos y cerebros de becerros se llevó a cabo en el Centro Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT) ubicado en el kilómetro 51.5 de la carretera libre México-Pachuca, en el estado de Hidalgo.

Los ensayos de laboratorio se realizaron en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM) y en el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

### **6.3. Estrategia general**

Inicialmente con el propósito de aislar a *Neospora caninum* a partir de cerebros de becerros infectados naturalmente, se seleccionaron 294 vacas Holstein en el último tercio de la gestación y a 4 becerros pre-calostrados nacidos de estas vacas a los cuales se les tomó muestra sanguínea por veno-punción para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* por el método de ELISA. También se obtuvo un aborto procedente de estas madres, al cual no se le tomó muestra de sangre. Durante este muestreo, se obtuvo una becerro recién nacida

clínicamente sana, seronegativa a *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* pero nacida de una madre seropositiva a *T. gondii*. A los becerros se les practicó la eutanasia por medio del método físico-eléctrico (NOM-033-ZOO-1995), utilizando electrodos y se realizaron las necropsias correspondientes para obtener el cerebro lo más higiénicamente posible. Muestras de cerebro se fijaron en formalina al 10%, se trabajaron por el método histológico de rutina, se tiñeron con Hematoxilina y Eosina y se evaluaron mediante un microscopio fotónico.

#### **6.4. ELISA para los bovinos.**

Se utilizó el juego de reactivos CIVEST Bovis *Neospora*, marca HIPRA, Barcelona, España. Se siguieron los pasos según el productor.

En una placa limpia se colocaron 200  $\mu$ L de solución de dilución de muestras en cada pozo para que los sueros estuvieran a una dilución 1:100. En la placa forrada con el antígeno se agregaron 50  $\mu$ L de los testigos (positivos y negativos) en los pozos correspondientes. Después se agregaron en los pozos restantes 50  $\mu$ L de la dilución de los diferentes sueros. Se mezclaron los contenidos dentro de cada pozo y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda manteniendo tapada la placa. Con un movimiento rápido se vaciaron los pozos, posteriormente se llenaron con 300  $\mu$ L de solución de lavado diluida 1:10 con agua destilada, evitando la formación de burbujas, agitando suavemente la microplaca y nuevamente se vaciaron los pozos. Este procedimiento se repitió dos veces más evitando la contaminación de los pozos. Después se colocaron 50  $\mu$ L del conjugado dentro de cada pozo y se incubó la

microplaca por 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados como se describió anteriormente. Luego se agregaron 50 µL del cromógeno previamente temperado dentro de cada pozo, permaneciendo la placa tapada y en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 ± 5 minutos. Una vez obtenida la reacción colorimétrica, se añadió 50 µL de solución de paro previamente temperada a cada pozo y se realizó la lectura en un lector de ELISA (Bio-tek) empleando un filtro de 405 nm. La diferencia entre el promedio de la densidad óptica (DO) de los testigos negativos y positivos debe ser ≥ 0.3. Para el cálculo de los resultados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Valor (\%)} = \frac{\text{DO}_{\text{muestras}} - \text{DO}_{\text{neg}}}{\text{DO}_{\text{pos}} - \text{DO}_{\text{neg}}} \times 100$$

Donde:

DO<sub>muestras</sub>: Densidad óptica de las muestras (sueros).

DO<sub>neg</sub>: Promedio de la densidad óptica de controles negativos.

DO<sub>pos</sub>: Promedio de la densidad óptica de controles positivos.

El criterio de interpretación de la lectura fue la siguiente:

VALOR	≤6%	>6-≤10%	>10%
INTERPRETACIÓN	Negativo	Sospechoso	Positivo

### **6.5. Método humanitario de sacrificio (Método físico-eléctrico) en los becerros**

Los electrodos se colocaron sobre ambos lados de la cabeza en el vértice de un ángulo recto formado por una línea vertical que parte de la base de la oreja a una línea horizontal que sale del borde superior del morro. La intensidad de la corriente eléctrica fue 240 Volts y 2 amperes (De Aluja y col., 2002).

### **6.6. Apertura de la cavidad craneana (extracción del encéfalo)**

El procedimiento se llevó a cabo en la sala de necropsias del CAIT.

Se desprendió la cabeza a nivel de la articulación occipitoatlantoidea, se separó la piel y músculos del cráneo para poder cortar los huesos con mayor facilidad. Antes de realizar la extracción del encéfalo, la superficie del cráneo fue limpiada con yodo y la extracción se realizó cercana a un mechero. Los cortes se realizaron con equipo desinfectado previamente. Los cortes se dirigieron de los límites laterales del agujero occipital hasta la cara interna de las apófisis corneales y de allí a los agujeros supraorbitarios, uniendo los dos por medio de otro a través del hueso frontal. Una vez efectuados los cortes, se levantó la parte desprendida de los huesos para exponer el encéfalo. Para extraerlo, se cortó la dura madre y levantando la cabeza de adelante hacia atrás se desprendió la masa encefálica junto con la hipófisis (De Aluja y col, 2002).

### **6.7. Obtención y toma de muestras de los cerebros**

1.- Se realizó un corte longitudinal para separar los dos hemisferios cerebrales, una de las partes se colocó en un frasco estéril previamente identificado con formalina al 10%, y se dejó fijando 48 horas para ser procesado y teñido con Hematoxilina y Eosina (H&E) para su evaluación histopatológica en un microscopio óptico de luz. Los tejidos que mostraron lesiones asociadas a *Neospora caninum* o a *Toxoplasma gondii* como son focos de necrosis y microgliosis, encefalitis linfoplasmocitaria y degeneración neuronal, se les realizó la técnica de inmunohistoquímica para corroborar la presencia del parásito según Morales y colaboradores en el 2001.

2.- La otra mitad del cerebro se colocó en un frasco que contenía solución buferada fosfatada (PBS) estéril en presencia de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina 10,000 UI/mL) inmediatamente después de su extracción, y se mantuvo a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio (entre 12 y 24 horas). De este hemisferio cerebral se escogieron tres muestras al azar de aproximadamente 10 g de tejido, para hacer un macerado bajo una campana de flujo laminar vertical de bioseguridad tipo II. Las muestras de encéfalo se colocaron sobre una caja de Petri estéril. Con una pipeta se tomaron 2 mL de PBS estéril, se agregaron a los tejidos; y con el émbolo de una jeringa se maceró perfectamente para posteriormente ser inoculado en los ratones Balb/c (Yamane *et al.*, 1998, Koyama *et al.*, 2001).

## **6.8. Animales de laboratorio**

Se utilizaron en total 22 ratones Balb/c, hembras, de 4 semanas de edad, a las cuales se les administró (2.5 mg/animal de metilprednisona (MPA) por vía IP el día de la inoculación (Collantes – Fernández *et al.*, 2004).

### ❖ Grupo experimental

Una vez que los ratones recibieron la inyección para inmunosupresión fueron inoculadas 3 ratonas por cada porción de cerebro, como se indica en el Cuadro 3. Uno de los roedores fue inoculado por vía SC con 200 µL del macerado, otro por vía IP con 400 µL y el restante por ambas vías, con la dosis correspondiente para cada vía (Walsh *et al.*, 2000, Koyama *et al.*, 2001, Vianna *et al.*, 2005, Yamane *et al.*, 1997, Vianna *et al.*, 2005).

**Cuadro 3. Distribución del total de ratones utilizados en el trabajo.**

Grupo	Becerro	Ratones inoculados por porción de cerebro de becerro conseguido	Ratones pases por becerro	Observaciones
1	276♀	3	3	2 ratones tomados de los testigos de este grupo 1 ratón nuevo
	276♂	3	0	
	238	3	0	
	211	3	0	
		<b>Testigos 3</b> Luego solo quedo 1 por que se utilizaron 2 para los pases		
	134	3	0	

2		<b>Testigos 3</b>		
---	--	-------------------	--	--

❖ **Grupo testigo (sólo para la evaluación histológica)**

Se formaron 2 grupos de 3 ratones que fueron utilizados como testigos (como se indica en el cuadro, luego quedaron solo 4 ratones testigo). Cada una de las ratonas fue inoculada con un placebo por vía subcutánea, otra por vía intraperitoneal y el restante por ambas vías (Yamane *et al.*, 1997, Vianna *et al.*, 2005).

**6.9 Muestreo serológico de las ratonas**

La obtención de las muestras de sangre fue por el seno orbital del ojo. Los sueros se mantuvieron a -20°C hasta que se realizó la prueba del ELISA. Los muestreos se realizaron los días 1 (previo a la inoculación, para que estas muestras fueran los testigos negativos de cada ratón) y 8, 15, 22 y 29 post-inoculación. El ELISA se realizó una vez que se terminó el muestreo serológico (Yun-Kyu Park, 1999).

Los roedores que murieron antes de los tiempos establecidos fueron manejados y procesados de la misma forma que a los que se les practicó la eutanasia.

El método humanitario de sacrificio para los ratones fue por desnucamiento (NOM-062-ZOO-1999).

## **6.10 ELISA de los ratones para *Neospora caninum***

El método utilizado fue el mismo que se utilizó en el caso de los bovinos, con excepción del conjugado, el cual se sustituyó utilizando uno para IgG de ratón.

## **6.11 ELISA de los ratones para *Toxoplasma gondii***

A cada pozo se le agregó 100 µL de extracto crudo a una concentración de 2 µg/mL en amortiguador de carbonatos pH 9.6, 24 horas en refrigeración (4°C). Después se adicionaron 100µL de los testigos (positivos y negativos) en los pozos correspondientes, se tapó la placa y se incubó 24 hrs en refrigeración. Una vez pasado este tiempo con un movimiento rápido se vaciaron los pozos, posteriormente se colocaron 200 µL de PBS-Tween-20 por cinco minutos. Este procedimiento se repitió dos veces más. Por último para completar el lavado se agregaron 200 µL de PBS por cinco minutos. Este procedimiento se repitió después de cada incubación. Para realizar el bloqueo de la placa se utilizó leche descremada al 5% en PBS-Tween-20. Se colocaron 200 µL por pozo de esta solución. Una vez adicionada a toda la placa, esta se tapó y se dejó incubando 30 minutos a 37°C. Los sueros se trabajaron a una dilución 1:250 para el ensayo de IgG y 1:50 para el ensayo de IgM colocando 100 µL por muestra y por duplicado en los pozos correspondientes de las microplacas. Las placas se incubaron 2 hr a 37°C. Después se procedió a la incubación de los conjugados (Anticuerpos marcados con peroxidasa). El conjugado de IgM marcado con peroxidasa hecho en cabra <sup>SIGMA ALDRICH A8786</sup> se maneja a una dilución 1:20000, y el conjugado de IgG marcado con peroxidasa hecho en cabra <sup>SIGMA ALDRICH A0168</sup> se utilizó a dilución 1:5000.



En cada pozo se colocaron 100  $\mu$ L del conjugado correspondiente, se cubrió la placa y se incubó 2 hr a 37°C. Después se adicionó el sustrato y el cromógeno, el cuál está formado por 50% de ácido cítrico al 0.1M más 50% de citrato de sodio al 0.1M, con 4 mg de cromógeno (ofenylenediamine) y 4  $\mu$ L de agua oxigenada como catalizador, por cada 10 mL de la solución. Luego se agregaron 100  $\mu$ L de la solución anterior dentro de cada pozo, permaneciendo la placa tapada y en la oscuridad a temperatura ambiente hasta obtener la reacción colorimétrica. Una vez obtenida ésta reacción se añadió 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2N a cada pozo y se realizó la lectura en un lector de ELISA Modulus microplate, Turner BioSystems empleando un filtro de 490 nm.

Cabe mencionar que en el caso de estos ensayos los resultados obtenidos no se tomaron como herramienta diagnóstica, sino como un seguimiento de seroconversión, por lo que los resultados se mostrarán como cinéticas (de los anticuerpos) para cada ratón inoculado.

## **6.12 Obtención de líquido peritoneal de los ratones**

El lavado peritoneal se realizó cuando los roedores vivos presentaron signología. A cada ratona se le administró 1 mL de PBS estéril por vía intraperitoneal, una vez hecho esto, el roedor fue colocado en posición vertical con la cabeza hacia arriba, se le introdujo una aguja en la cavidad abdominal y se dejó gotear para obtener líquido peritoneal y colocarlo en un tubo estéril. Con los animales muertos se siguió el mismo procedimiento a excepción de que a estos se les introdujo 10 mL de PBS estéril. De este, se tomó una gota para ser observado

al microscopio de luz. El líquido peritoneal que presentó taquizoitos se dividió en varias porciones. Una de las partes se centrifugó durante 7 minutos a 3,000 rpm, el sobrenadante se desechó y el botón obtenido se colocó en un portaobjetos y se realizó un extendido, el cual se secó al aire y se tiñó con Giemsa, para posteriormente ser evaluado al microscopio y detectar la presencia de taquizoitos. Otra porción del líquido peritoneal fue procesado por IHQ con el complejo avidina-biotina, otra parte se utilizó para la PCR y determinar si los taquizoitos correspondían a *Neospora caninum* o a *Toxoplasma gondii*. Otra parte se usó para inocular a dos ratonas más, una inmunosuprimida y la otra no. Otra porción se inoculó en células Vero y por último otra porción se guardó en congelación (Liddell *et al.*, 1999, Koyama *et al.*, 2001).

### **6.13 Necropsia de los roedores**

Después de la eutanasia se llevó a cabo la necropsia de los ratones para obtener órganos como cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñones, bazo y mesenterio. Las muestras de tejidos y la mitad del cerebro fueron procesados para estudio histopatológico de la misma forma que en el caso de los cerebros de los becerros, incluyendo la evaluación por medio de la técnica de IHQ y PCR.

### **6.14 Mantenimiento de parásitos aislados**

- ❖ *Mantenimiento en roedores*

Para mantener al protozooario se utilizaron las muestras de líquido peritoneal recolectadas y se inocularon (pases) en 3 roedores por vía IP. A estos se les aplicó la eutanasia a los mismos tiempos que para los animales anteriores y las muestras obtenidas de líquido peritoneal y órganos fueron procesadas de la misma forma que las primeras muestras para evaluación citológica e histológica con el fin comprobar la presencia del parásito (Yamane *et al.*, 1997, Vianna *et al.*, 2005, Cuddon *et al.*, 1992).

#### ❖ *Mantenimiento en cultivo celular*

Este procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar vertical, bioseguridad tipo II.

Se inocularon 100 µL del líquido peritoneal con taquizoitos en una caja de cultivo de 25 cm.<sup>2</sup> con células Vero con medio RPMI 1640 suplementado con piruvato de sodio (0.20g.), antibióticos (penicilina G sódica 1000000 UI/1L., estreptomicina 1mL/1L), L-glutamina Mm (16 mL./1L), β-mercaptoetanol 50mM (1 mL/1L), aminoácidos no esenciales 100X (10 mL/1L), anfotericina B 100X (10 mL/1L), tilosina 1000X (1mL/1L), bicarbonato de sodio grado cultivo (2g/1L) y suero fetal bovino (SFB) al 10%. La caja de cultivo se mantuvo en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El cultivo se examinó con un microscopio invertido para observar la presencia del parásito. El medio de cultivo se cambió 3 veces a la semana.

### **6.15 Técnica de inmunohistoquímica para *Neospora caninum* en tejidos de los ratones**

Se utilizó la técnica del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (CAB-P). Los tejidos se colocaron en laminillas tratadas previamente con Poli-L-lisina <sup>(Sigma Chemical Company. P.O. Box 14508 St. Louis Missouri. USA 63178-0016)</sup> al 3% diluida en acetona. Posteriormente se desparafinaron por una hora a 60°C y se realizaron dos lavados con xilol por 10 minutos cada uno. Para inhibir la peroxidasa endógena, los tejidos se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 30% <sup>(JT Backer Catalogo 218601)</sup> y metanol absoluto a una relación de 1:8, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos fueron rehidratados con etanol a diferentes concentraciones (96%, 80% y 70%) y agua destilada, haciendo lavados de 3 minutos en cada uno.

Para la recuperación de antígenos, los tejidos se trataron con Proteasa al 0.1% por 10 minutos a 37°C e inmediatamente se realizó un lavado con agua destilada y amortiguador carbonatos (4.771g/L de bicarbonato de sodio JT Bater <sup>No. 3506-01</sup> y 1.526 de carbonato de sodio <sup>No.3602-01</sup>), pH 9,4 por 5 minutos. Para bloquear la avidina y la biotina endógenas de los tejidos, se utilizó solución bloqueadora de avidina y biotina <sup>Invitrogen 00-4303</sup>.

La cantidad a utilizar para cada una de ellas fue de 20 µL incubándose a 37°C en cámara húmeda por 15 minutos, entre cada solución se realizó un lavado con amortiguador de carbonatos, pH 9.4 por 5 minutos.

Para bloquear la adherencia no específica de los anticuerpos primario y secundario, se utilizó suero de conejo no inmune <sup>Sigma-Aldrich P.O. Box 14508 St. Louis Missouri. 63178 USA)</sup> al 5%, aplicando 50 µL sobre los tejidos, dejándolo incubar por 20 minutos en cámara húmeda a 37°C. En este caso sólo se retiró el exceso sin realizar lavados. Se aplicaron 50 µL de anticuerpo primario policlonal <sup>VMRD Inc P.O. Box Pullman, W.A. 99163 USA.</sup> anti-*Neospora caninum* hecho en cabra diluido 1/1000 con amortiguador Tris 0.05

M, pH 7.6. Las laminillas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Después de la incubación, los tejidos fueron sometidos a un lavado con amortiguador de carbonatos, pH 9.4 por 5 minutos.

Se aplicaron 50 µL de anticuerpo secundario biotinilado hecho en conejo anti-cabra BIOCARE MEDICAL 2940 Camino Diablo, Suite 300 Walmat Creek, C.A. 94597.

Las laminillas se incubaron durante 20 minutos en cámara húmeda a 37°C. Transcurrido ese tiempo se realizó un lavado con amortiguador de carbonatos, pH 9.4 por 5 minutos.

Se aplicó 20 µL de estreptoavidina y se dejó incubar durante 20 minutos en cámara húmeda a 37°C, también se realizó un lavado con amortiguador de carbonatos, pH 9.4 por 5 minutos. Para determinar la presencia o ausencia de antígeno en los tejidos se utilizó un reactivo comercial de revelado Invitrogen 95-6543 que consta de cromógeno (aminoetilcarbazol) amortiguador para la reacción y peróxido de hidrógeno al 0.6%, el cual se preparó colocando una gota de cada uno de los reactivos en un mililitro de agua destilada. A cada tejido se le aplicó 50 µL de esta mezcla durante 5 a 6 minutos.

Para detener la reacción, las laminillas se colocaron en agua destilada durante 5 minutos.

Para contrastar la coloración obtenida con el cromógeno se utilizó hematoxilina de Meyer aplicando 40 µL durante 4 minutos. Finalmente a los tejidos se les colocó un cubreobjetos y se selló con resina acuosa.

Los tejidos se consideraron inmunopositivos al detectar quistes o taquizoitos intra o extralesionales de color café rojizo.

## **6.16 Técnica de inmunohistoquímica para *Toxoplasma gondii***

Se utilizó la misma metodología que en el caso de la detección de *Neospora caninum*, con excepción de que se aplicó un anticuerpo primario policlonal anti-*Toxoplasma gondii* hecho en cabra diluido 1/300 (VMRD Inc P.O. Box Pullman, W.A.

99163 USA)

## **6.17 Ultraestructura de los taquizoitos**

Como estudio complementario, una muestra de líquido peritoneal con taquizoitos se envió a la Unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, para su evaluación mediante un microscopio electrónico de transmisión (MET).

## **6.18 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Neospora caninum***

### *a) Extracción de DNA*

El ADN genómico se extrajo a partir del producto obtenido del centrifugado del líquido peritoneal y del macerado de los diferentes tejidos obtenidos de los ratones muertos. Se utilizó un reactivo comercial Q/Amp DNA miniKit siguiendo las indicaciones del proveedor.

Después se agregaron 30 µL de solución de proteinasa K y la mezcla se incubó por 50 minutos a 68°C en termoblock. Se colocaron 200 µL de etanol y la

mezcla fue transferida al Q/Aamp Spin Column del reactivo, el resto de los pasos se realizaron de acuerdo a lo sugerido por el proveedor.

#### b) *Desarrollo de la PCR*

Con base en el espaciador interno transcrito 1 (its1) del DNA ribosomal de *Neospora caninum*, se utilizaron los iniciadores pN1 (5'-CTCCTTCGGAGAGGGGTA-3') y pN2 (5'-TCTTCCCTCAA CGCTAT C-3'), que amplifica un fragmento de 279 pares de bases. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: la mezcla maestra de 50  $\mu$ L contuvo 5  $\mu$ L de DNA, 21  $\mu$ L de agua estéril, 5  $\mu$ L de solución amortiguadora Taq (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (10x), 1  $\mu$ L dNTP's mix (10mM), 5  $\mu$ L de cada iniciador (10mM), 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25Mm), 1  $\mu$ L Taq DNA polimerasa (5U/ $\mu$ L.) y 5  $\mu$ L de solución *Enhancer*<sup>Fermentas LIFE SCIENCES Pure Extreme</sup>. La PCR inicia con un ciclo de desnaturalización de 94°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 10 minutos. Se tomaron 15 $\mu$ L del producto amplificado que fueron cargados en un gel de agarosa al 2%, corrido por electroforesis horizontal a 120 volts, teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz ultravioleta.

### **6.19 PCR para *Toxoplasma gondii***

#### a) *Extracción de DNA*

El ADN genómico se extrajo a partir del producto obtenido del centrifugado del líquido peritoneal del segundo ratón infectado

Primero se centrifugaron los tubos ependorff con líquido peritoneal para obtener un botón. Una vez eliminado el sobrenadante se agregaron 1.5 mL de solución de lisis (TRIS, SDS, aminomentano, ácido etilenediaminetetraacético) a cada uno de ellos y se dejaron incubar a 65°C por una hora. Pasado el tiempo se agregaron 15 µL de solución de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL, se homogeneizaron y se dejaron incubando toda la noche a 55°C. Al día siguiente se vertió el contenido de los tubos ependorff a tubos de 15mL y se agregó a cada uno de ellos 1mL de solución de precipitación de proteínas (acetato de amonio), se mezclaron y se centrifugaron los tubos a 3000rpm por 10 minutos. Después, el sobrenadante se recuperó y se pasó a otros tubos de 15 mL a los cuales se les agregó 2 mL de isopropanol y se mezcló lentamente para ayudar a precipitar el DNA. Esta mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se deshechó el sobrenadante. Luego se agregaron 2 mL de etanol a cada tubo y se centrifugaron a 3500 rpm por 8 minutos, una vez cumplido este tiempo, se deshechó el etanol y los residuos se dejaron evaporar. Una vez que ya no quedo etanol, a cada tubo se le agregó 100 µL de solución de hidratación.

#### b) *Cuantificación de DNA*

Se realizó una dilución 1:125 del DNA extraído y se realizó la cuantificación en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a una absorbancia de 260 nm.

#### c) *Desarrollo de la PCR*

Se utilizaron cinco genes: *b1*, *gra6*, *sag3*, *sag2* y *βtub*.



Del gen *gra6* se amplificó un fragmento de 344pb con los iniciadores F1 (5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT-3'), y R1x (5'-CGCCGAAGAGTTGACATAG-3'). Del gen *sag3* se amplificó un fragmento de 311pb con los iniciadores S1 (5'-CAACTCTCACCATTCACCC-3') y S1 (5'-GCGCGTTGTTAGACAAGACA3'). Del gen *sag2* se amplificó un fragmento de 546pb con los iniciadores Fa (5'-ACCCATCTGCGAAGAAAACG-3') y Ra (5'-ATTTGACACGCGGGAGCAC-3'). Del gen de *βtub* se amplificó un fragmento de 411pb con los iniciadores Btb-F (5'-GAGGTCATCTCGGACGAACA-3') y Btb-R (5'-TTGTAGGAACACCCGGACGC-3') y por último del gen *b1* se amplificó un fragmento de 362pb (TM2-CTGCTGGTGCGACGGGAGTG y TM3-CAGGAGTTGGATTTTGTAGA) (Su *et al.*, 2006, Rico, 2005).

Las condiciones del PCR fueron las siguientes: la mezcla maestra de 50 µL contenía 0.97 µL. de DNA, 30 µL. de agua estéril, 5 µL de Buffer (10x), 1 µL dNTP's mix (10mM), 3 µL. de cada iniciador (10mM), 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25Mm), 0.5 µL Taq DNA polimerasa y 1.5 µL de DMSO al 5%. La PCR inicio con un ciclo de desnaturalización de 95°C por tres minutos y 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55 a 67°C (Cuadro 4) durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 10 minutos, en un termociclador Applied Biosystems.

Para los cinco genes *b1*, *sag2*, *gra6*, *sag3* y *βtub*, el orden de las muestras fue el siguiente: En el carril No.1 se colocó el marcador de peso molecular, en el carril No.2 se aplicó una muestras de líquido peritoneal con 5 millones de taquizoitos, en el carril No.3 se utilizó muestras de lavado peritoneal con 200 millones de

taquizoitos, el carril No.4 es un testigo positivo (cepa RH), en el carril No.5 otro testigo positivo (cepa Wiktor) y el carril No.6 es el testigo negativo (agua).

#### **Cuadro 4. Temperaturas para la PCR de cada uno de los genes utilizados**

<i>b1</i>	<i>gra6</i>	<i>sag3</i>	<i>Btub</i>	<i>sag2</i>
55°C	60°C	60°C	60°C	67°C

En un gel de agarosa al 1% con 50µL de bromuro de etidio, se cargaron 20µL del producto amplificado, corridos por electroforesis horizontal a 120 Volts por 40 minutos. Una vez cumplido este tiempo el gel fue observado bajo luz ultravioleta. El marcador de tamaño utilizado fue de 100pb DNA de Invitrogen Ladder, 250vg (1.0vg/vl).

#### **6.20 Genotipificación mediante RFLP y secuenciación a partir del producto del PCR obtenido de *Toxoplasma gondii*.**

La purificación del DNA se realizó con el juego de reactivos QIAGEN, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Las condiciones de digestión para la PCR-RFLP fueron las siguientes: Se utilizaron los productos de la PCR de los genes *sag2* y *βtub* amplificados de la muestra de líquido peritoneal obtenido del segundo pase en ratón. La mezcla maestra de 50 µL contuvo 20 µL. de DNA, 18 µL. de agua estéril, 10 µL de

amortiguador B y 2  $\mu$ L de Taq1 (Roche), para digerir *sag2* y para  *$\beta$ tub* BSiE1 (Roche). La mezcla se colocó en el termoblock a 65°C toda la noche.

Se utilizó la cepa RH como testigo positivo del genotipo I.

Los fragmentos digeridos fueron separados en un gel de agarosa al 3% con 75  $\mu$ L de bromuro de etidio, se cargaron 40 $\mu$ L del producto amplificado corridos por electroforesis horizontal a 110 Volts por 50 minutos. Una vez cumplido este tiempo el gel fue observado bajo luz ultravioleta. El marcador de tamaño utilizado fue phiX174 DNA-Hae III fragments, 100 appl (0.1 vg/vl) de Invitrogen (Su, *et al.*, 2006).

### **6.21 Secuenciación del producto de PCR de los genes *sag2* y *gra6* de *Toxoplasma gondii***

El DNA obtenido se mandó a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, ubicado en Cuernavaca, Morelos.

Las secuencias obtenidas para cada gen se analizaron con el programa Sequencher 4.5 y ClustalW2 y se compararon con las secuencias registradas en el *GenBank* de las cepas GT1, ME49 y VEG las cuales representan a genotipos I, II y III de *T. gondii* respectivamente.

### **6.22 Comparación de resultados**

Se compararon las secuencias del aislamiento obtenido con las secuencias de las cepas GT1, ME49 y VEG registradas en el *GenBank*, siendo cada una de estas cepas, ejemplos de genotipos I, II y III de *T. gondii* respectivamente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. ELISA del muestreo serológico realizado a vacas gestantes

De las 294 vacas 147 (50%) fueron positivas a *Neospora caninum*, 11 (3.74%), sospechosas y 136 (46.26%) negativas. Los resultados por establo, se indican a continuación en el Cuadro 5.

**CUADRO 5.** Resultados del ELISA para *Neospora caninum* de los establos muestreados.

	<b>POSITIVAS</b>	<b>SOSPECHOSAS</b>	<b>NEGATIVAS</b>	
ESTABLO 1	15	0	12	
ESTABLO 2	26	1	11	
ESTABLO 3	52	0	1	
ESTABLO 4	8	1	6	
ESTABLO 5	13	2	48	
ESTABLO 6	4	0	10	
ESTABLO 7	1	1	5	
ESTABLO 8	5	0	7	
ESTABLO 9	12	3	34	
ESTABLO 10	11	3	6	
	147	11	136	Total 294 vacas

### 7.2. ELISA de los sueros de los becerros

De los cuatro sueros procesados sólo uno fue positivo (Valor >10%) a anticuerpos anti- *Neospora caninum* al igual que el suero de la madre. Figura 1

Del aborto no se obtuvo muestra de sangre, pero éste provino de una madre seropositiva a *Neospora caninum*.

### **7.3. ELISA de los ratones para *Neospora caninum***

Los resultados del ensayo no pudieron ser válidos debido a que la técnica utilizada no cumplió con los criterios de validación como son: el cociente del testigo positivo/ testigo negativo debe ser mayor a 5.0 y en este ensayo fue de 1.009, además el valor del testigo positivo debe ser mayor a 0.9 y para esta prueba fue de 0.211.

### **7.4. ELISA para IgG contra *Toxoplasma gondii* de los ratones inoculados con los diferentes cerebros de becerros obtenidos**

Durante la realización de los ensayos hubo muestras que se fueron acabando, debido a que la cantidad de suero obtenido de cada ratón fue variable, por lo que, en las gráficas se observa variación en el número de muestreos para cada ratón.

De acuerdo a la cinética obtenida por los roedores, dos de ellos identificados como Taq1 y Taq2 mostraron una cinética que iba en aumento, estos ratones fueron los que se infectaron con taquizoitos y murieron a la semana de haber sido inoculados, uno con macerado de cerebro de la becerro y otro con el líquido peritoneal obtenido del primer ratón muerto. Un ratón más, identificado como 211-1 mostró una cinética sugerente de aumento, sin embargo este animal fue inoculado con el cerebro de un becerro proveniente de madre seropositiva a *Neospora caninum*. Figuras 2a, 2 b

### **7.5. Estudio histológico del tejido cerebral de los becerros y el aborto**

Macroscópicamente no hubo evidencia de lesión o alteración del tejido cerebral en los 5 animales. En la evaluación microscópica del tejido cerebral de cada uno de los animales, no se observaron cambios histológicos que sugirieran que estos cursaron con alguna patología de tipo infeccioso, incluyendo a la causada por *Toxoplasma gondii* o por *Neospora caninum*. Debido a que no se encontraron lesiones características producidas por protozoarios, ninguno de los tejidos se sometió a la técnica de inmunohistoquímica. Figura 3

### **7.6. Datos clínicos de los 18 ratones inoculados con los diferentes cerebros de bovinos y líquido peritoneal de ratones con taquizoitos.**

Del total de estos ratones solo dos de ellos (ambos del primer grupo: un ratón inoculado con macerado de cerebro y el otro fue un ratón pase) mostraron signos clínicos como pelo hirsuto, depresión, la respiración y la frecuencia cardíaca se apreciaban moderadamente incrementadas ya que el tórax presentaba movimientos acelerados, Figura 4. Ambas ratonas murieron en menos de una semana post-inoculación. La primera murió al 8<sup>o</sup> día post-inoculación y la segunda al 7<sup>o</sup> día post-inoculación.

El resto de los roedores no mostró ningún signo clínico, y en el estudio histológico no hubo evidencia de que alguno de ellos cursara con algún tipo de patología.

### **7.7. Hallazgos patológicos de la ratona muerta a los ocho días P.I (Primer roedor muerto)**

Macroscópicamente el pulmón se observó con congestión discreta multifocal. El hígado exhibía color café-amarillo claro con distribución difusa (pálido). El bazo presentaba congestión de moderada a severa difusa.

Microscópicamente, el hígado presentaba pequeñas áreas de necrosis con infiltrado de linfocitos y células plasmáticas periportal y en parénquima multifocalmente, Figura 5. La serosa del bazo mostraba infiltrado inflamatorio en cantidad moderada constituido por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con citoplasma espumoso, además se observaron múltiples figuras parasitarias compatibles con protozoarios, Figura 6. En el mesenterio se observaron linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con citoplasma espumoso en cantidad abundante con múltiples estructuras parasitarias compatibles con protozoarios, Figura 7.

En el resto de los órganos revisados no hubo evidencia de alteración histológica. En los órganos y tejidos evaluados de las otras dos ratones, no se encontró alteración a nivel macroscópico ni microscópico que sugiriese que hubiesen cursado con alguna patología de tipo infeccioso incluyendo la producida por *Toxoplasma gondii*.

### **7.8. Análisis del líquido peritoneal de la ratona muerta a los ocho días P.I. utilizando la tinción de Giemsa (Primer roedor muerto)**



Se identificaron figuras parasitarias en forma de “media luna” (taquizoitos) de entre 7µm y 7.3µm de longitud, color rosa claro (positividad a la tinción), algunas de ellas mostrando un núcleo céntrico, Figura 8.

### **7.9. Estudio inmunohistoquímico para *T. gondii* y *N. caninum* del líquido peritoneal y tejidos obtenidos de la ratona muerta a los ocho días P.I. (Primer roedor muerto)**

Los taquizoitos del líquido peritoneal y los quistes y taquizoitos intra y extralesionales presentes en el hígado, mesenterio y bazo fueron positivos para *T. gondii* y negativos para *N. caninum*, Figuras 9 a 12.

### **7.10. Ultraestructura de los taquizoitos obtenidos**

Los taquizoitos observados miden 4.5 micras de largo por 1.98 de diámetro. La membrana plasmática se observa electrodensa y en su extremo anterior presenta una estructura especializada llamada conoide. En el interior, por debajo del conoide, se aprecian escasos micronemas electrodensos, así como roptries de tipo laberintina (con una base ovalada electrolúcida y un extremo electrodenso), en promedio son de 2 a 4 por taquizoito. Anterior al núcleo se ubican algunos gránulos densos, los cuales son más numerosos en el extremo anterior. El núcleo es central y presenta la heterocromatina normal y desplazada hacia la periferia, Figuras 13 y 14.

Las características ultraestructurales de las roptries de tipo laberintina, la ubicación de los micronemas y los gránulos densos escasos, son criterios

primordiales para identificar a *Toxoplasma gondii* y diferenciarlo de otros apicomplexas. (Speer *et al.*, 1999)

### **7.11. Inoculación en 3 ratonas con líquido peritoneal proveniente de la primera ratona infectada y muerta a los 8 días P.I.**

Al sexto día, una de las ratonas del primer grupo inoculado presentó depresión y pelo hirsuto. Se hizo lavado peritoneal, encontrándose taquizoitos, Figura 15. Al día siguiente murió, realizando de igual forma que en el primer roedor muerto, necropsia y lavado peritoneal.

### **7.12. Hallazgos patológicos de la segunda ratona muerta a los 7 días P.I.**

Con los tejidos obtenidos en la necropsia, se realizó evaluación histológica, IHQ y PCR de la misma forma que para la primera ratona.

De éste animal se obtuvieron muestras de corazón, pulmón, bazo, mesenterio, riñón y cerebro. Macroscópicamente no se encontró evidencia de lesión en ninguno de estos tejidos. Microscópicamente, el pulmón mostró congestión y hemorragia moderada, con distribución multifocal y coalescente, Figura 16. El bazo presentó focos de infiltrado de linfocitos y macrófagos de citoplasma espumoso, Figura 17. En mesenterio se encontró infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario multifocal, necrosis moderada y múltiples estructuras parasitarias compatibles con taquizoitos, Figura 18. En corazón, riñón y cerebro no se observaron lesiones histológicas.

### **7.13. Estudio inmunohistoquímico para *T. gondii* y *N. caninum* en tejidos de la segunda ratona muerta a los 7 días P.I.**

Los taquizoitos intra y extralesionales presentes en pulmón y bazo fueron positivos para *T. gondii* y negativos para *N. caninum*, Figuras 19 y 20.

### **7.14. PCR para *Neospora caninum* de líquido peritoneal y tejidos de ambos roedores muertos**

En el carril No.1 se colocó el marcador de tamaño <sup>Fermentas SMO311</sup>, el DNA de las muestras se agregó en los diferentes carriles: en el carril No. 2 se aplicó el testigo positivo obtenido de la vacuna para *Neospora caninum*, el carril No.3 se utilizó para el testigo negativo (agua), en el carril No.4 se colocó líquido peritoneal del primer ratón muerto, en el carril No.5 líquido peritoneal del roedor utilizado como segundo pase, el cuál acababa de morir, en el carril No.6 y 7 se colocaron muestras del macerado de órganos del ratón utilizado como segundo pase y en el carril No.8 se corrió la muestra de cultivo celular infectado con taquizoitos de *Toxoplasma gondii*.

Ninguna de las muestras analizadas fue positiva, sólo se observaron bandas en el carril del peso molecular y en el testigo positivo, Figura 21.

### **7.15. PCR para *Toxoplasma gondii* de líquido peritoneal**

Para los cinco genes *b1*, *sag2*, *gra6*, *sag3* y *βtubt*, el orden del DNA de las muestras fue el siguiente: En el carril No.1 se colocó el marcador de tamaño, en el carril No.2 se aplicó una muestra de líquido peritoneal con 5 millones de taquizoitos, en el carril No.3 se utilizó muestra de lavado peritoneal con 200

millones de taquizoitos, el carril No.4 es un testigo positivo (cepa RH), en el carril No.5 otro testigo positivo (cepa Wiktor) y el carril No.6 es el testigo negativo (agua).

El PCR fue positivo para los carriles 2 y 3 para los cinco genes, Figuras 22 y 23.

#### **7.16. PCR-RFLP para los genes *sag2* y *βtub* de *T. gondii*.**

En el caso de *sag2*, se observaron dos bandas de aproximadamente 400 pb y 150 pb, las cuales corresponden al patrón de alelos del genotipo I (cepa RH). Para *βtub*, el aislamiento de becerro mostró un genotipo I, ya que se apreciaron dos bandas de 230 y 110 pb semejantes a las dos cepas de referencia tipo I (RH y Wiktor) utilizadas en este estudio. Figuras 24 y 25.

#### **7.17. Secuenciación del producto de PCR de los genes *sag2* y *gra6* de *T. gondii***

Se obtuvo la secuencia del fragmento del *gra6* del aislamiento de *T. gondii* la cual se analizó con el programa Sequencher 4.5 para verificar que las muestras secuenciadas correspondieran al sentido y antisentido del mismo, Figura 26

Se realizó la alineación y se construyó un árbol a partir de la secuencia obtenida con *gra6*, el cuál muestra una distancia de 1% entre el aislamiento del becerro y la cepa GT1 (genotipo I) por lo que está más relacionado a esta cepa

que con ME49 y VEG (genotipos II y III respectivamente), ya que con éstas, muestra una distancia de 2%, Figura 27 y 28

La secuencia del antisentido del fragmento de *sag2* se analizó con el programa Sequencher 4.5 para verificar que las muestras secuenciadas correspondieran al antisentido del mismo, Figura 29

Se realizó la alineación y se construyó un árbol, el cuál muestra una distancia de 1% entre el aislamiento procedente del becerro y las cepas GT1, ME49 y VEG, por lo que la secuencia obtenida con *sag2* muestra la misma relación para las tres cepas anteriormente mencionadas, Figura 30 y 31

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Aislamiento de *Toxoplasma gondii*

Los resultados del presente estudio indican que los protozoarios aislados en las dos ratonas muertas, la primera inoculada con el cerebro de la becerria asintomática y la segunda con el líquido peritoneal de la primera ratona muerta, corresponden a *Toxoplasma gondii*, siendo el primer aislamiento de este parásito proveniente del cerebro de un bovino en México. Desde 1908, fecha en que fue identificado *T. gondii* hasta la actualidad, solo se han informado 11 aislamientos procedentes del ganado bovino en todo el mundo, incluyendo al que se informa en este trabajo (Dubey, 1986, Dubey, 1992, Canada *et al.*, 2002).

En un estudio seroepidemiológico hecho por Alvarado-Esquivel y colaboradores en el 2006, realizado a 343 mujeres gestantes en el estado de Durango, México, se aplicó una encuesta, la cual entre otros resultados, mostró que 337 de éstas mujeres consume carne de bovino y 21 de ellas resultaron ser seropositivas a *Toxoplasma gondii*. Por lo que el aislamiento de *T. gondii* a partir de un bovino implica reconsiderar la presencia de éste parásito en este huésped intermediario, el cual se destina para consumo humano. Kean y colaboradores en 1969 reportan que cinco estudiantes de medicina desarrollaron sintomatología de toxoplasmosis aguda dos semanas después de haber ingerido una hamburguesa en el comedor de la universidad; en las averiguaciones el encargado aseguró que la carne de res no había sido mezclada con la de cordero o cerdo. Por otro lado Lord *et al.*, en 1975 reportaron un caso donde tres personas desarrollaron toxoplasmosis por haber consumido un platillo hecho con carne de ternera cruda. Lora y colaboradores en el 2007 realizaron una evaluación por medio de la PCR

con *b1* en carne de res, para detectar la presencia de *Toxoplasma gondii*; en un total de 60 muestras, 29 salieron positivas al DNA de éste parásito. Aspinall *et al.*, en el 2002, en 4 muestras de carne de bovino evaluadas por PCR, obtuvieron una positiva a DNA de *Toxoplasma*. En un estudio realizado por Dubey and Kirkbride en 1989, aislaron a *T. gondii* del músculo de las piernas en borregos Hampshire. Weinman y Chandler en 1956 mencionan que los quistes de este protozooario puede sobrevivir diez días en músculo y treinta días en el cerebro de animales que fueron conservados de entre 2 a 5°C y los quistes pueden permanecer viables en carne y órganos por tres semanas a 4°C. Por el contrario Kotula y colaboradores en 1991 mencionan que el riesgo que representa la ingestión de carne congelada en humanos probablemente sea bajo porque la mayoría de los quistes de *T. gondii* llegan a ser inactivados por las temperaturas de congelamiento que proporcionan los refrigeradores caseros. Por otro lado Dubey y colaboradores en 1990 y 1994 mencionan que en condiciones de laboratorio, los quistes de *T. gondii* pueden permanecer viables a 60°C por cuatro minutos y a 50°C por diez minutos. Sin embargo, hasta la fecha, el tiempo que este parásito permanece viable en la carne congelada o cocida es incierto, por lo que, el riesgo que representa el consumo de carne infectada por toxoplasmosis para la población humana es indeterminada. Por otro lado, no solo los productos cárnicos y sus derivados podrían ser un factor de riesgo para adquirir la infección, ya que Sanger y colaboradores en 1953 informan de un aislamiento de *T. gondii* a partir de leche de una vaca infectada naturalmente por este parásito. Al respecto Tenter y colaboradores en el año 2000 mencionan que la posibilidad de adquirir la toxoplasmosis por el consumo de carne u otros derivados de los animales, varía dependiendo de la cultura y los

hábitos alimenticios de las diferentes poblaciones humanas (Weinman *et al.*, 1956, Kean *et al.*, 1969; Lord *et al.*, 1975, Dubey *et al.*, 1989, Dubey, *et al.*, 1990, Kotula, *et al.*, 1991, Dubey, 1994, Tenter *et al.*, 2000, Aspinall *et al.*, 2002; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2006; Lora *et al.*, 2007).

## **8.2. Hallazgos histológicos de los tejidos obtenidos del becerro y los ratones**

Como se refiere en la literatura, Hill y colaboradores en el 2005, Tenter *et al.*, en el 2000 y Dubey en 1986 mencionan que *Toxoplasma gondii* es un parásito que tiene afinidad por diversos órganos, entre ellos el cerebro, el cual puede presentar degeneración neuronal de las células de Purkinje, necrosis focal en la zona granular y focos de microgliosis, lesiones histológicas que no se observaron en las muestras de encéfalo de la becerra ni de los ratones inoculados con el macerado de cerebro de la becerra. Estos resultados difieren con informes de Gontijo de Silva y colaboradores, 2008, ya que estos investigadores encontraron edema perivascular, hemorragia en parénquima, necrosis, inflamación y taquizoitos en el encéfalo de los roedores que fueron inoculados con sangre, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo provenientes de fetos humanos, niños recién nacidos y mujeres gestantes que presentaban signología clínica y que fueron positivos a toxoplasmosis en las pruebas de laboratorio. La diferencia entre ambos resultados puede deberse a que en el trabajo realizado por Gontijo de Silva y colaboradores en el 2008, los ratones permanecieron vivos por más de 50 días, posiblemente porque el tipo de *T. gondii* aislado era menos virulento para los ratones, con respecto al aislamiento del presente trabajo en el que los ratones que se infectaron no vivieron por más de ocho días, lo que pudo ser poco tiempo para



el desarrollo de lesiones y formación de quistes en el cerebro (Hermes *et al.*, 2008; Gontijo de Silva, *et al.*, 2008; Dubey, 1986).

En las dos ratonas muertas a los 8 y 7 días PI, se encontraron múltiples taquizoitos en bazo, hígado, pulmón y mesenterio, lo cual coincide con un estudio similar realizado por Dubey y colaboradores en 1983, en el cual se inocularon ratones con tejidos de becerros positivos a *T. gondii*, refiriendo que se encontraron parásitos en diferentes órganos de los roedores. Además, en otro estudio realizado por Dubey *et al.*, en 1992, encontraron taquizoitos de *T. gondii* en impresiones de pulmones de ratones inoculados con un macerado de ojos y ooquistes de gatos que fueron alimentados con tejidos de una vaca seropositiva a *T. gondii*. En un trabajo realizado por Fux y colaboradores, 2000, encontraron quistes de este parásito en el cerebro de roedores inoculados con una cepa de *T. gondii* proveniente de un perro en Brasil, hallazgo que no se observó en este estudio, lo que probablemente se debió al tipo de cepa de *T. gondii* que fue inoculada.

Las lesiones histológicas encontradas en el hígado, bazo y mesenterio de los ratones del presente estudio, no pudieron compararse con otros trabajos, ya que en la mayoría de los estudios en los cuales se han inoculado roedores con *T. gondii*, sólo se han practicado impresiones de los órganos en fresco para encontrar taquizoitos o quistes del protozooario sin realizar evaluación histológica, sin embargo, fueron similares a las lesiones descritas en animales con toxoplasmosis clínica adquirida de forma natural (Dubey, 1992, Canada *et al.*, 2002, Pena *et al.*, 2006).

### **8.3. Hallazgos clínicos en los ratones**

Es importante señalar que de todos los ratones que fueron inoculados, solamente las dos ratonas que murieron a causa de la infección, presentaron signos clínicos. Por lo que el presente estudio difiere de otros trabajos en donde se han infectado roedores con *T. gondii*, permaneciendo clínicamente sanos (Dubey, 1992; Canada *et al.*, 2002).

El caso de los ratones que no se infectaron, pudo deberse a que en la porción del macerado de cerebro del becerro que les fue inoculado no hubiera, o tuviera la cantidad suficiente de parásitos como para infectarlos. La muerte en corto tiempo P.I. ocurrida en los dos ratones del presente estudio, puede relacionarse al comportamiento de la cepa genotipo I que fue aislada e identificada, ya que se ha descrito que esta cepa es altamente virulenta para el ratón diseminándose y ocasionando la muerte rápidamente sin la formación de quistes cerebrales (Dardé, 2004).

### **8.4. ELISA en los ratones para *N. caninum***

El hecho de que los resultados del ensayo hayan sido invalidados, pudo deberse a que el método utilizado fue el mismo que se utilizó para los bovinos, con excepción del conjugado, ya que el de bovino se sustituyó por un conjugado anti-ratón-IgG al no contar con un juego de reactivos estandarizados para el diagnóstico en el ratón, lo que quizá produjo que no hubiese reconocimiento de

anticuerpos anti-*Neospora caninum* en los sueros de los ratones muestreados en este trabajo.

### **8.5. ELISA en los ratones para *T. gondii***

La cinética de las muestras de los roedores que murieron en una semana comenzaban a mostrar un aumento en la IgG, lo que sugiere, que si estos ratones hubieran sobrevivido más tiempo sus títulos para esta inmunoglobulina hubieran sido más evidentes. Con respecto a las roedoras que fueron sacrificadas a los 40 días, sus cinéticas resultaron ser negativas a anticuerpos anti-*Toxoplasma*, lo que pudo deberse a que los ratones que fueron sacrificados días después no alcanzaron a producir una respuesta inmune humoral contra el parásito, o quizá los niveles de anticuerpos que produjeron no fueron lo suficientemente elevados como para ser detectados por la técnica utilizada a pesar que de ya tenían edad para montar una respuesta inmune, de acuerdo a Sánchez y colaboradores en el 2001. Otra posibilidad es que la porción de cerebro que les fue inoculado, fuera tejido sano o libre de cualquier patógeno incluyendo a *Toxoplasma gondii*. (Sánchez *et al.*, 2001)

Por otro lado los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con lo encontrado por Dubey en 1992, ya que de 150 ratones que se inocularon con diferentes órganos de una vaca de la cual se aisló *Toxoplasma* del intestino, sólo cinco de diez de los roedores que se inocularon con una porción de intestino resultaron positivos a anticuerpos anti-*T. gondii*, en el resto de los ratones no se encontraron anticuerpos para este parásito. Canada y colaboradores en el 2002

inocularon cerebro de un bovino del cual se aisló *Toxoplasma gondii* en 5 ratones, los cuales permanecieron sanos y sólo uno de los roedores produjo anticuerpos para este protozooario. Por otro lado Pena *et al.*, en el 2006, en un estudio con 253 ratones inoculados con diferentes tejidos de gatos, 193 se infectaron con *T. gondii*, de los cuales 53 sobrevivieron hasta el final del experimento, los 140 roedores restantes murieron entre los días 10 y 40 post infección (Dubey, 1992; Canada *et al.*, 2002; Pena *et al.*, 2006).

Con respecto al ratón inoculado con el cerebro de un becerro proveniente de madre seropositiva a *Neospora caninum* y que mostró una cinética para IgG sugerente de aumento, puede deberse a que se realizó un mal manejo de las muestras y estas se contaminaron, otra posibilidad es que con la técnica de ELISA utilizada en este trabajo haya ocurrido un cruce entre regiones antigénicas de ambos parásitos, lo que sugiere que quizá este ratón se infectó con *N. caninum*, pero logró montar una respuesta inmune para controlar al parásito, de modo que no le produjera signología clínica, la muerte o lesiones a nivel histológico. La literatura menciona que *N. caninum* y *T. gondii* están relacionados filogenéticamente aunque son antigénicamente diferentes, sin embargo Hemphill y colaboradores en 1999 mencionan que existen antígenos de superficie como Nc-P36 de *Neospora* la cual exhibe una secuencia de aminoácidos 76.3% similar con P30 de *T. gondii*.

## **8.6. Ultraestructura de los taquizoitos**

En este trabajo la evaluación con microscopía electrónica de transmisión apoyó el resultado de las pruebas serológicas, moleculares y de la IHQ, ya que los parásitos presentaron ultraestructura característica de organismos Apicomplexa, como es el conoide que forma parte del complejo apical (Lyndsay *et al.*, 1993).

Otro hallazgo importante en los taquizoitos aislados corresponde a las roptrias, las cuales se mostraron electrolúcidas como se describe en el caso de *Toxoplasma gondii*, descartando a otros parásitos como a *Neospora caninum* ya que en este, sus roptrias son electrodensas (Sheffield *et al.*, 1967, Lyndsay *et al.*, 1993, Dubey *et al.*, 2002).

#### **8.7. Genotipificación del aislamiento de *Toxoplasma gondii* por PCR-RFLP para *sag2* y *$\beta$ tub* con la secuenciación del producto de PCR de *sag2* y *gra6***

Se han realizado diversos trabajos para crear marcadores genéticos para *T. gondii*, los cuales permiten la distinción entre los tres tipos de genotipos informados para este parásito. Algunos de estos genes son *sag2* y  *$\beta$ tub* los cuales fueron utilizados en el presente trabajo con la enzima Taq1 con la cual se reconocieron alelos para el genotipo I de *T. gondii* (Su *et al.*, 2006, Sundar *et al.*, 2008).

Por lo tanto la genotipificación de este parásito por medio de la PCR-RFLP fue una prueba confirmatoria que explica el comportamiento biológico de éste parásito en los ratones, ya que estos murieron en menos de una semana P.I. lo que concuerda con el fenotipo de las cepas genotipo I de *Toxoplasma*, ya que este linaje ha demostrado ser muy virulento para los roedores, debido a que muestran una rápida diseminación dentro del organismo, por lo que producen rápidamente

la muerte a los ratones, otra característica de este tipo de cepas es la hiperinducción en la secreción de citocinas proinflamatorias como el IFN $\gamma$ , el cual no fue medido en este trabajo (Dardé, 2004).

Dubey y colaboradores en el año 2004b en un estudio realizado en México con aves de corral, informan seis aislamientos por medio de bioensayos en ratones, los cuales fueron caracterizados con *sag2*. Cinco de ellos fueron tipificados como genotipos III y el restante como genotipo I, ninguno de los aislamientos mostró ser virulento para los ratones como en el caso del presente estudio. Por otro lado, Dubey y colaboradores en Durango, México en el 2009, aislaron a *Toxoplasma gondii* por medio de bioensayos en 3 perros y 5 gatos. Los aislamientos fueron caracterizados utilizando once marcadores genéticos, entre ellos *sag2*, *gra6* y  *$\beta$ tub*, encontrando cinco genotipos. El primer aislamiento, con los diferentes marcadores, mostró alelos para los tres genotipos, el cual ya había sido informado en un borrego en los EUA, el segundo lo informan como genotipo único, el tercero fue identificado como genotipo III, el cuarto de igual forma que el primero mostró alelos para los tres genotipos. Este había sido previamente informado en un gato de China, en un perro en Vietnam y de un borrego de EUA. Finalmente el quinto genotipo mostró alelos para los genotipos II y III siendo previamente informado en un borrego de EUA. A diferencia del presente estudio, ninguno de los aislamientos fue virulento para los roedores (Dubey *et al.*, 2004b y 2009).

Estudios hechos en otros países muestran datos diferentes a los anteriores. Cavalcante y colaboradores en Brasil en el 2007 obtuvieron dos aislamientos de *T. gondii* en cabras. Con *sag2*, los tipificaron como genotipos recombinantes de los

tipos I y III. En Argentina, Dubey y colaboradores en el 2005a lograron 17 aislamientos en aves de corral, los cuales caracterizaron por medio de *sag2*. Cuatro de ellos correspondieron al genotipo I, tres correspondieron al genotipo II y diez al genotipo III. Dos aislamientos correspondientes al genotipo I y uno al genotipo III fueron virulentos para los ratones, mientras que el otro aislamiento correspondiente al genotipo I no fue virulento para los ratones. Por otro lado, en Venezuela, Dubey y colaboradores en el 2005b informaron 13 aislamientos de *T. gondii* en aves de corral, siendo todos virulentos para los ratones. La caracterización de éstos fue con *sag2*, indicando que diez de los aislamientos correspondieron al genotipo tipo III y los tres restantes, al genotipo tipo II, esto difiere con lo informado por Dardé en el 2004, quien menciona que la relación genotipo y fenotipo esta bien establecida, refiriéndose a que las cepas genotipo I son altamente virulentas en ratón en comparación a los genotipos II y III que resultan ser nulos o menos virulentos para el roedor, respectivamente. En California EUA, Sundar y colaboradores en el 2008 determinaron los genotipos de 39 aislamientos de *T. gondii* en nutrias de mar, usando *sag2* y diez marcadores genéticos. En ellos determinaron seis genotipos diferentes, los genotipos 1, 2, 3, 4 y 5 mostraron alelos para genotipos I y II, el genotipo 6 mostró alelos para genotipos II y III (Dardé, 2004, Dubey *et al.*, 2005a, 2005b, Cavalcante, *et al.*, 2007, Sundar *et al.*, 2008).

Por otro lado, Fuentes y colaboradores en el 2001 mencionan que el genotipo I de *T. gondii* se ha asociado a infecciones congénitas en humanos. En el caso del bovino, no existen suficientes informes que indiquen que este genotipo se transmita con frecuencia vía transplacentaria, aunque el aislamiento obtenido en el

presente estudio apoya esta hipótesis. Este dato difiere con lo informado por Dardé en el 2004, quien menciona que el genotipo II es el que está más relacionado con este tipo de infección en humanos.

Los datos anteriores aunque provienen de especies diferentes al bovino, sugieren que en México predominan los genotipos recombinantes, pero también pueden encontrarse los linajes I y III, por lo que la distribución geográfica de los principales genotipos de *T. gondii* no es predominante de Europa y Estados Unidos como lo reporta Dardé en el 2004, quizá lo que falta es realizar más estudios en otras regiones del mundo, incluyendo México para poder determinar con mayor exactitud la distribución de sus genotipos y su relación con el comportamiento biológico en las diferentes especies a las que afecta este protozoario.

Con respecto a esto, los datos que se consiguieron de la madre de la becerria, de la cual se obtuvo el aislamiento son, que es vaca de recría, al igual que sus padres, es mediana productora de leche, no ha presentado abortos, solo una vez tuvo retención placentaria y actualmente esta gestante. En el caso de los becerros de su última parición no se puede brindar datos de su estado clínico o de salud, debido a que fueron sacrificados recién nacidos para el presente estudio.

Con esta información queda abierta la pregunta de si los bovinos efectivamente son una especie resistente a desarrollar la toxoplasmosis o depende de la condición de cada individuo, ya que para 1997 no existían reportes donde se confirmaran abortos o alguna forma de enfermedad clínica causada por *T. gondii* en el ganado vacuno, sin embargo Canada *et al.*, en el 2002 reportan dos



aislamientos de *Toxoplasma* procedentes de dos fetos de bovino abortados (Esteban-Redondo *et al.*, 1997, Dubey 1986, Canada *et al.*, 2002).

En este estudio se decidió utilizar los genes *sag2* y *gra6* de *T. gondii* ya que son genes que se han utilizado en diferentes trabajos relacionados con la caracterización genética de los diversos aislamientos de este parásito en el mundo, además de que estos genes pueden estar relacionados con la virulencia del parásito (Dubey *et al.*, 2005a, 2005b, Su *et al.*, 2006, Cavalcante, *et al.*, 2007, Sundar *et al.*, 2008).

Las secuencias obtenidas con los genes *sag2* y *gra6* ayudaron a colocar el aislamiento, en la Taxa correspondiente, ya que se encontró relación con aislamientos de las cepas de *T. gondii* que se encuentran informadas en el NCBI. Sin embargo la relación obtenida con la secuencia de *gra6*, difiere con la de *sag2*, ya que con la primera el aislamiento procedente del becerro tiene un 99% de identidad con la cepa GT1 de *T. gondii* la cual corresponde a genotipo I y con *sag2*, se obtiene un 99% de identidad con las cepas GT1, ME49 y VEG que corresponden a genotipos I, II y III respectivamente (Su *et al.*, 2006).

Esto puede deberse a que la secuencia del aislamiento obtenido con los genes *gra6* y *sag2* sólo es una porción de la secuencia completa de cada gen y al ser comparadas con el resto de los aislamientos, estas porciones pueden coincidir con más de una cepa o genotipo de *T. gondii*, ya que aunque sean diferentes aislamientos no dejan de pertenecer al mismo protozoario.

## 9. CONCLUSIONES

Los parásitos encontrados corresponden al primer aislamiento de *Toxoplasma gondii* a partir de tejido cerebral de un becerro infectado naturalmente en México.

Reconsiderar y estudiar la presencia de la toxoplasmosis en los bovinos en estabulación debido a que sus productos y sus productos en combinación con los hábitos alimenticios y culturales de la población pueden actuar como un factor de riesgo para adquirir la infección.

Las pruebas moleculares, la IHQ y la ultraestructura fueron herramientas que confirmaron que el aislamiento obtenido correspondió a *Toxoplasma gondii*, genotipo I descartándose a otros protozoarios del Phylum Apicomplexa, principalmente a *Neospora caninum*.

El genotipo I es virulento para los ratones,

No se pudo realizar una comparación genética con otros aislamientos de *T. gondii* en bovinos, debido a que la información requerida no se encuentra disponible en las bases de datos taxonómicas mundiales.

## 10. REFERENCIAS

**Alvarado-Esquivel C**, Liesenfeld O, Herrera-Flores RG, Ramírez-Sánchez BE, González-Herrera A, Martínez-García SA, Dubey JP., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, Mexico, 2007, J Parasitol, 93: 1214-1216.

**Aspinall TV, Marlee D.**, Hyde JE, Sims PF., Prevalence of *Toxoplasma gondii* in comercial meat products as monitored by polimerase chain reaction-food for thought?, 2002, Int J Parasitol, 32: 1193-1199.

**Barr B., Conrad P.A.**, Dubey J.P., Conrad P.A., *Neospora-like* protozoal infections associal whit bovine abortions, 1991, Vet Pathol, 28:110-116.

**Barr B., Conrad P.A.**, Breitmeyer R., Sverlow K., Anderson M., Reynolds J., *et al.*, Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992), 1993, J Am Vet Med Assoc, 202:113-117.

**Besné-Mérida A**, Figueroa-Castillo JA, Martínez-Maya JJ, Luna-Pastén H, Calderón-Segura E, Correa D. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City, 2008, Vet Parasitol, 157: 310-113.

**Caballero-Ortega H**, Palma JM, García-Márquez LJ, Gildo-Cárdenas A, Correa D. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico, 2008a, Parasitology, 135: 1385-1389.

**Caballero-Ortega H**, Quiroz-Romero H, Olazarán-Jenkins S, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and

temporal analysis of the humoral response changes, 2008b, *Parasitology*, 135: 897-902.

**Canada N.**, Meireles C.S., Rocha M.A., Correia de Costa J.M., Erickson M.W. and Dubey J.P.: Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses, 2002, *J. Parasitol*, 88: 1247-1248.

**Cavalcante A.C.R.**, Ferreira A.M., Melo M.N., Fux B., Brandão G.P., Vitor R.W.A., Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil, 2007, *Small Rum Research*, 69: 79-82.

**Collantes - Fernández E.**, Álvarez G.G., Characterization of pathology and load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection, 2004, *J Parasitol*, 90:579-583.

**Cuddon P.**, Bowman DD., *Neospora caninum* infection in English Spaniel Littermates, 1992, *J Vet Internal Med*, 6, 325-332.

**Dardé M.L.**, Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*, 2004, *Ann Ist Super Sanità*, 40:57-63.

**De Aluja A.S.**, Constantino C.F., Métodos de Eutanasia, En: *Técnicas de Necropsia en Animales Domésticos*, 2ª ed., Manual Moderno, México, 2002, pp 3-10.

**Dubey JP.**, Distribution of cyst and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts, 1983, *Vet Parasitol*, 13:199-211.

**Dubey J.P.**: A review of toxoplasmosis in cattle. 1986. *Vet Parasitol*, 22: 177-202.

**Dubey J.P.**, Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow, 1992, *J Parasitol*, 78: 151-153.

**Dubey J.P.**, Toxoplasmosis, 1994, *J Am Vet Med Assoc*, 205:1593-1598.

**Dubey J.P.**, Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis, 2004a, *Vet Parasitol*, 126: 57-72.

**Dubey JP**, Morales ES, Lehmann T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico, 2004b, *J Parasitol*, 90: 411-413.

**Dubey J.P**, Barr B.C., Barta J.R., Bjerka I., Björkman C., Blagburn B.L., *et al.*, Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia, 2002, *Int J Parasitol*, 32: 929-946.

**Dubey J.**, Dorrough K., Jenkins M., Liddell S., Speer C., Kwok O., Shen S., Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture, 1998a, *Int J Parasitol*, 28:1923-1304.

**Dubey J.P.** and Kirkbride C.A., Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs, 1989, *J Am Vet Med Assoc*, 195: 1715-1716.

**Dubey J.P.**, Kotula A.W., Sharar A., Andrews C.D., Lindsay D.S., Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork, 1990, *J Parasitol*, 46:11-21.

**Dubey J.P.**, Lenhart A., Castillo C.E., Alvarez L., Marcet P., Sreekumar C., and Lehmann T., *Toxoplasma gondii* infections in Chickens from Venezuela: Isolation, tissue distribution and molecular characterization, 2005b, *J Parasitol*, 9:1332-1334.

**Dubey J.P.** and Lindsay D.S., A review of *Neospora caninum* and neosporosis, 1996, *Vet Parasitol*, 67:1-59.

**Dubey J.P.** and Lindsay D.S., Speer A.C., Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts, 1998b, *Clin Microbiol Rev*, 11:267-299.

**Dubey J.P.**, López-Torres H.Y., Sundar N., Velmurugan G.V., Ajzenberg D., Kwok O.C.H., *et al.*, Mouse-Virulent *Toxoplasma gondii* isolated from feral cats on Mona Island, Puerto Rico, 2007b, J Parasitol, 93:1365-1369.

**Dubey JP**, Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Herrera-Flores RG, Ramírez-Sánchez BE, González-Herrera A, Martínez-García SA, Bandini LA, Kwok OC. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango City, Mexico, 2007c, J. Parasitol, 93: 1033-1035.

**Dubey J.P.**, Echara G., Ortega-Mora L.M., Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora caninum*, 2007a, Clin Microbiol Rev, 20:323-367.

**Dubey J.P.**, Marcet P. and Lehmann T, Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Argentina, 2005a, J Parasitol, 9:1335-1339.

**Dubey J.P.**, Velmurugan G.V., Alvarado-Esquivel C., Alvarado-Esquivel D., Rodríguez Peña S., *et al.*, Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico, 2009, J Parasitol, 95: 319-322.

**Esteban-Redondo I.** and Innes E., *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle, 1997, Comp Immun Microbiol Infect Dis, 20: 191-196.

**Fayer R.**, Toxoplasmosis update and Public Health Implications, 1981, Can Vet J, 22: 344-352.

**Fazaeli A.**, Carter P.E., Pennington T.H., Intergenic spacer (IGS) polymorphism: A new genetic marker for differentiation of *Toxoplasma gondii* strain and *Neospora caninum*, 2000, J Parasitol, 86: 716-723.

**Figueroa-Castillo JA**, Duarte-Rosas V, Juárez-Acevedo M, Luna-Pastén H, Correa D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico, 2006, J Parasitol, 92: 394-395.

**François D.J.**, Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*, 1998, Trends Microbiol, 6: 27-30.

**Fuentes I.**, Rubio J.M., Ramírez C., Alvar J., Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strain associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples, 2001, J Clin Microbiol, 39: 1566-1570.

**Fux B.**, Ferreira A.M., Cassali G.D., Tafuri W.L., Vitor R.W.A., Experimental Toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection, 2000, Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, 95:121-126.

**Galván Ramírez M.L.**, Covarrubias X., Rodríguez R., Troyo R., Alfaro N., *Toxoplasma gondii* antibodies in Mexican blood donors, 2005, Transfusión, 45: 281-282.

**Galván Ramírez ML**, Sánchez Vargas G, Vielma Sandoval M, Soto Mancilla JL. Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara, 1999, Rev Soc Bras Med Trop, 32: 483-488.

**Galván Ramírez ML.**, Soto Mancilla JL., Velasco Castrejón O., Pérez Medina R., Incidente of anti-*Toxoplasma* antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions, 1995, Rev Soc Bras Med Trop, 28: 333-337, citado por Tenter A.M., Heckeroth A.R. and Weiss L.M., en el año 2000.

**García-Márquez LJ**, Gutiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, Palma JM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico, 2007, J Parasitol, 93: 1527-1528.

**Gondim L.F.P.**, Laski P., Gao L., McAllister M.M., Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*, 2004, J Parasitol, 90:119-122.

**Gontijo de Silva M.**, De Souza Lino R.L., Da Costa T.L., Herzog Soares J.D., Naves do Amaral W., *et al.*, Anatomopathological study in BALB/c mice brains experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, 2008, Braz J Infect Dis, 12: 52-56.

**Hemphill A.**, Fuchs N., Sonda S., Hehl A., The antigenic composition of *Neospora caninum*, 1999, Int J Parasitol, 29:1175-1188.

**Hermes G.**, Ajioka J.W., Kelly K.A., Mui E., Roberts F., Kasza K., *et al.*, Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection, 2008, J Neuroinflammation, 5: 48- 85.

**Hill D.E.**, Chirukandoth S. And Dubey J.P., Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals., 2005, Anim Health Research Rev, 6:41-46.

**Hill D.E.**, Dubey J.P., *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis and prevention, 2002, Clin Microbiol Infect, 8: 634-640.

**Kean B.H.**, Kimball A.C., Chirstenson W.N., An epidemic of acute toxoplasmosis, 1969, J Am Med Assoc, 208: 1002–1004. Citado por Dubey J.P. and Jones J.L., *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States, 2008, 38:1257-1278.



**Kim K.** and Weiss L.M., *Toxoplasma*: the next 100 years, 2008, Microbes and Infection, 10: 978-984.

**Kotula A.W.**, Dubey J.P., Sharar A.K. et al., Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in pork, 1991, J. Food Prot, 54:687-690.

**Koyama T.**, Kobayashi Y., Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep, 2001, J Parasitol, 87:1486-1488.

**Liddell S.**, Jenkins M.C., Dubey J.P., Vertical Transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection, 1999, J Parasitol, 85:550-555.

**Lora F.**, Haricapa H. J., Pérez E. J., Arias L.E, Idarraga S.E., Mier D., Gómez J.E., Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tres lugares del eje cafetero, 2007, Infectio, 11: 117-123.

**Lord W.G.**, Boni F., Bodek A., Hilberg R.W., Rosini R., Clack F.B., Toxoplasmosis – Pennsylvania, 1975, Morbid. Mortal. 24: 285–286. Citado por Dubey J.P. and Jones J.L., *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States, 2008, 38:1257-1278.

**Lyndsay D.S.**, Speer C.A., Toivio-Kinnucan, Dubey J. and Blagburn B., Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*, 1993, Am J Vet Res, 54:103-106.

**McAllister M.M.**, A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” toxoplasmosis, 2005, Vet Parasitol, 132:241-247.

**Montoya J.G.**, Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and Toxoplasmosis, 2002, J Infect Diseases, 185: 73-82.

**Morales SE**, Trigo F., Ibarra F., Puente E. y Santacruz M., Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico, 2001, *J Vet Diagn Invest*, 13:413-415.

**Morales SE**, Ramírez L.J., Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp. en México, 1997, *Vet. Méx*, 28:353-357.

**Mugridge N.B.**, Morrison D.A., Heckeron A.R., Johnson A.M., Tenter A.M., Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*, 1999, *Int J Parasitol*, 29:1545-1556.

**Norma Oficial Mexicana:** NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

**Norma Oficial Mexicana:** NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de animales domésticos y silvestres.

**Pena H.F.J.**, Soares R.M., Amaku M., Dubey J.P., Gennari S.M.: *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization, 2006, *Res Vet Sci*, 81:58-67.

**Rico-Torres C.**, Estandarización y validación a nivel laboratorio de una prueba de PCR para la detección directa de *T. gondii* en muestras biológicas, (Tesis de Maestría), UNAM, 2005.

**Saeij J.P.J.**, Boyle J.P. and Boothroyd J.C., Differences among the three major strain of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host, 2005, *Trends Parasitol*, 21: 476-480.

**Salinas A.**, Mora J., Zárate J., Riojas M., Hernández G., Dávalos G., *et al.*, Frequency of *Neospora caninum* antibodies in cattle from northeastern Mexico, 2005, *Vet Mex*, 36:303-311.

**Sánchez F.**, Morales E., Martínez J. y Trigo F., Determination and correlation of anti- *Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico, 2003, *C J Vet Res*, 67:142-145.

**Sánchez M.**, Lindroth K., Sverremark E., Gonzáles F.A., Fernández C., The response in old mice: positive and negative immune memory after priming in early age, 2001, *Int Immunol*, 13:1213-1221.

**Shrffield G. H** and Melton M. L., The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*, 1968, *J Parasitol*, 54: 209-226.

**Speer C.A.**, Dubey J.P., McAllister M.M. and Blixt J.A., Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, 1999, *Int J Parasitol*, 29:1509-1519.

**Speer C.A.**, Dubey J., Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cyst of *Neospora caninum*, 1989, *J Protozool*, 36:458-463.

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

**Sundar N.**, Cole R.A., Thomas N.J., Majundar D., Dubey J.P., Su C., Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*, 2008, *Vet Parasitol*, 151: 125-132.

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

**Terra L. M. A. B.**, Bello A. R., Bastos O.M. Amendoeira M. R. R. Janice Mary, Coelho Ch. de O., Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by Polimerase Chain Reaction in experimentally desiccated tissues, 2004, Mem Inst Oswaldo Cruz, 99: 185-188.

**Vela-Amieva**, Cañedo-Solares I., Gutiérrez-Castrellón P., Pérez Andrade M., González-Contreras, Ortiz-Cortéz J., et al., Short report: Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico, 2005, Am J Med Hyg, 72:142-144.

**Vianna M.C.B.**, Sreekumar C., Miska K.B., Hill D.E., Dubey J.P., Isolation of *Neospora caninum* from naturally infection white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), 2005, Vet Parasitol, 129: 253-257.

**Walsh C.P.**, Duncan R.B. Jr., Zajac A.M., Blagburn B.L., Lindsay D.S., *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils and dogs, 2000, Vet Parasitol, 92: 119-128.

**WarnekuLASuriya M.R.**, Johnson J.D., Holliman R.E., Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats, 1998, Int J Food Mycrobial, 45:211-215.

**Weinman D.** and Chandler A.H., Toxoplasmosis in man and swine-An investigation of the possible relationship, 1956, J Am Vet Med Assoc, 161:229-232.

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

**Yamane I.**, Kokuho T., Shimura K., Eto M., Shibaharan T., Haritan M., In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora species* in Japan, 1997, Research Vet Sci, 63: 77-80.

**Yamane I.**, Shibahara T., An improved isolation technique for bovine *Neospora* species, 1998, J Vet Diagn Invest, 10:364-368.

**Yun-Kyu Parker**, Early recognized antigen (p34) of *Toxoplasma gondii* after peroral ingestion of tissue cyst forming strain (Me49 strain) in mice, 1999, Korean J Parasitol, 37:157-162

## ANEXO 1. GRÁFICAS DEL ELISA

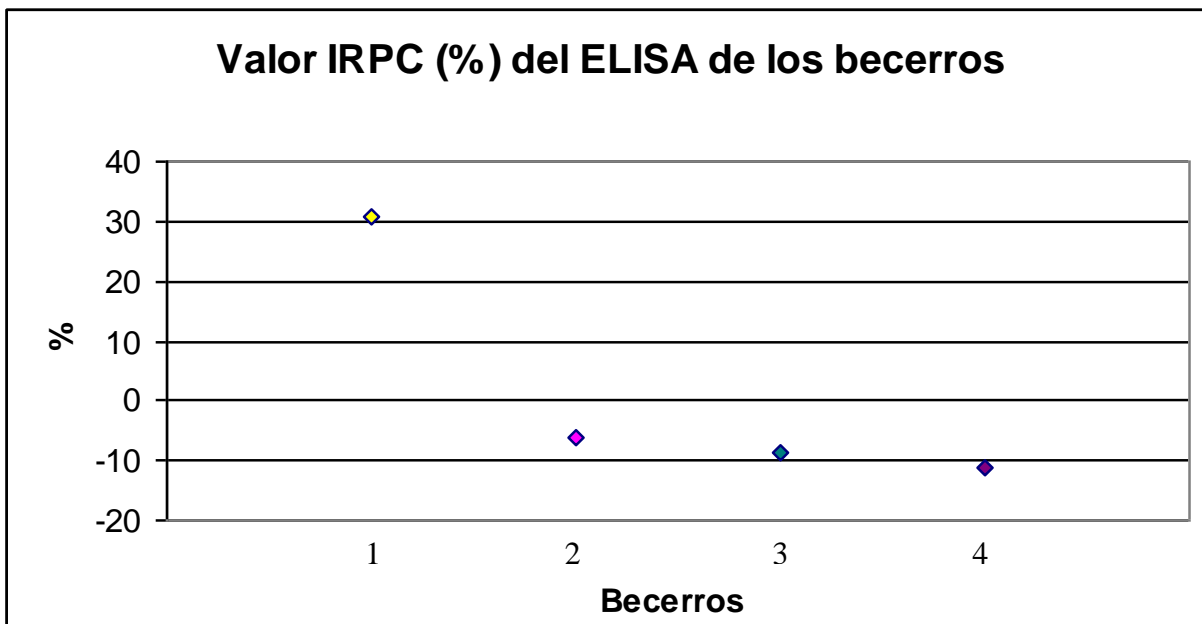


Figura 1

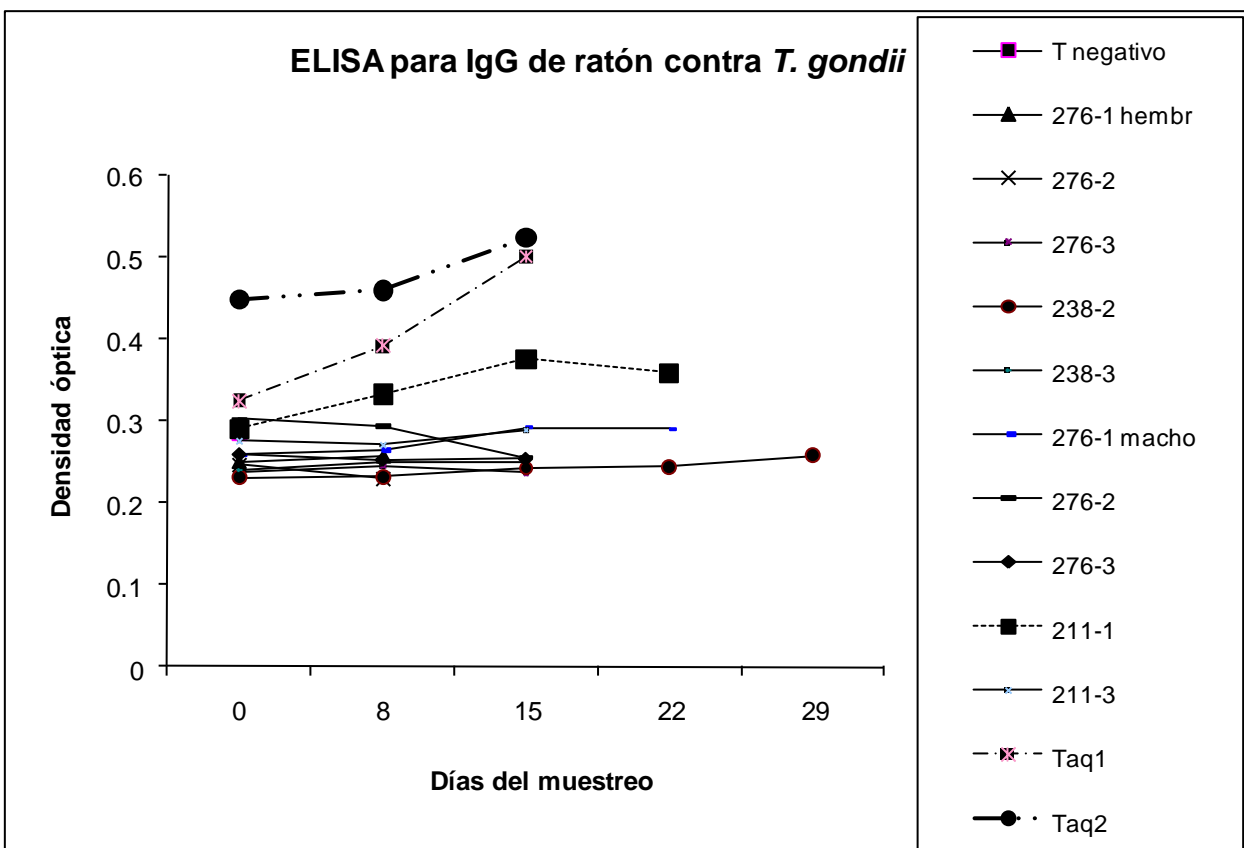


Figura 2a

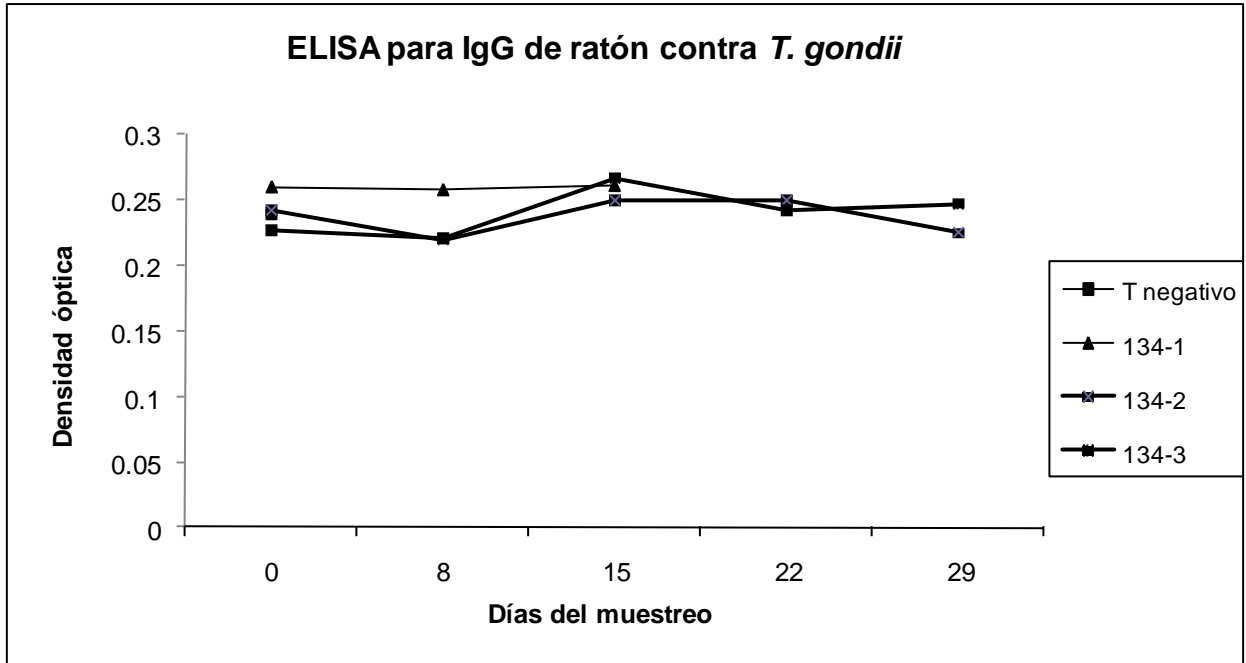


Figura 2b

## ANEXO 2. IMAGEN CEREBRO DE BECERRO

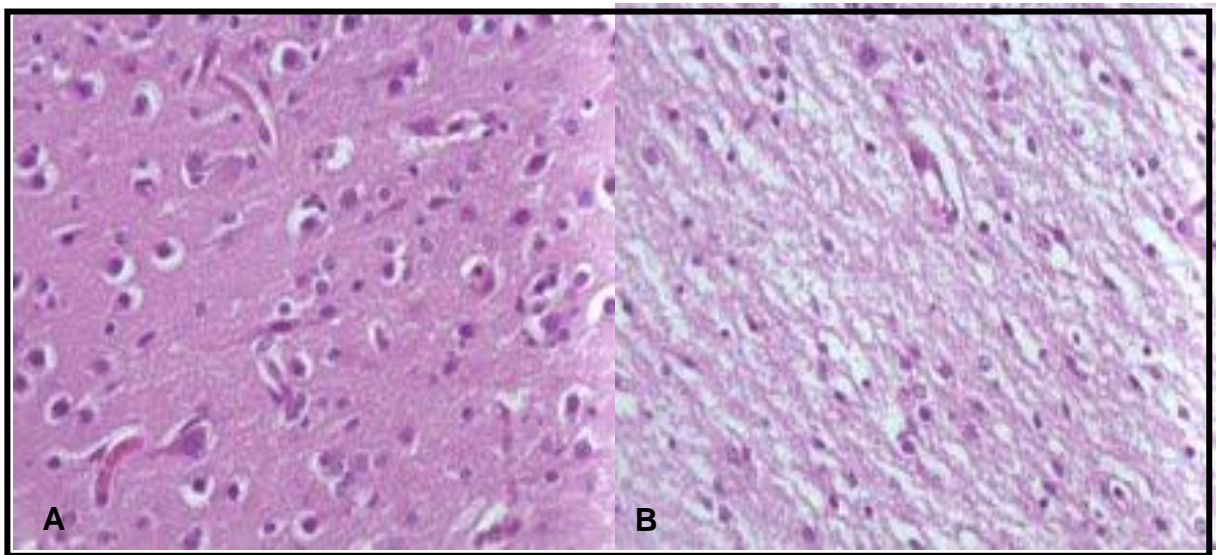


Figura 3. Fotomicrografía de cerebro de bovino, sin alteraciones histológicas. H&E, 40X. **A** sustancia gris, **B** sustancia blanca.

### ANEXO 3. IMÁGENES DEL PRIMER ROEDOR MUERTO



Figura 4. Ratón con pelo hirsuto, poca actividad y movimientos acelerados del tórax (★).



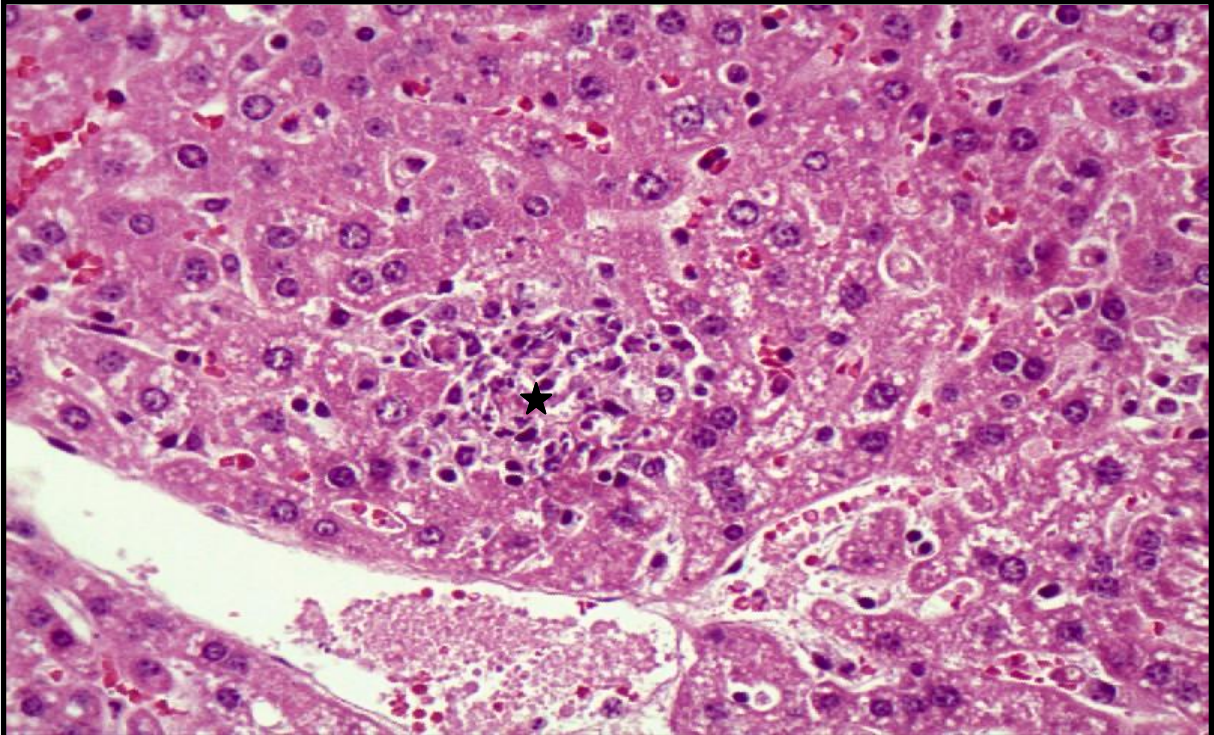


Figura 5. Fotomicrografía de sección de hígado del primer ratón muerto. Se aprecia un foco de necrosis e inflamación (★). H&E, 40X.

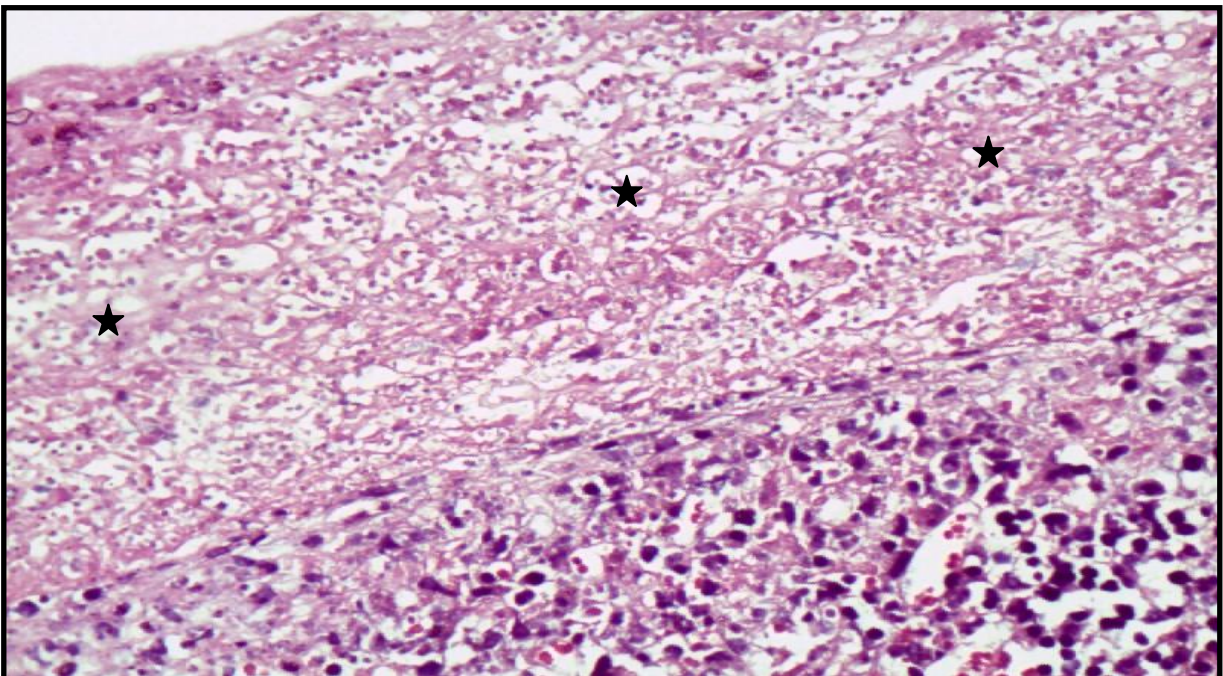


Figura 6. Fotomicrografía de sección de bazo del primer ratón muerto. Se observa serositis linfoplasmocitaria severa con estructuras parasitarias (★). H&E, 40X

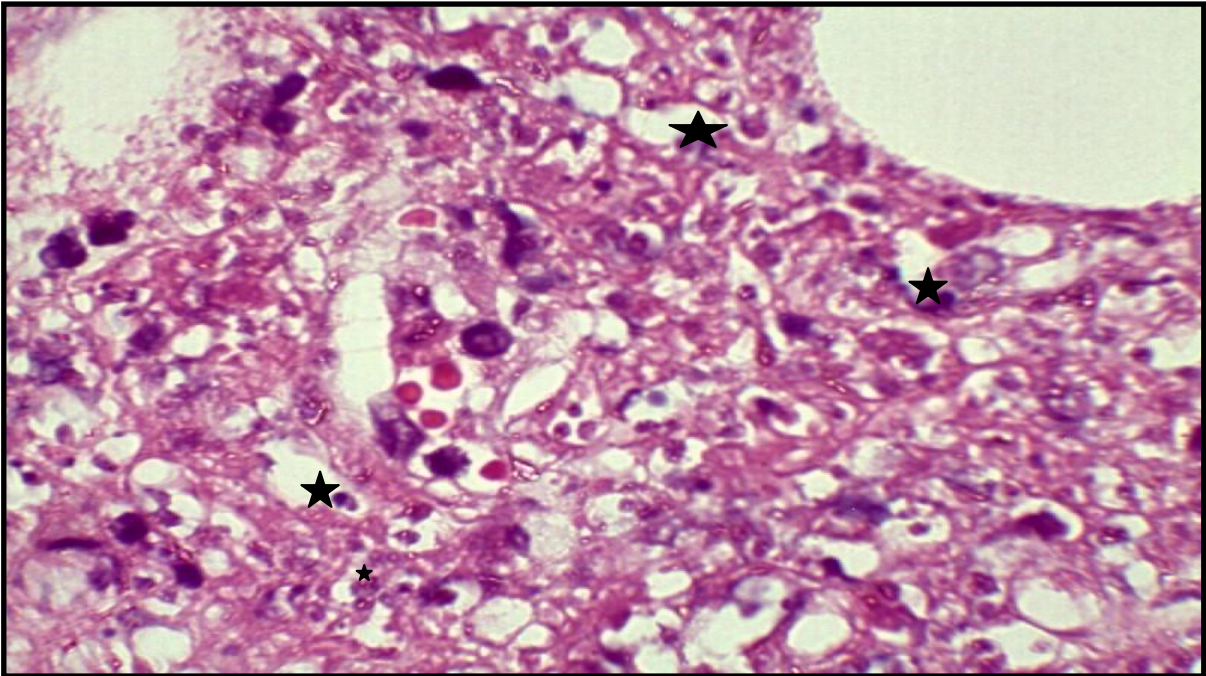


Figura 7. Fotomicrografía de sección de mesenterio. Se muestra una peritonitis linfoplasmocitaria severa con estructuras parasitarias(★). H&E, 100X

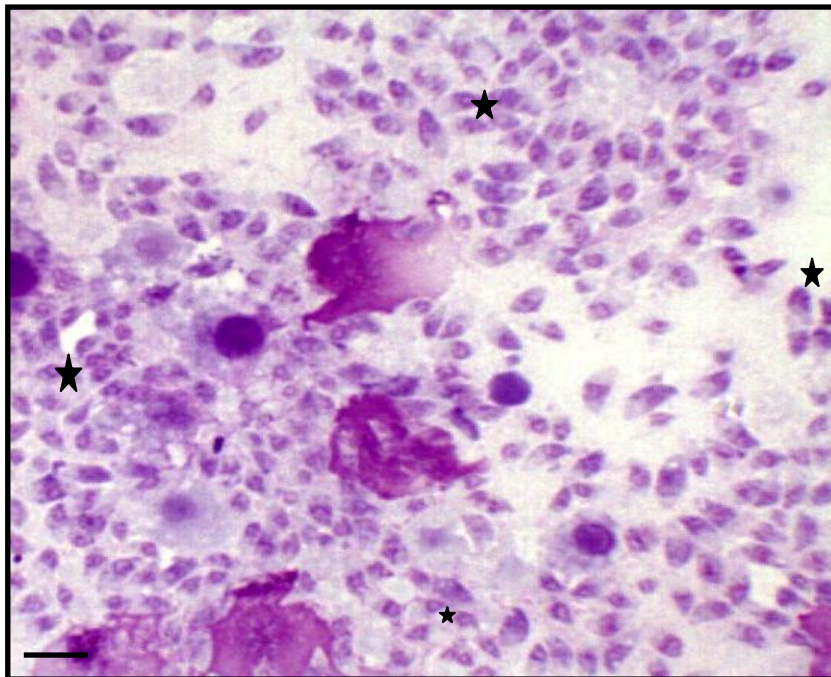


Figura 8. Citología de líquido peritoneal con taquizoitos (★) del primer ratón muerto teñida con Giemsa. — 7.3µm. 100X

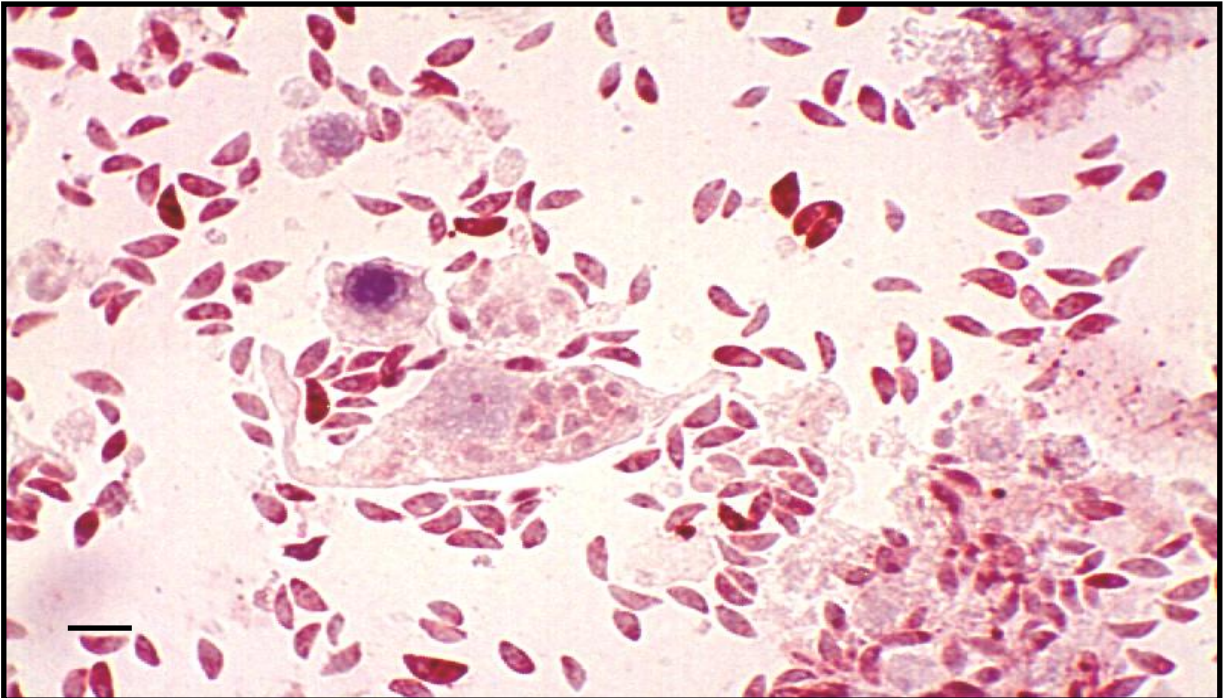


Figura 9. IHQ de líquido peritoneal con taquizoitos positivos (color rojo) a *T. gondii* del primer ratón muerto. — 7.3 $\mu$ m. 100X

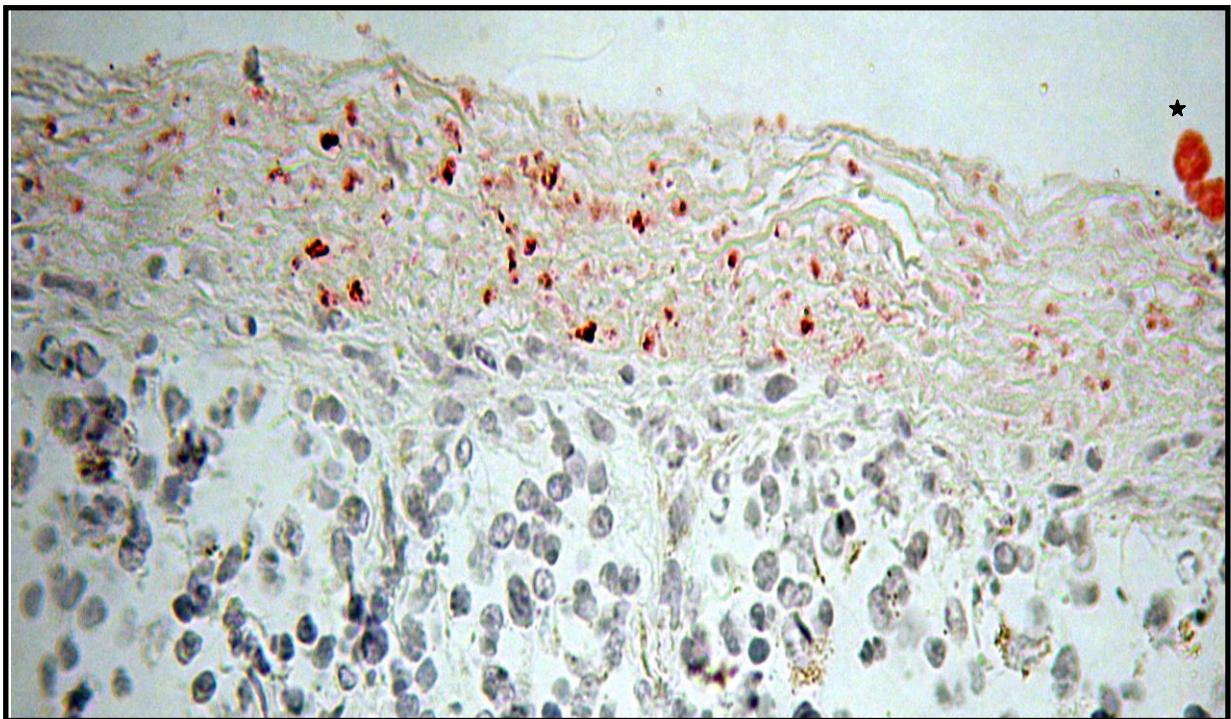


Figura 10. IHQ de bazo, positiva a *T. gondii* (color rojo) del primer ratón muerto, en el cual también se aprecian dos cúmulos de taquizoitos (★). 40X

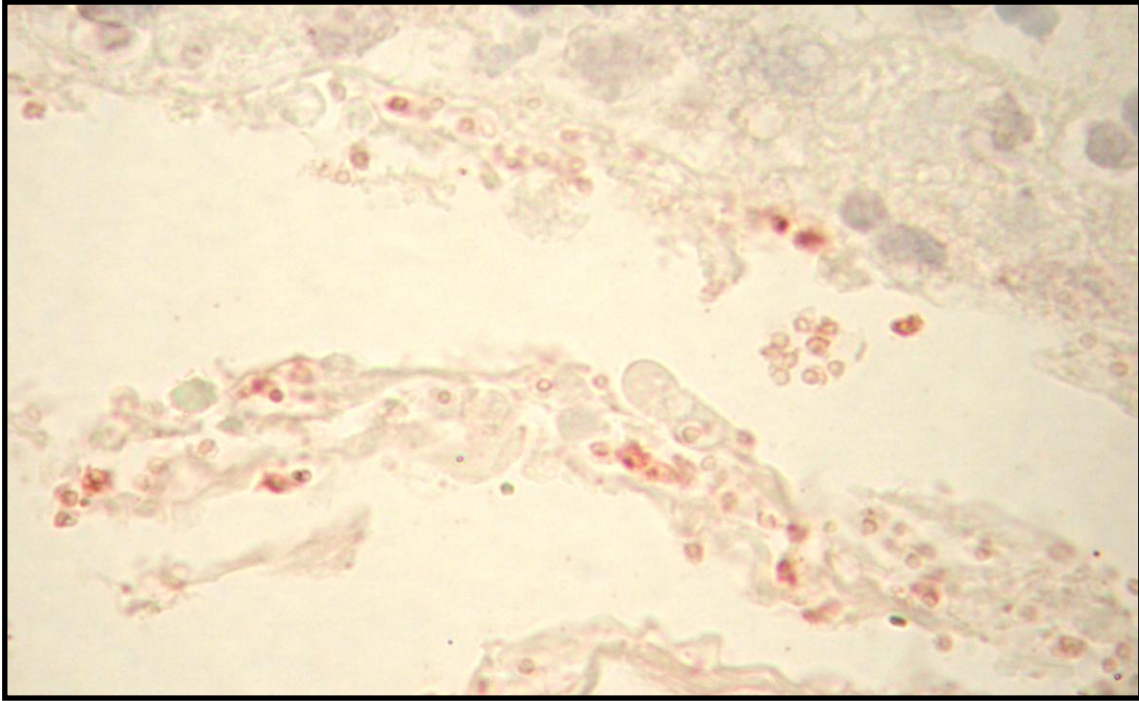


Figura 11. IHQ de hígado, positiva a *T. gondii* (color rojo) del primer ratón muerto. 100X

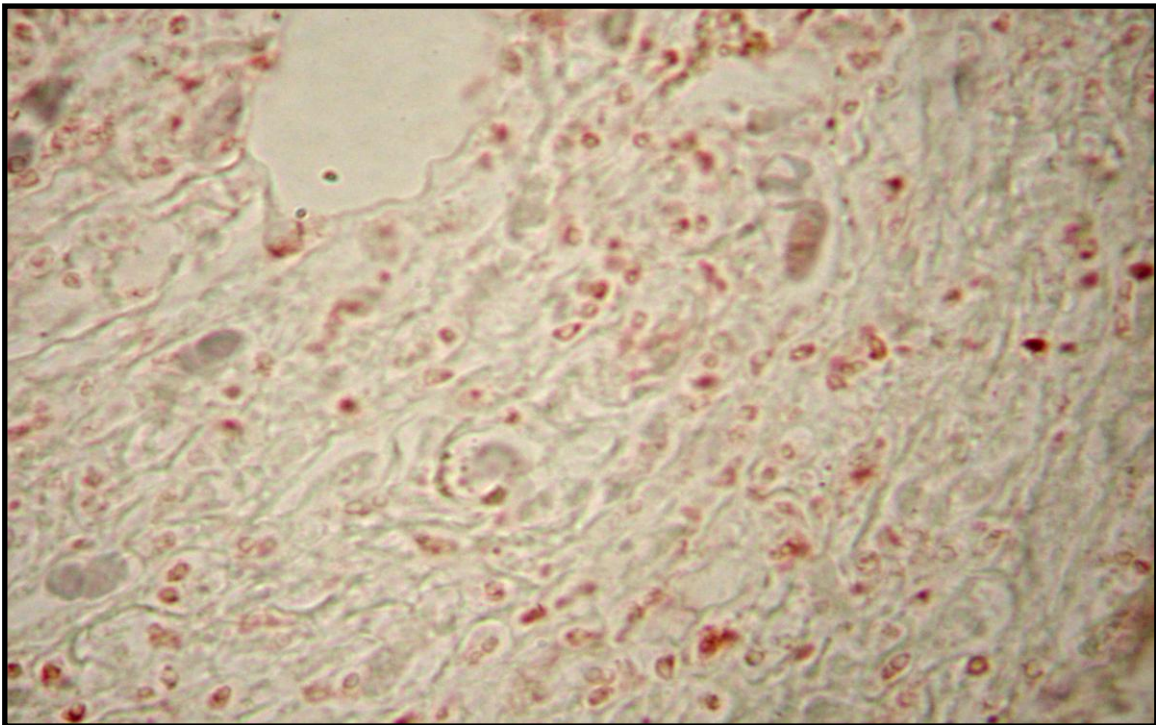
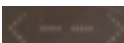


Figura 12. IHQ de mesenterio, positiva a *T. gondii* (color rojo) del primer ratón muerto. 100X



Figura 13. MET de taquizoito de *T. gondii*, mostrando las roptrias tipo laberintina (☆).

M50000  .15μm

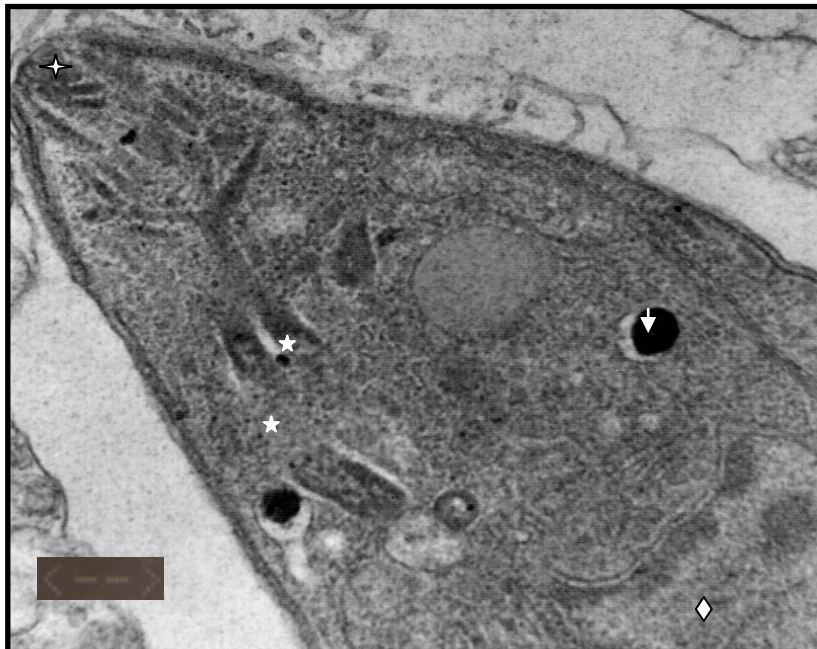
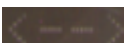


Figura 14. MET de taquizoito de *T. gondii*, mostrando las roptrias (☆), complejo apical

(↔), micronemas (▼), núcleo (◇). M30000  .25μm

#### ANEXO 4. IMÁGENES DEL SEGUNDO ROEDOR MUERTO

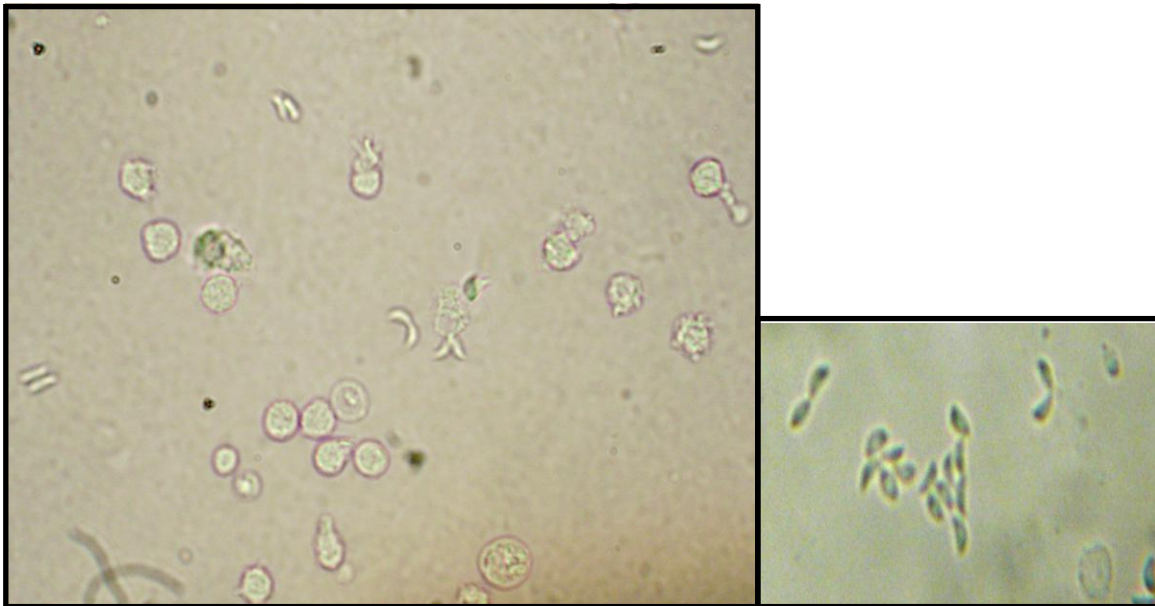


Figura 15. Líquido peritoneal con taquizoitos del segundo ratón muerto.

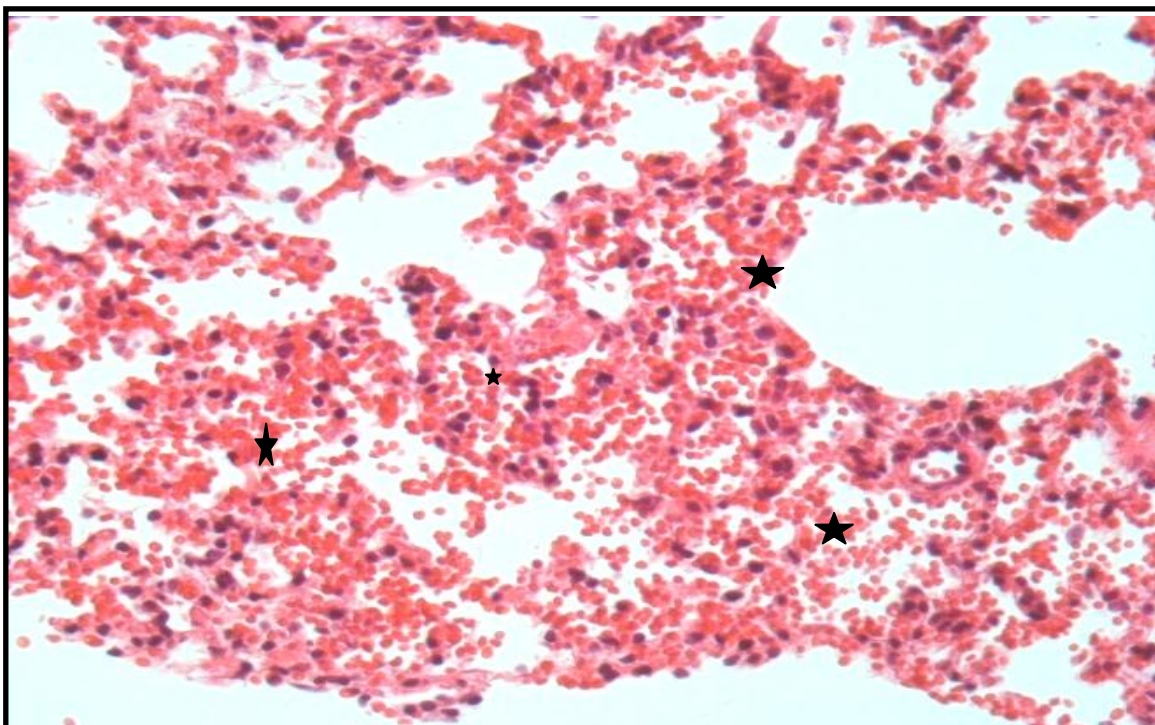


Figura 16. Fotomicrografía de pulmón del segundo ratón muerto. Se aprecia una zona hemorrágica (\*). H&E, 40X.

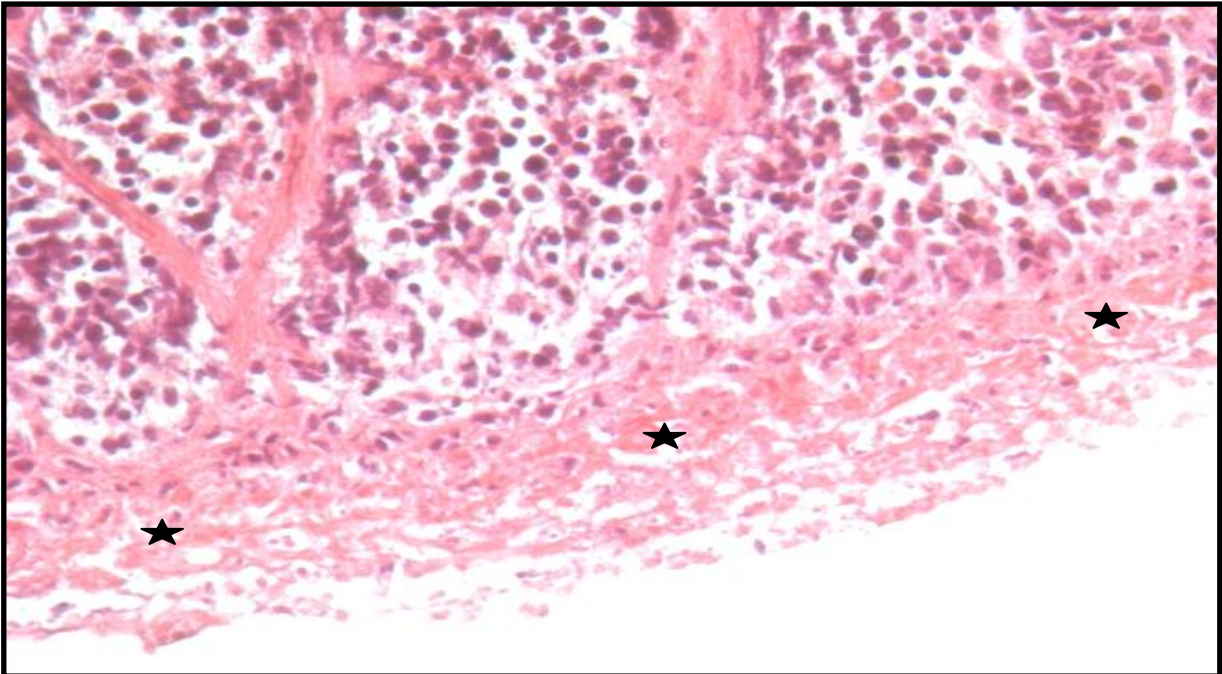


Figura 17. Fotomicrografía de bazo del segundo ratón muerto. Se observa serositis moderada a severa (★). H&E, 40X.

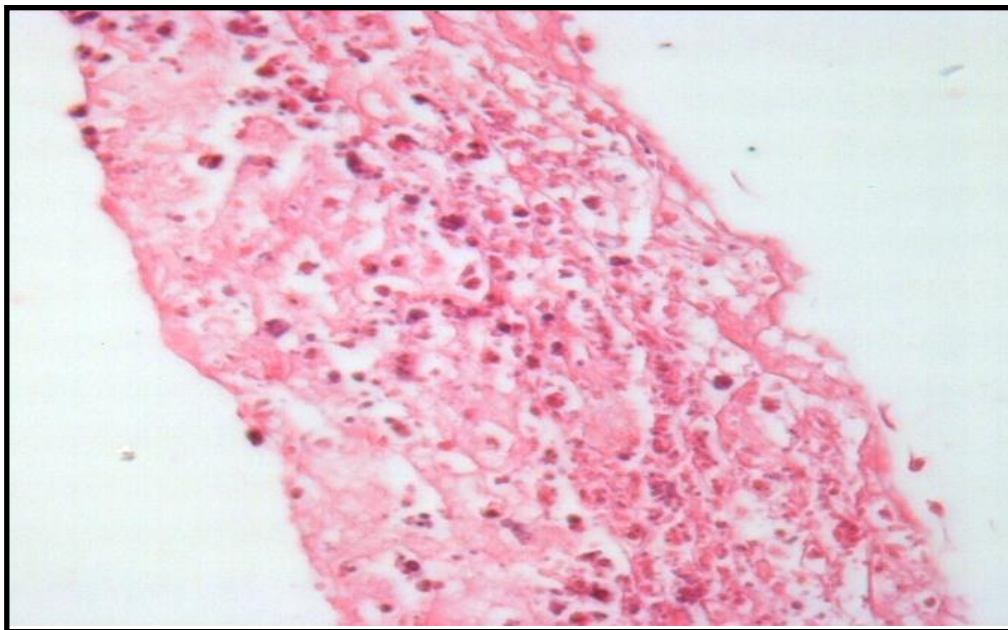


Figura 18. Fotomicrografía de mesenterio del segundo ratón muerto. Se muestra peritonitis severa con estructuras parasitarias. H&E, 100X.

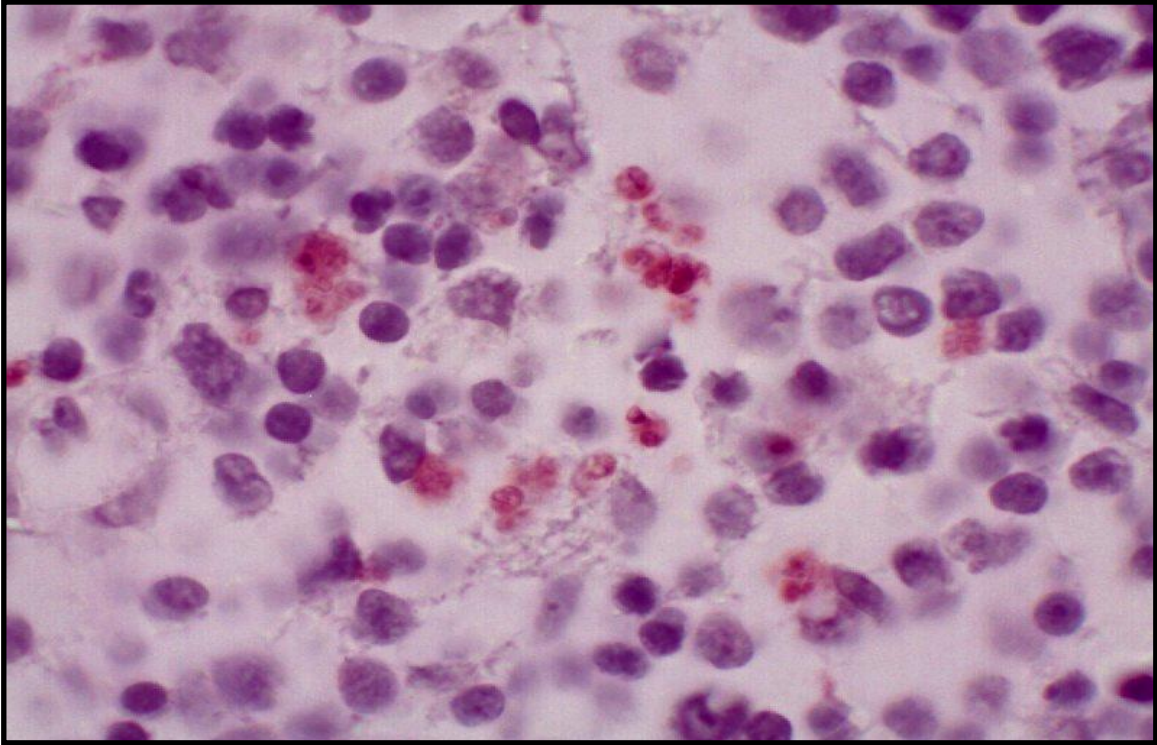


Figura 19. IHQ de bazo, positiva a *T. gondii* (color rojo) del segundo ratón muerto.

100X

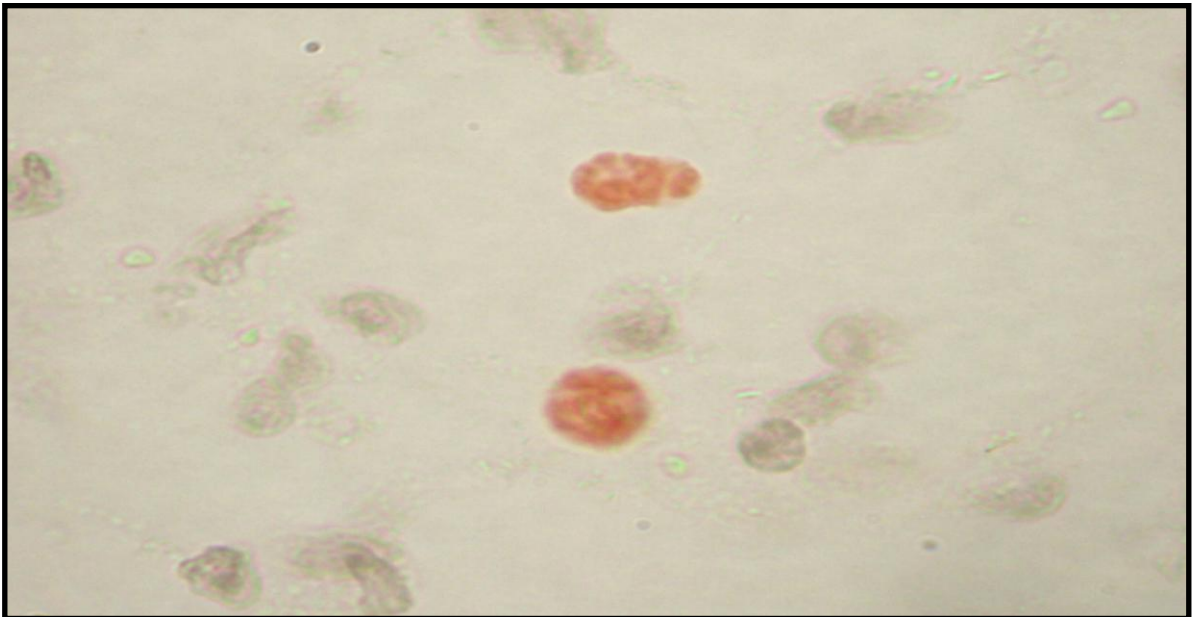
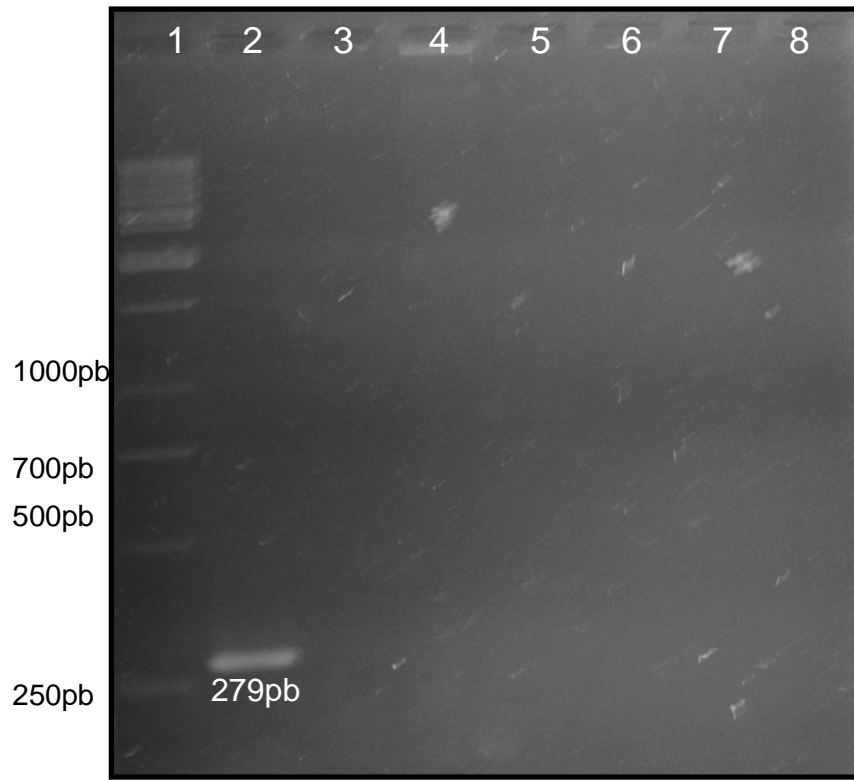


Figura 20. IHQ de pulmón, positiva a *T. gondii* (color rojo) del segundo ratón muerto, en el cual se observa dos grupos de taquizoitos. 100X

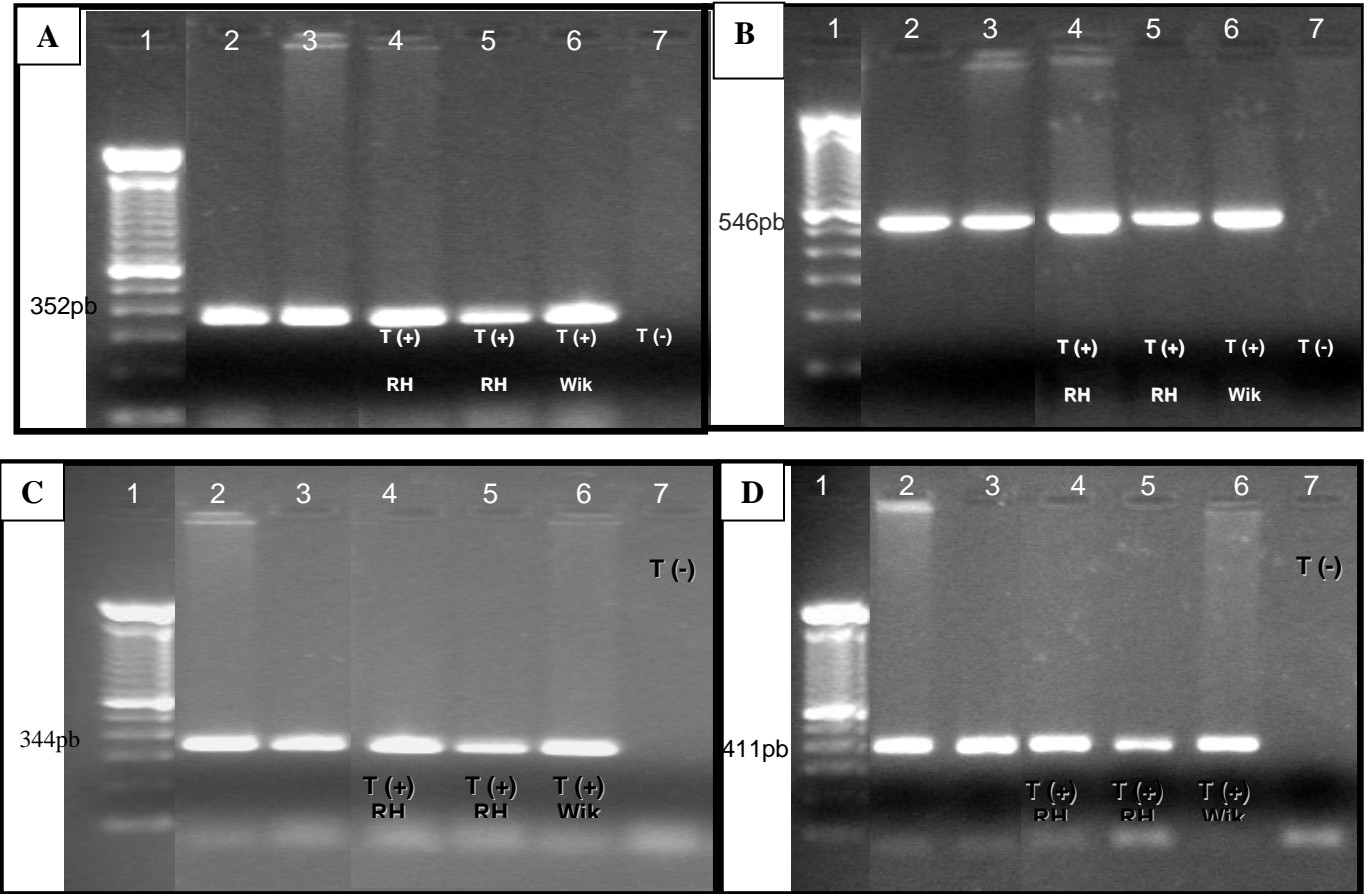


## ANEXO 5. IMÁGENES DE PRUEBAS MOLECULARES



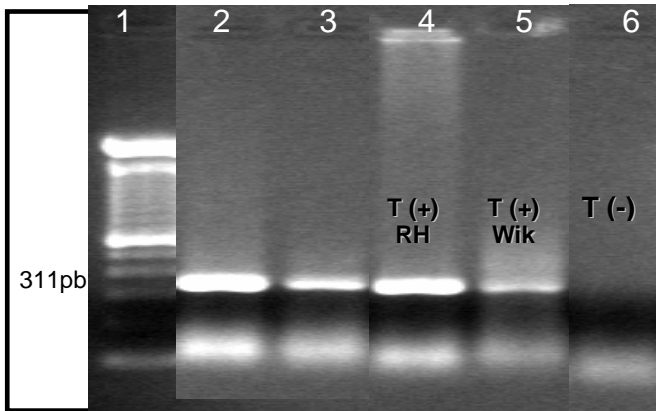
Carril 1: Marcador de tamaño  
Carril 2: Testigo positivo (vacuna)  
Carril 3: Testigo negativo (agua)  
Carril 4: Líquido peritoneal del primer ratón muerto  
Carril 5: Líquido peritoneal del ratón 2° pase  
Carril 6 y 7: Macerado de órganos del ratón (2° pase)  
Carril 8: Células Vero infectadas con cepa RH de *Toxoplasma gondii* (Testigo negativo)

Figura 21. PCR para *Neospora caninum*. Muestras negativas a la amplificación del *its1*.



Carril 1: Marcador de tamaño para 100pb  
 Carril 2: Taquizoitos 5 millones  
 Carril 3: Taquizoitos 200 millones  
 Carril 4, 5 y 6: Testigos positivos  
 Carril 7: Testigo negativo (agua)

Fiura 22. PCR para *T. gondii* de diferentes genes: Panel A: para *B1*, panel B: *SAG2*,  
 panel C: *GRA6* , panel D: *βTUB*. RH: cepa RH, Wik : cepa Wiktor de *T. gondii*



Carril 1: Marcador de tamaño para 100pb  
 Carril 2: Taquizoitos 5 millones  
 Carril 3: Taquizoitos 200 millones  
 Carril 4 y 5: Testigos positivos  
 Carril 6: Testigo negativo (agua)

Figura 23. PCR de SAG3 de *T. gondii*. RH: cepa RH, Wik: cepa Wiktor de *T. gondii*

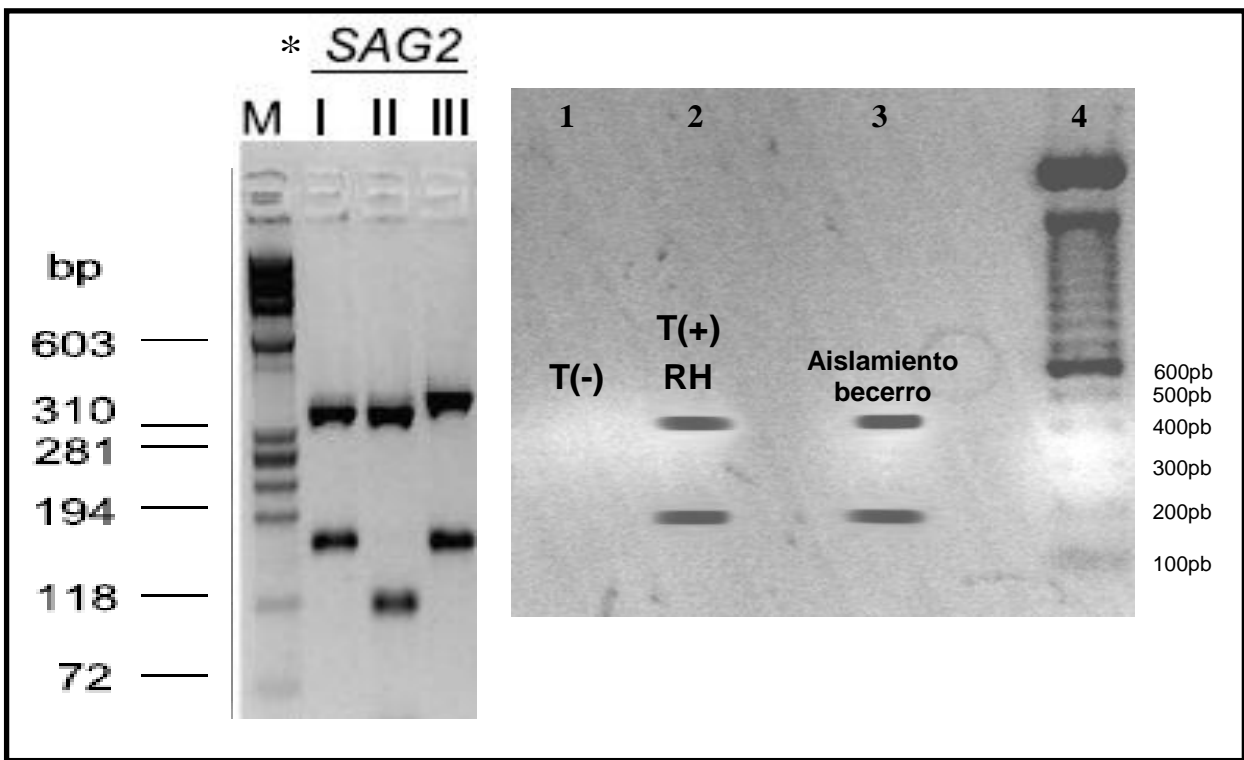


Figura 24. RFLP-PCR del aislamiento de becerro con *sag2* de *T. gondii*. Carril 1: testigo negativo (agua), carril 2: cepa RH de *T. gondii*, carril 3: taquizoitos del becerro, carril 4: marcador de tamaño. \* Imagen de referencia, Su *et al.*, 2006

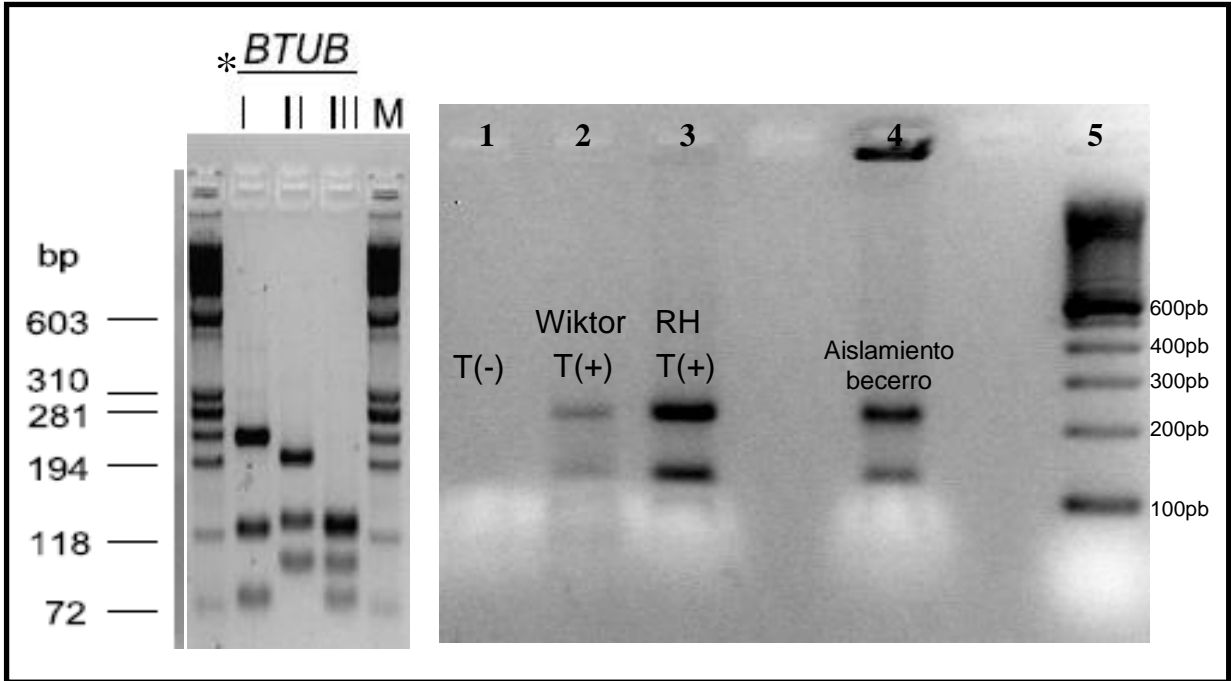
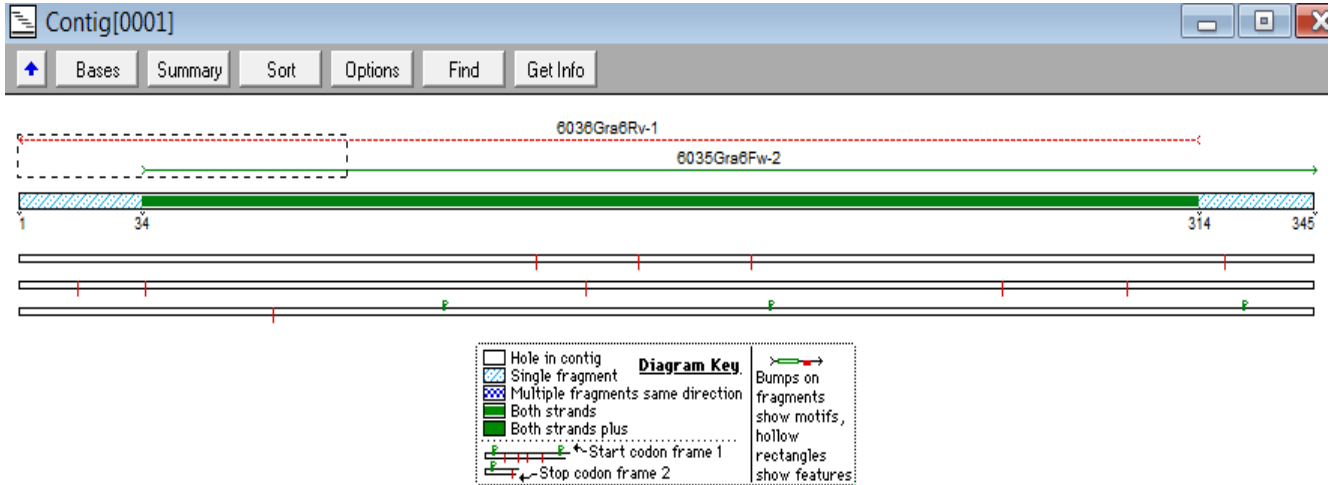


Figura 25. RFLP-PCR del aislamiento de becerro con  $\beta TUB$  de *T. gondii*. Carril 1: testigo negativo (agua), carril 2: cepa wiktor de *Toxoplasma*, carril 3: cepa RH de *T. gondii*, carril 4: taquizoitos del becerro, carril 5: marcador de tamaño. \* Imagen de referencia, Su *et al.*, 2006

## SECUENCIA EDITADA CON EL PROGRAMA SEQUENCHER

### OBTENIDA CON *gra6* DE *T. gondii*



**TTTCCGAGCAGGTGACCT**GGGTCGCTTTTTTTGAAA  
CAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGCCACGTAGCG  
TGCTTGTTGGCGACTACCTTTTTTTTCTTGGGAGTGT  
CGGCGAAATGGCACACGGTGGCATCCATCTGAGG  
CAGAAGCGTAACTTCTGTCCTGTA ACTGTCTCCAC  
AGTTGCTGTGGTCTTTGTAGTCTTCATGGGTGTAC  
TCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGCAGC  
AGACAGCGGTGGTGTAA**GCAGACCCCTTCGGAA**

Figura 26. Secuencia obtenida con *gra6* de *T. gondii*

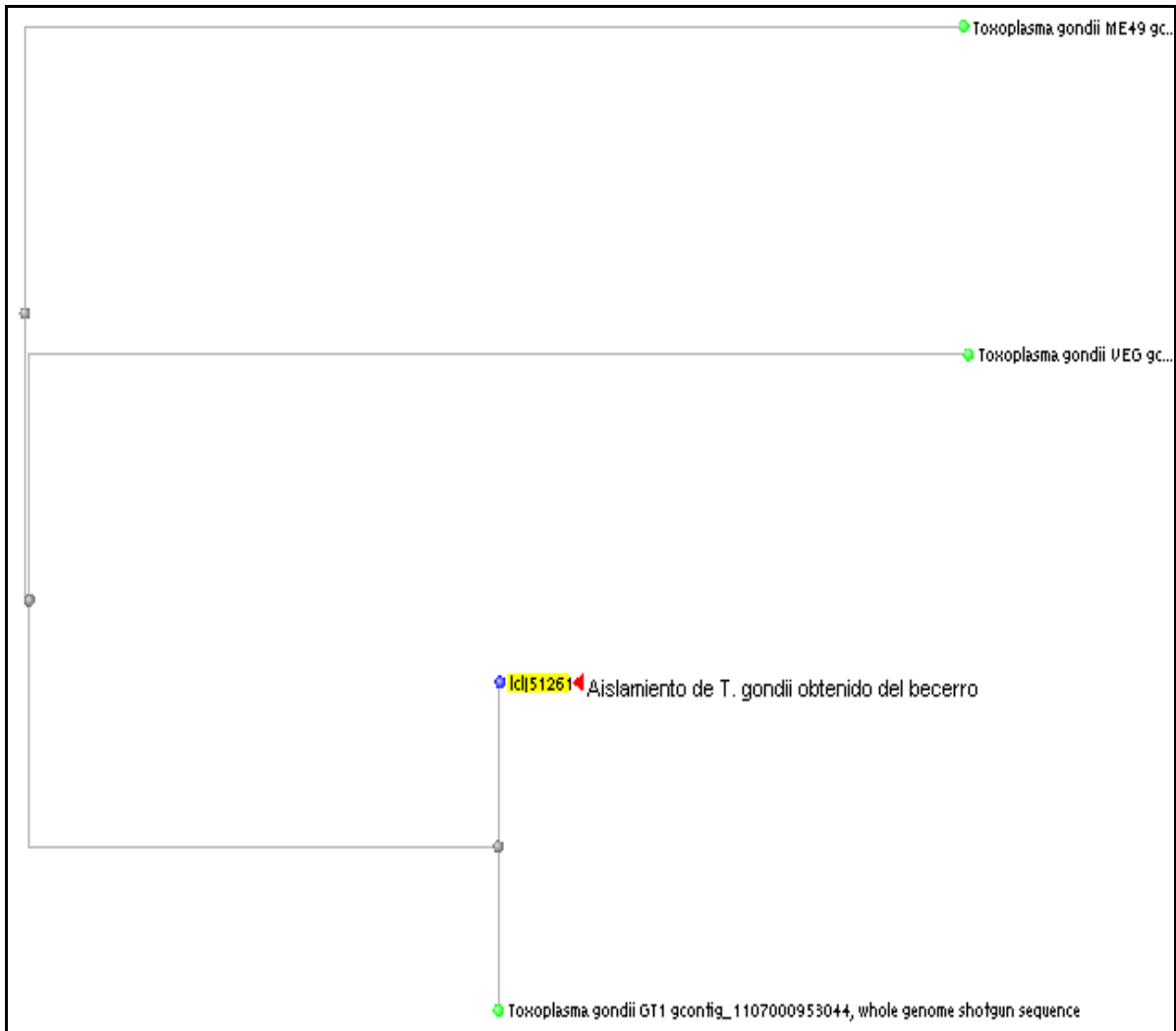


Figura 27. Árbol que relaciona al aislamiento de *T. gondii* del becerro con tres cepas de referencia de *T. gondii* (GT1, ME49 y VEG), genotipos I, II y III, respectivamente con *gra6*

**ALINEAMIENTO DE LA CEPA AISLADA DEL BECERRO CON TRES CEPAS DE REFERENCIA DE *T. gondii* (GT1, ME49 y VEG), GENOTIPOS I, II y III, RESPECTIVAMENTE. SECUENCIA OBTENIDA CON *gra6***

```

Becerro      TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGC 60
GT1          TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGC 60
VEG          TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGC 60
ME49        TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGC 60
*****

Becerro      CACGTAGCGTGCTTGTGGCGACTACCTTTTTTCTTGGGAGTGTGCGCGAAATGGCACA 120
GT1          CACGTAGCGTGCTTGTGGCGACTACCTTTTTTCTTGGGAGTGTGCGCGAAATGGCACA 120
VEG          CACGTAGCGTGCTTGTGGCGACTACCTTTTTTCTTGGGAGTGTGCGCGAAATGGCACA 120
ME49        CACGTAGCGTGCTTGTGGCGACTACCTTTTTTCTTGGGAGTGTGCGCGAAATGGCACA 120
*****

Becerro      CGGTGGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCTGTAACGTCTCCACAGTTGC 180
GT1          CGGTGGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCTGTAACGTCTCCACAGTTGC 180
VEG          CGGTGGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCTTAACTGTCTCCACAGTTGC 180
ME49        CGGTGGCATCTATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCTTAACTGTCTCCACAGTTGC 180
*****

Becerro      TGTGGTCTTTGTAGTCTTCATGGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGC 240
GT1          TGTGGTCTTTGTAGTCTTCATGGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGC 240
VEG          TGTGGTCTTTGTAGTCTTCATGGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGC 240
ME49        TGTGGTCTTTGTAGTCTTCATGGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGC 240
*****

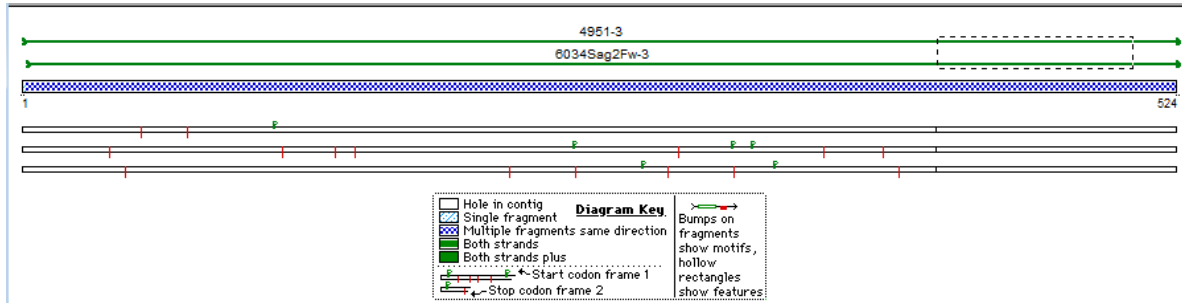
Becerro      AGCAGACAGCGGTGGTGTAAAGCAGACCCCTTCGGAA 277
GT1          AGCAGACAGCGGTGGTGTAAAGCAGACCCCTTCGGAA 277
VEG          AGCAGACAGCGATGGTGTAAAGCAGACCCCTTCGGAA 277
ME49        AGCAGACAGCGGTGGTGTAAAGCAGACCCCTTCGGAA 277
*****

```

Figura 28. Comparación del aislamiento obtenido del becerro con tres cepas de referencia de *T. gondii*.

## SECUENCIA EDITADA CON EL PROGRAMA SEQUENCHER

### OBTENIDA CON *sag2* DE *T. gondii*



ATCTGTGTGTTGTTTCCGGGTTGCAGTTCTAGGAA  
CTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCGGTGTGACAC  
CTTCTGTCTCGTTC CAATCTTTGTCTTGTCGGAAC  
TATGAGTTTCTCAAAGACCACGAGCCTAGCGTCGC  
TAGCGCTCACGGGCTTGTTTGTGTTCAAGTTC  
GCTCTTGCGTCCACCACCGAGACGCCAGCGCCCA  
TTGAGTGCACTGCCGGCGCAACGAAGACTGTTGA  
TGCACCCTCCAGTGGTTCGTTGTCTTCCAATGTG  
GGGATAAACTAACCATCAGTCCAGTGGCGAAGG  
TGATGTCTTTTATGGCAAGGAATGCACAGACTCGA  
GGAAGTTGACGACTGTCCTTCCAGGTGCGGTCTT  
GACAGCTAAGGTCCAGCAGCCCGCGAAAGGTCCT  
GCTACCTACACACTGTCTTACGACGGTACTCCCGA  
GAAACCTCAGGTTCTCTGTTACAAGTGCGTTGCCG  
AAGCAG**GTGCTCCCGCTGGTCGAAAT**

Figura 29. Secuencia obtenida con el antisentido de *sag2* de *T. gondii*





Figura 30. Árbol que relaciona al aislamiento de *T. gondii* del becerro con tres cepas de referencia de *T. gondii* (GT1, ME49 y VEG), genotipos I, II y III, respectivamente con el gen *sag2*

**ALINEAMIENTO DE LA CEPA AISLADA DEL BECERRO CON TRES CEPAS DE REFERENCIA DE *T. gondii* (GT1, ME49 y VEG), GENOTIPOS I, II y III, RESPECTIVAMENTE. SECUENCIA OBTENIDA CON EL ANTISENIDO DE *sag2***

```

Becerro          TCTGTGTGTTGTTTC-CGGGTTGCAGTTCCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGC 59
GT1              TCTGTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGC 60
VEG              -CTGTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGC 59
ME49             TCTGTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGC 60
                *****

Becerro          GGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAA 119
GT1              GGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAA 120
VEG              GGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAA 119
ME49             GGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAA 120
                *****

Becerro          GACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTGTTGTGTTCAAGTTCGCTCT 179
GT1              GACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTGTTGTGTTCAAGTTCGCTCT 180
VEG              GACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTGTTGTGTTCAAGTTCGCTCT 179
ME49             GACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTGTTGTGTTCAAGTTCGCTCT 180
                *****

Becerro          TCGTCCACCACCGAGACGCCAGCGCCCATTTGAGTGCAC TGCCGGCGCAACGAAGACTGT 239
GT1              TCGTCCACCACCGAGACGCCAGCGCCCATTTGAGTGCAC TGCCGGCGCAACGAAGACTGT 240
VEG              TCGTCCACCACCGAGACGCCAGCGCCCATTTGAGTGCAC TGCCGGCGCAACGAAGACTGT 239
ME49             TCGTCCACCACCGAGACGCCAGCGCCCATTTGAGTGCAC TGCCGGCGCAACGAAGACTGT 240
                *****

Becerro          TGATGCACCCTCCAGTGGTTCCGTTGTCTTTCCAATGTGGGGATAAACTAACCATCAGTCC 299
GT1              TGATGCACCCTCCAGTGGTTCCGTTGTCTTTCCAATGTGGGGATAAACTAACCATCAGTCC 300
VEG              TGATGCACCCTCCAGTGGTTCCGTTGTCTTTCCAATGTGGGGATAAACTAACCATCAGTCC 299
ME49             TGAGGCACCCTCCAGTGGTTCCGTTGTCTTTCCAATGTGGGGATAAACTAACCATCAGTCC 300
                *** *****

Becerro          CAGTGGCGAAGGTGATGTCTTTTATGGCAAGGAATGCACAGACTCGAGGAAGTTGACGAC 359
GT1              CAGTGGCGAAGGTGATGTCTTTTATGGCAAGGAATGCACAGACTCGAGGAAGTTGACGAC 360
VEG              CAGTGGCGAAGGTGATGTCTTTTATGGCAAGGAATGCACAGACTCGAGGAAGTTGACGAC 359
ME49             CAGTGGCGAAGGTGATGTCTTTTATGGCAAGGAATGCACAGACTCGAGGAAGTTGACGAC 360
                *****

Becerro          TGTCTTCCAGGTGCGGTC TTGACAGCTAAGGTCCAGCAGCCCGCAAAGGTCCTGCTAC 419
GT1              TGTCTTCCAGGTGCGGTC TTGACAGCTAAGGTCCAGCAGCCCGCAAAGGTCCTGCTAC 420
VEG              TGTCTTCCAGGTGCGGTC TTGACAGCTAAGGTCCAGCAGCCCGCAAAGGTCCTGCTAC 419
ME49             TGTCTTCCAGGTGCGGTC TTGAAAGCTAAGGTCCAGCAGCCCGCAAAGGTCCTGCTAC 420
                *****

Becerro          CTACACACTGTCTTACGACGGTACTCCCGAGAAACCTCAGGTTCTCTGTTACAAGTGCCT 479
GT1              CTACACACTGTCTTACGACGGTACTCCCGAGAAACCTCAGGTTCTCTGTTACAAGTGCCT 480
VEG              CTACACACTGTCTTACGACGGTACTCCCGAGAAACCTCAGGTTCTCTGTTACAAGTGCCT 479
ME49             CTACACACTGTCTTACGACGGTACTCCCGAGAAACCTCAGGTTCTCTGTTACAAGTGCCT 480
                *****

Becerro          TGCCGAAGCAGGTGCTCCCGCTGGTCGAAAT 510
GT1              TGCCGAAGCAGGTGCTCCCGCTGGTCGAAAT 511
VEG              TGCCGAAGCAGGTGCTCCCGCTGGTCGAAAT 510
ME49             TGCCGAAGCAGGTGCTCCCGCTGGTCGAAAT 511
                *****

```

Figura 31. Comparación del aislamiento obtenido del becerro con tres cepas de referencia de *T. gondii*.