



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA
TOXOPLASMOSIS FELINA, EN EL COMPLEJO AGROPECUARIO
E INDUSTRIAL DE TIZAYUCA, HIDALGO.**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

M.V.Z. LIZBETH RAMÍREZ PÉREZ

TUTOR

DR. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA
(Universidad Nacional Autónoma de México)

COMITÉ TUTORAL:

M. EN C. HERIBERTO CABALLERO ORTEGA
(Instituto Nacional de Pediatría)

DRA. ROSALINDA ACOSTA SALINAS
(Universidad Autónoma del estado de Hidalgo)

MÉXICO D. F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la asesoría del M. en C. Heriberto Caballero Ortega.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), Hidalgo.

Al Centro de Enseñanza de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca asignada.

Dedicatoria

A ti agradezco por todo el gran amor, por la fuerza, y la valentía que toda mi vida me has dado, por toda la luz que has proyectado en mi camino y por todas las grandes personas que siempre has puesto en mi camino.

A ustedes mis amigos incondicionales, quienes han compartido conmigo cada paso en mi vida, quienes me han guiado, reído y llorado a mi lado en cada progreso de mi camino, a aquellos que estarán conmigo hasta el final..... Mis Padres: Prospero Ramírez Terrazas y Rosa Pérez Vargas y hermanas: Alejandra y Claudia Ramírez Pérez.

A una gran mujer mi abuelita: “Mi cabecita blanca”, gracias por ser el ángel que cuida y guía mis pasos. Siempre estas presente en mi mente y corazón.

Agradecimientos

A la Dra. María Dolores Correa Beltrán por haberme permitido ser parte de su maravilloso equipo de trabajo, e inspirar en mi mucha admiración.

A mi tutor el Dr. José Juan Martínez Maya y a mi comité tutorial: Dra. Rosalinda Acosta Salinas y el MC. Heriberto Caballero Ortega por su apoyo, paciencia, por compartir sus conocimientos y experiencias, siempre con la finalidad de mejorar el trabajo, y su inestimable ayuda. Muchas gracias.

Al jurado: Dra. Evangelina Romero Callejas, Dr. Mario Adán Bedolla Alva, Dr. Pablo Martínez Labat y el Dr. Julio V. Figueroa Millán por sus observaciones y sugerencias con el fin de mejorar el trabajo.

Al Dr. Mario Santa Cruz y al Dr. Mario Adán Bedolla, por todo el apoyo brindado.

A los compañeros del laboratorio de Inmunología Experimental: Esther, José Luis, Rafael, Héctor, Irma, Belinda, Claudia, José Antonio. Pero en especial a Carlos, Alejandro, Luis Fernando, Lizbeth y Ana Laura, porque desde un inicio me tendieron la mano, por no solo compartir sus conocimientos académicos sino también personales, por las horas de comida compartidas, nuestros días culturales y los viajes compartidos, todos y cada uno ocupa un lugar especial en mi corazón.

A todos mis profesores no solo de la carrera sino de todo la vida, mil gracias porque de alguna manera forma parte de lo que soy ahora.

A mis amigos que he ido conociendo a lo largo de mi vida porque gracias a ellos sé lo que es la amistad verdadera, valor importante en mi vida, gracias por estar conmigo este tiempo, por aconsejarme, regañarme, compartir risas y llantos en todo este tiempo. Al Dr. Orbelín Soberanis Ramos, MCV. José Antonio Romero López, y al Dr. Jorge García Montiel por el apoyo brindado en la campaña de esterilización.

Al MC. Francisco Javier V y al HT José Eduardo Farfán M, por apoyo para el procesamiento de las muestras destinadas a la técnica de histopatología.

Resumen

El objetivo del trabajo fue realizar una caracterización epidemiológica de la toxoplasmosis felina en establos lecheros del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), Hidalgo. Se obtuvo sangre de 70 gatos (22 sin dueño y 48 con dueño), para determinar anticuerpos IgG contra *T. gondii* mediante ELISA indirecto. Los animales seropositivos fueron eutanasiados y se tomaron muestras para histopatología, aislamiento del parásito e identificación molecular. En cada unidad de producción se aplicó un cuestionario para determinar algunas características de tenencia de los animales. Se encontraron 12 (17.1%) animales serológicamente positivos (7 sin dueño y 5 con dueño). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la edad ni al género, se encontró como posible factor de riesgo para la infección con *T. gondii* incluir comida cruda en la dieta del gato ($p=0.03$, RM= 21.2, IC 1.8–536.2). Microscópicamente no se encontraron lesiones sugerentes a infección por *T. gondii*; sin embargo, se encontró *Sarcocystis* spp en musculo estriado esquelético del diafragma de un gato y en 3 gatos se encontró *Aelurostrongylus abstrusus* en pulmón. De cinco tejidos positivos por PCR en tiempo real al marcador molecular B1 de *T.gondii*, por PCR punto final solo amplificaron productos en dos de los gatos. En cerebro del gato 48 para los marcadores B1 y SAG3, y en diafragma para el marcador de secuencias repetidas en tándem. En el gato 21 solo amplificó en corazón para el marcador de secuencias repetidas en tándem. Se caracterizaron genéticamente dos muestras, una de cerebro del gato 48, realizada a partir del marcador SAG3, esto sugiere que presenta alelos para el genotipo I. La segunda muestra genotificada corresponde al aislamiento en un ratón inoculado con cerebro del gato 49, en donde se observó un patrón de alelos sugerentes al genotipo III. Se logró el aislamiento del parásito a partir del cerebro del gato 49, subsecuente de un segundo pase en ratones Balb/C. Se considera importante abundar en el conocimiento de los tipos de cepas existentes en esa región mediante la realización de un estudio de genotipificación de *Toxoplasma gondii* en gatos doméstico.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, gato, ELISA indirecto, genotipos

Abstract

The objective of the study was to perform an epidemiological characterization of feline toxoplasmosis in dairy farms of the Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca, Hidalgo in Mexico. A total of 70 cat blood samples (22 without and 48 with an owner respectively), were obtained from, each cat to determine IgG antibodies against *T. gondii* by indirect ELISA. In each production unit a questionnaire was used to determine some characteristics of tenure animals. Overall there were 12 (17.1%) positive animals (7 without and 5 with owner). There were no statistical differences in terms of age or gender. A possible risk factor for infection with *Toxoplasma gondii* in cats was found: including a raw food diet ($p=0.03$, RM= 21.2, IC 1.8 – 536.2). Microscopically no lesions suggesting *T. gondii*. However in one cat *Sarcocystis spp* were identified in diaphragm), and *Aelurostrongylus abstrusus* was found in lungs of 3 cats. Five tissue specimens resulted positives to *T.gondii* B1 marker by real time-PCR). Endpoint PCR-amplified products were obtained: in brain of cat 48, using the B1 and SAG3 markers and in diaphragm of cat 48) using for the tandem repeat sequences marker, whereas in heart tissue of cat 21, only the tandem repeat sequences marker was amplified. It was possible to genetically characterize two samples, one corresponding to the SAG3 marker amplicon obtained from, brain of cat 48 suggesting alleles for genotype I. The second genotyping corresponds to the isolate obtained from a mouse inoculated with brain of cat 49, showing a pattern suggesting alleles III genotype. *T.gondii* isolation was successfully obtained from brain tissue of cat 49, after a second passage in Balb/C mice. It is considered important to elaborate on the knowledge for the types of strains found in the region by conducting a genotyping study of *T. gondii* in domestic cats.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, cat, ELISA indirect, genotypes

Índice

1. Introducción	1
1.1 Definición	1
1.2 Estadios del desarrollo	1
1.3 Ciclo biológico	4
1.4 Importancia en la salud pública	6
1.5 Transmisión	7
1.6 Factores de riesgo asociados a la infección por <i>T. gondii</i>	8
1.7 Toxoplasmosis en gatos	8
1.8 Patogenia	9
1.9 Genética de <i>T. gondii</i>	11
1.10 Diagnóstico	13
1.10.1 Aislamiento	13
1.10.2 Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)	14
1.10.3 Anatomopatología	15
1.10.4 Biología molecular	16
2. Justificación	17
3. Hipótesis	18
4. Objetivos	18
5. Material y métodos	18
5.1 Tipo de estudio:	18
5.2 Lugar de estudio	19
5.3 Georreferenciación de los establos	19
5.4 Determinación de la población humana y de animales (gatos y perros)	19
5.5 Análisis de datos	19
5.6 Criterios de inclusión y exclusión	19
5.7 Obtención de muestras	20
6. Diagnóstico de Toxoplasmosis	20

6.1 ELISA	20
6.2 Eutanasia y necropsia de gatos:.....	20
6.3 Histopatología:.....	21
6.4 Biología molecular	21
6.4.1 Extracción de ADN:	21
6.4.2 Cuantificación y pureza del ADN:.....	21
6.4.3 Amplificación del ADN.....	22
6.5 PCR-RFLP	24
6.6 Bioensayo	24
6.6.1 Aislamiento en ratones Balb/c	24
6.6.2 Obtención lavado peritoneal.....	25
6.6.3 Determinación de anticuerpos contra <i>T.gondii</i> en ratones	25
6.6.4 Necropsia	25
7. Resultados	26
7.1 Caracterización epidemiológica.....	26
7.1.1 Población humana:.....	26
7.1.2 Tenencia de mascotas y presencia de ratas:	26
7.1.3 Determinación de toxoplasmosis y factores de riesgo:.....	26
7.2 Necropsia y hallazgos macroscópicos.....	27
7.3 Hallazgos microscópicos:	28
7.4 Biología molecular	31
7.5 PCR en tiempo real	31
7.6 PCR punto final de los tejidos de gatos	31
7.7 Determinación de anticuerpos contra <i>T.gondii</i> en ratones.....	35
7.8 Necropsia	35
7.9 PCR punto final del ratón inoculado con cerebro del gato 49.....	36
7.10 PCR-RFLP	38

8. Discusión	40
9. Conclusiones	45
10. Bibliografía	46
11. Anexos	54
ANEXOS I: Preparación de soluciones.....	54
ANEXOS II: Técnicas de laboratorio	56

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> descritos es México	12
Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación del ADN (PCR) de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
Cuadro 3. Frecuencia de anticuerpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo	59
Cuadro 4. Frecuencia de anticuerpos <i>Toxoplasma gondii</i> por género en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo	59
Cuadro 5. Relación de seropositividad por edad de anticuerpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo	59
Cuadro 6. Tipo de dieta proporcionada a los gatos y su relación con la seropositividad a anticuerpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo	60
Cuadro 7. Muestra los resultados histopatológicos en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo	28
Cuadro 8. Resultados de la técnica de PCR tiempo real (B1), para <i>Toxoplasma gondii</i> en gatos del CAIT. Tizayuca. Hidalgo (2013)	31
Cuadro 9. Resultados de la técnica de PCR punto final, para <i>Toxoplasma gondii</i> en gatos del CAIT. Tizayuca. Hidalgo (2013)	35

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Estadios de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figura 3. Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en gatos en México	8
Figura 4. Etapas del proceso de invasión celular de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Figura 5. Distribución de la población de mascotas en el CAIT. Tizayuca. Hidalgo (2013)	61
Figura 6. Distribución de gatos con dueño y sin dueño en el CAIT. Tizayuca. Hidalgo (2013)	62
Figura 7. Presencia de ratas en establos, del CAIT. Tizayuca. Hidalgo (2013)	63
Figura 8. Establos con gatos positivos a ELISA, en el CAIT. Tizayuca. Hidalgo (2013)	64
Figura 9. Parénquima pulmonar, se observaron nódulos superficiales subpleurales (**) de color grisáceo	27
Figura 10. Quiste tisular de <i>Sarcocystis spp.</i> en diafragma	29
Figura 11. Espacios alveolares con larvas de <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> en pulmón	29
Figura 12. Inmunohistoquímica a <i>Toxoplasma gondii</i>	30
Figura 13. PCR punto final para la detección del gen <i>B1</i>	32
Figura 14. PCR punto final para la detección del gen <i>SAG3</i>	33
Figura 15. PCR punto final para la detección de la Secuencia repetida en Tándem	34
Figura 16. Cinética de IgM contra <i>Toxoplasma gondii</i> de ratones inoculados con órganos de gato seropositivo (G49) de Tizayuca	65
Figura 17. Cinética de IgG contra <i>Toxoplasma gondii</i> de ratones	65
Figura 18. Quiste tisular de <i>T.gondii</i> en impronta de cerebro de ratón	36
Figura 19. PCR punto final para la detección de <i>GRA6</i>	37
Figura 20. PCR-RFLP del gen <i>SAG3</i>	38
Figura 21. PCR-RFLP del gen <i>GRA6</i>	39

1. Introducción

1.1 Definición

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un protozoario intracelular obligado, pertenece al Phylum Apicomplexa, clase Sporozoasida, subclase Coccidiasina, orden Eimeriorina y familia Toxoplasmatida y hasta el momento, es la única especie descrita para el género. Este Phylum abarca más de 5000 especies de parásitos intracelulares obligados, muchos de ellos importantes en medicina veterinaria y humana como *Plasmodium*, *Neospora*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Cyclospora*, *Isospora* y *Eimeria* (Montoya y Liesenfeld, 2004; Bowman, 2004). *Toxoplasma gondii* afecta a animales de sangre caliente, donde los miembros de la familia *Felidae* actúan como hospederos definitivos, como hospederos intermediarios se han encontrado alrededor de 300 especies de mamíferos, incluido el ser humano, los mismos felinos, además de 30 especies de aves. Este parásito puede llegar a causar abortos y enfermedades congénitas en los hospederos intermediarios, lo que hace que *T. gondii* tenga importancia en medicina veterinaria y humana (Dubey, 1998; Dolores *et al.*, 2005; Tenter *et al.*, 2000).

1.2 Estadios del desarrollo

Este protozoario presenta principalmente tres estadios diferentes dentro de su ciclo de vida: taquizoítos, bradizoítos y ooquistes entre otras. (Dubey, 2005). Los taquizoítos miden aproximadamente 2 x 6 µm. Se caracterizan por reproducirse rápidamente, diseminando la infección y provocando daño tisular. Durante la infección aguda se pueden llegar a observar en sangre. Son intracelulares obligados e infectan a cualquier célula nucleada, formando vacuolas parasitóforas en donde se multiplican provocando la liberación de los taquizoítos o bien dar lugar a quistes tisulares (Figura 1) (Dubey, 2005; Dubey, 1998).

Los bradizoítos están contenidos dentro de quistes tisulares, reproduciéndose lentamente. Los quistes tisulares (Figura 1) son formas de resistencia que llegan a alcanzar un tamaño entre 60 a 100 μm , dependiendo del tejido donde se localicen. Los tejidos más afectados son el sistema nervioso central (SNC) y el tejido muscular (corazón y músculo estriado esquelético), donde persisten en forma latente toda la vida, pero en condiciones de inmunodepresión se reactivan, se transforman a taquizoítos y se diseminan (Dubey y Beattie, 1988; Hill y Dubey, 2002). Los ooquistes miden de 11 a 13 μm de diámetro y son eliminados (hasta 10 millones en un solo día) por un período de una a tres semanas en las heces de los felinos. En el momento en que se eliminan son ooquistes no esporulados; sin embargo, en condiciones favorables del medio ambiente como temperatura y humedad alcanzan su estado infeccioso en un periodo de 24 a 48 horas posteriores a su eliminación. Cada ooquiste esporulado (Figura 1), contiene dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno. Esta forma del parásito puede infectar a todos los vertebrados de sangre caliente y está relacionada con diferentes brotes epidemiológicos en humanos (Dubey y Beattie, 1988; Dubey, 1998; Bowman, 2004).

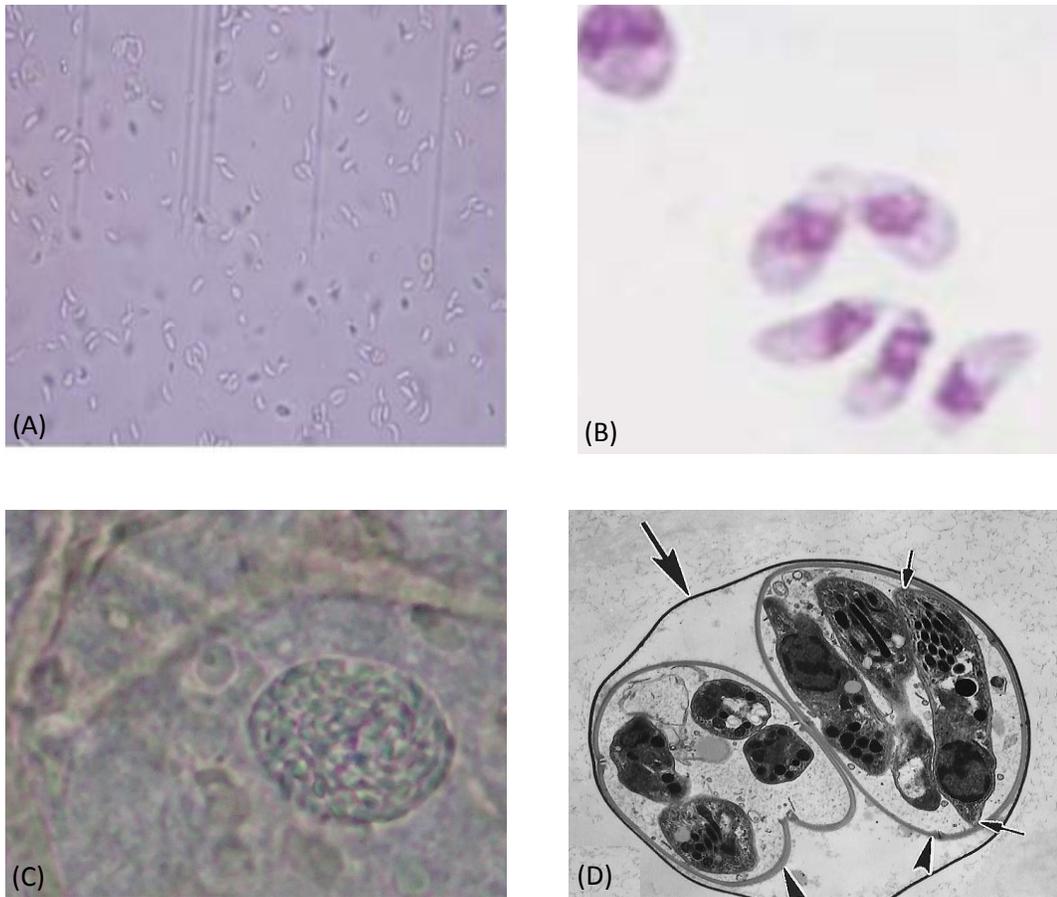


Figura 1. Estadios de *Toxoplasma gondii*. A) Taquizoítos obtenidos mediante lavado peritoneal de ratón inoculado con la cepa Me49. B) Citología de líquido cefalorraquídeo, en donde se observan taquizoítos. C) Impronta de encéfalo de ratón inoculado con cerebro de gato seropositivo a *T. gondii*, en donde se aprecia un quiste tisular. Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría. D) Ooquiste esporulado: Pared del ooquiste (flecha grande), dos espoquistes (puntas de las flechas), esporozoítos (flechas pequeñas). Tomado de Dubey *et al.*, 1998.

1.3 Ciclo biológico

Cuando el hospedador definitivo (gatos o felinos silvestres) ingiere tejidos con quistes tisulares, estos llegan al tracto digestivo y por la acción de los jugos gástricos y enzimas proteolíticas del intestino, los bradizoítos se liberan a la luz invadiendo el epitelio del intestino delgado. Ya en el interior de los enterocitos, se lleva a cabo una primera multiplicación asexual por endodogonia, la cual es una forma especializada de reproducción generando dos progenies o clonas a partir de su antecesor, formando los merozoítos. Los estadios de merozoíto se desarrollan a nivel del epitelio intestinal, generando cinco tipos morfológicos diferentes, denominados A, B, C, D y E.

Los tipos C, D y E se pueden dividir por otra modalidad llamada endopoliogonia, la cual es una forma especializada de reproducción donde se divide el núcleo con múltiples fragmentos generando varios progenies. El conjunto de merozoítos se denominan esquizontes, pudiendo estar presentes desde el tipo B hasta el E, independiente del tipo de reproducción que lleven a cabo. Al final de estas divisiones asexuales, la última multiplicación de parásitos (generaciones tipo D E) da inicio en la fase de división sexual dentro del ciclo de vida y exclusiva de los hospederos definitivos, generando un macro y microgametos (Lindsay *et al*, 1998; Hill *et al*, 2005; Speer y Dubey, 2005). Cuando los microgametos fertilizan al microgameto maduro se genera el cigoto, presentando un núcleo grande con nucleoplasma amorfo delimitado por una membrana con algunos microporos. Conforme madura, el núcleo se divide generando cuatro nuevos núcleos situados a la periferia del cigoto, a su vez, durante esta etapa, se forma dos esporoblastos con dos núcleos cada uno, al mismo tiempo se forma una segunda membrana limitante. Conforme continúa la maduración de la estructura, los esporoblastos adquieren forma elongada formando los esporoquistes y su membrana externa forma la pared del esporoquiste. La formación de los esporozoítos se lleva a cabo dentro de los esporoquistes conforme alcanza la esporulación en condiciones ambientales favorables.

El conjunto de estas divisiones asexuales y sexuales en los enterocitos, representan el ciclo enteroepitelial dentro del ciclo biológico. Conforme los ooquistes maduran y crecen, generan la ruptura del enterocito afectado, liberándose a la luz intestinal, los cuales se eliminarán posteriormente al ambiente a través de la heces del hospedador como ooquiste no esporulado (Tenter *et al*, 200; Hill *et al*, 2005). La carga parasitaria de ooquistes generalmente llega a millones durante el periodo que se eliminan (Montoya, 2004; Fowler y Miller, 2008). Bajo condiciones de laboratorio, gatos infectados pueden llegar a eliminar 500 millones de ooquistes aproximadamente.

En condiciones ambientales, se ha estimado que se pueden encontrar hasta 13 millones de ooquistes por gramo de material fecal de felino infectado (Jones *et al*, 2008). Cuando los hospederos definitivos ingieren taquizoítos u ooquistes de otros felinos, los protozoarios alcanzan el tracto intestinal y desarrollan el ciclo enteroepitelial de forma similar a la ingesta de quistes tisulares (Dubey y Beatie, 1988; Black y Boothroyd, 2000). En los hospederos intermediarios, tras la ingestión de cualquiera de los estadios infecciosos, estos se diferencian a taquizoítos a nivel intestinal u posteriormente se diseminan extraintestinalmente de forma similar a los hospederos definitivos, desarrollándose bajo dos fases de multiplicación asexual. En la primera fase, los taquizoítos se multiplican rápidamente por endodiogenia, en células de múltiples tejidos del hospedador, hasta alcanzar varias generaciones y formar pseudoquistes. Los taquizoítos de última generación son los iniciadores de la segunda fase de desarrollo asexual, resultando en la generación de bradizoítos de multiplicación lenta por endodiogenia, contenidos en un quiste tisular. Los quistes tisulares predominan en el sistema nervioso central, ojo, musculo cardiaco y esquelético, sin embargo, también es posible encontrarlos, en menor cantidad, en órganos viscerales como hígado, pulmón y riñón (Figura 2). Se consideran a los quistes tisulares como el estadio final del ciclo de vida en los hospederos intermediarios, con capacidad infecciosa inmediata, pudiendo persistir de por vida en varios hospederos.

En hospederos intermediarios, tras el desarrollo de quistes tisulares, pueden transcurrir episodios largos de tiempo (meses o incluso años) y romperse esporádicamente algunos quistes tisulares con la liberación de bradizoítos, los cuales se transforman nuevamente a taquizoítos teniendo la capacidad de reinfectar diferentes tejidos (Tenter *et al*, 2000; Hill *et al*, 2005).

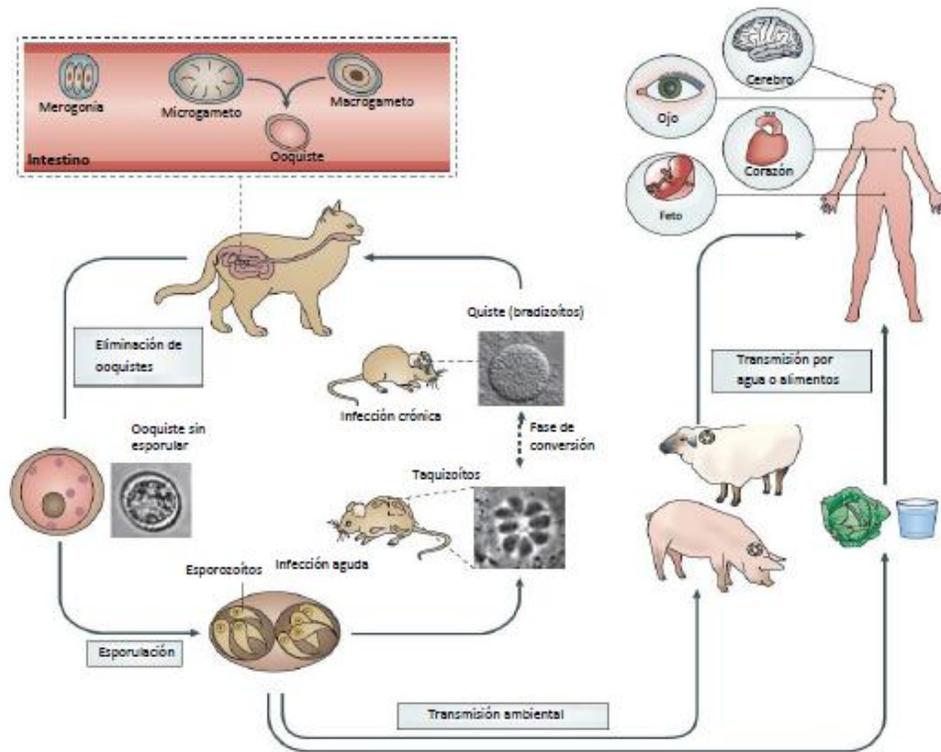


Figura 2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Tomado de Hunter and Sibley. 2012

1.4 Importancia en la salud pública

El parásito afecta a más de la tercera parte de la población mundial; sin embargo, la seroprevalencia de la enfermedad en las poblaciones humanas varía ampliamente, desde 15 hasta 85% dependiendo de la región geográfica y de factores como la edad y los hábitos culturales (Tenter *et al.*, 2000).

La enfermedad clínica es inusual, pero existen grupos de riesgo que pueden desarrollar la enfermedad como son mujeres embarazadas e individuos en estado de inmunosupresión, tales como pacientes con trasplantes de órganos, o pacientes con VIH. En ocasiones, las personas sin inmunodeficiencia aparente pueden desarrollar la enfermedad caracterizada por un malestar general, fiebre, y linfadenopatía (Bowie *et al.*, 1997).

1.5 Transmisión

La principal vía de transmisión de la toxoplasmosis es la oral. Los gatos contaminan el suelo, depósitos de agua, pastos, forrajes, jardines, cultivos de frutas y vegetales con ooquistes esporulados contenidos en sus heces al ser ingeridos por algún hospedero, puede adquirir la infección. Otra forma de transmisión es por el consumo de carne cruda o mal cocida contaminada con quistes tisulares.

También se ha descrito la transmisión del parásito (taquizoíto) por el consumo de leche cruda de borrega, cabra y vaca, y por trasplante de órganos, siendo estas últimas poco frecuentes (Dubey, 2005; Tenter *et al.*, 2000). Otra vía de transmisión es la que ocurre durante el embarazo, ya que los taquizoítos tienen la capacidad de llegar al feto a través de la placenta (Tenter *et al.*, 2000).

Esta vía es importante debido al impacto que produce *T. gondii* en mujeres s o hembras gestantes provocando abortos o bien por los daños que puede ocasionar en sus productos como coriorretinitis, encefalitis, hepatomegalia, linfadenitis e hidrocefalia. En mujeres se ha observado que conforme transcurre la gestación, el riesgo de transmisión aumenta, pero el daño al embrión/feto disminuye (Galván *et al.*, 2001; Correa *et al.*, 2007).

1.6 Factores de riesgo asociados a la infección por *T. gondii*

Dentro de los principales factores de riesgo asociados a la infección en gatos se han identificado incluir carne cruda en la alimentación o sobras de comida, la edad, así como sus hábitos de caza.

En los seres humanos, el cohabitar con gatos infectados con el parásito, la falta de control e higiene en los areneros, el consumo de carne insuficientemente cocida, o no desinfectar frutas y verduras son factores de riesgo para adquirir esta parasitosis (Castillo *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2013; Galván *et al.*, 1999; Besné *et al.*, 2008).

1.7 Toxoplasmosis en gatos

La frecuencia de la toxoplasmosis en gatos varía entre países, principalmente por las condiciones climáticas, culturales, así como por la técnica empleada para su identificación. En un trabajo realizado por Wang *et al.*, (2012), en gatos sin dueño reportaron una prevalencia de 17.2% (25/145) en Shangai, China. En España, Miró *et al.*, (2004), determinaron 25.5% (56/220) de seroprevalencia en gatos domésticos, mientras que en gatos sin dueño fue de 36.9% (117/317) por inmunofluorescencia indirecta.

En dos estudios realizados en Japón, uno por Nogami *et al.*, (1998) y otro por Maruyama *et al.* (1998), donde utilizaron una prueba modificada de aglutinación en látex, reportaron una prevalencia de anticuerpos de 6% y 8.7%, respectivamente. En un trabajo realizado por Sharif, *et al.*, (2009) en gatos sin dueño de Irán, obtuvieron una frecuencia de 40% (40/100) por aglutinación en látex. Ovalle *et al.*, (2000), en Valdivia, Chile encontraron una frecuencia de 33% (32/97) analizados mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta mientras que en Sao Paulo, Brasil, Pena *et al.*, (2005), encontraron un 35.4% (84/237) de positividad usando la prueba modificada de aglutinación.

En México existen pocos estudios acerca de la frecuencia de este parásito en gatos algunos reportan frecuencias desde 21% hasta 90% realizados en distintas entidades del país (Figura 3; Guevara, 1986; Muñiz, 1993; Galván *et al.*, 1999; Besné *et al.*, 2008; Castillo-Morales 2012).

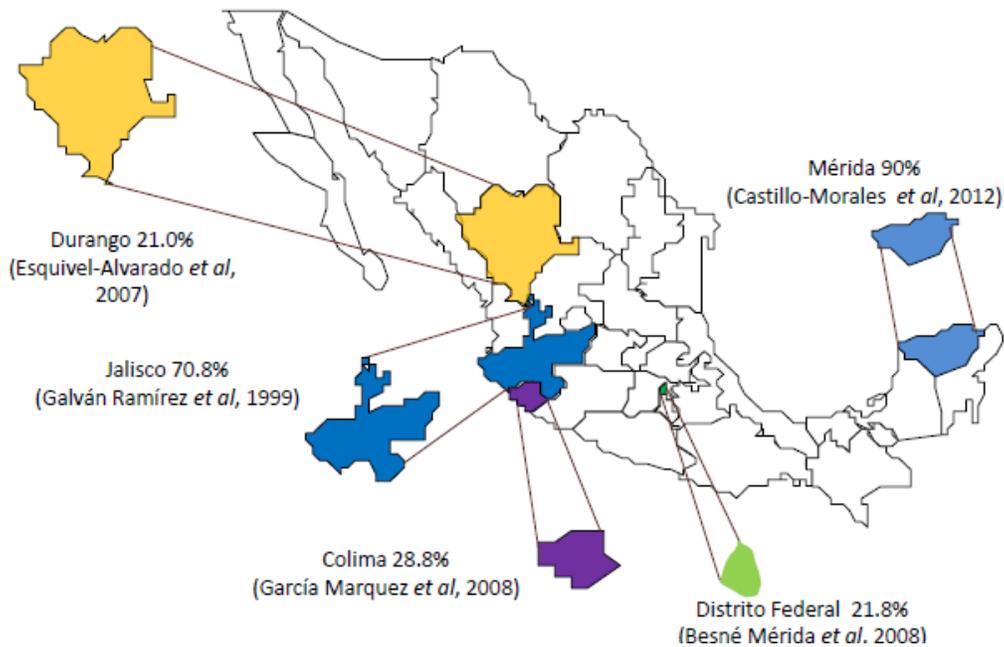


Figura 3. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en gatos en México. Tomado y modificado de: Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna Silvestre. FMVZ. UNAM. Cedillo-Peláez, 2009. Tesis de maestría.

1.8 Patogenia

La infección por *T. gondii* tanto en humanos como en animales está condicionada por diversos factores como la vía de transmisión, la virulencia de la cepa, la dosis infectante, el estadio del parásito, el estatus inmunológico y la susceptibilidad del hospederos, entre otros; dependiendo de estos factores se presentarán las lesiones y la signología clínica (Krauss, 2003; Montaya *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005).

El parásito tiene la capacidad de infectar cualquier célula nucleada de un organismo. Durante el proceso de invasión participan varios organelos del parásito como el complejo apical constituido por anillos polares, conoide, roptrias y microtúbulos y micronemas.

Funcionalmente el complejo apical se relaciona con la adherencia e invasión de las células del hospedero. El conoide posee una función perforadora y las roptrias y micronemas secretan proteínas que facilitan la penetración celular, indispensable para la supervivencia del parásito (Alexander *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 1998; Muñiz *et al.*, 2009). La descarga inicial de las proteínas de las micronemas (proteínas MIC) permite la adhesión y el movimiento por deslizamiento del parásito sobre la membrana de la célula diana como un evento necesario para la invasión.

Posteriormente se secreta el contenido de las roptrias (proteínas ROP) sobre la membrana de su célula hospedera, con la formación de una unión "móvil" entre las membranas plasmáticas de la célula hospedera y del parásito y la generación de una horadación de menos de 1 μm por la cual el taquizoíto se internaliza mediante movimientos tipo tornillo (Figura 4).

Al mismo tiempo que el parásito penetra en su célula hospedera, se va generando una invaginación de la membrana celular compuesta principalmente por elementos de la membrana plasmática (esencialmente lípidos) y por algunos componentes secretados por el parásito, formando al final una estructura denominada vacuola parasitófora (Alexander *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 1998).

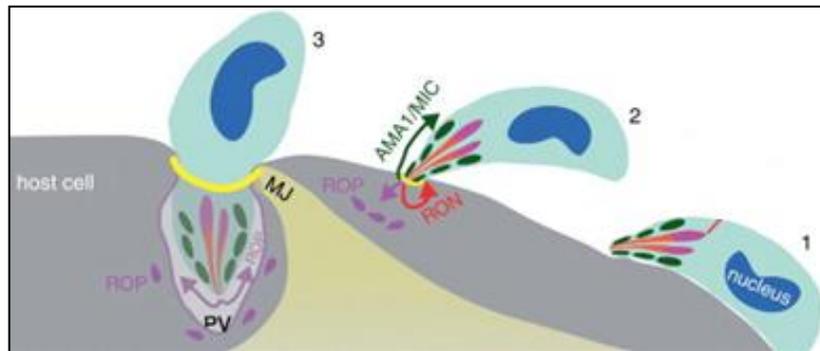


Figura 4. Etapas del proceso de invasión celular de *Toxoplasma gondii*. 1) Adhesión y deslizamiento 2) Extrusión del conoide y secreción de proteínas de roptrias y micronemas 3) Internalización y formación de vacuola parasitófora. Tomado de: Bang, 2012.

1.9 Genética de *Toxoplasma gondii*

Los primeros estudios de caracterización genética realizados para *T. gondii*, mostraron una escasa diversidad genética, menor del 1%, (Dardé, 2004). Posteriormente, el análisis de aislamientos provenientes de América del Norte y Europa, reveló la existencia de una estructura poblacional clonal, con tres genotipos principales denominados I, II y III (Howe *et al.*, 1997). El genotipo I es virulento en ratones, causante de los casos clínicos de toxoplasmosis en humanos e *in vitro* presentan un alto rango de multiplicación. El genotipo II es menos virulento para los ratones, es comúnmente aislado de humanos, ovinos y cerdos, y los genotipos III son principalmente aislados de fauna silvestre (Dardé, 2004). Sin embargo, mientras la clonalidad predomina en América del Norte y Europa, un muestreo adicional de un amplio rango de localizaciones, sugiere que cepas de otras regiones tienen una mayor diversidad genética (Ajzenberg *et al.*, 2004).

De esta forma América del Sur muestra una diversidad genética única, con presencia de genotipos que no pertenecen a los linajes clonales y son diferentes desde el punto de vista biológico y genético (Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2008; Sibley *et al.*, 2009).

Estos genotipos se designan como atípicos y representan del 5 al 10 % de los aislamientos. De forma general, se aíslan de hospederos que habitan en áreas geográficas remotas o pacientes con una presentación clínica inusual (Darde, 1996; Grigg *et al.*, 2001).

Para África, los estudios concernientes a la genotipificación de *T. gondii* son escasos y al principio mostraron un predominio de cepas clonales, similar a Europa y América del Norte (Velmurugan *et al.*, 2008). Estudios posteriores, muestran la circulación de cepas relacionadas desde el punto de vista genético con aislamientos provenientes de América Central y América del Sur, pasando algo similar en México (Mercier *et al.*, 2010).

Todo esto en conjunto juega un papel importante por las implicaciones que puede tener la estructura poblacional del parásito en la transmisión, inmunogenicidad y la patogenicidad de la enfermedad (Khan *et al.*, 2005; Sibley *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2012).

Respecto a los trabajos realizados en cuanto a diversidad genética en México son escasos, (Cuadro 1) se mencionan los trabajos de genotipificación que se han realizado en el país.

Cuadro 1. Genotipos de *Toxoplasma gondii* descritos en México (PCR-RFLP)

Especie	Estado	Genotipo
Becerro	Hidalgo	I
Gato	DF	I
Gato	Colima	III
Ratón	Colima	I
Wallaby	DF	I
Mono ardilla	DF	I
Mono ardilla	DF	I
Gallina	DF	III
Perro	Durango	Recombinante

Gato	Durango	Recombinante
Gato	Durango	Recombinante
Paloma	Durango	Atípica
Puma	Durango	Atípica
Perro	DF	I
Humanos	DF	I

1.10 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la toxoplasmosis se pueden utilizar distintos tipos de técnicas serológicas, anatomopatológicas, biológicas y moleculares, para lo cual se pueden utilizar muestras como suero, plasma, saliva, leche, lágrimas así como líquido cefalorraquídeo, amniótico, ocular y tejidos. Cabe mencionar que el diagnóstico de la toxoplasmosis no puede ser establecido por medios clínicos únicamente, o bien por un examen patológico general, ya que los síntomas y el cuadro *post-mortem* se parecen al de otras enfermedades, por lo cual es recomendable utilizar más de una técnica (Dubey, 2010).

1.10.1 Aislamiento

Toxoplasma gondii puede ser aislado de casos clínicos tanto *in vitro* (cultivo celular) como *in vivo* (inoculación en ratones), a partir de muestras de secreciones, excreciones de fluidos corporales, biopsias y tejidos con lesiones macroscópicas tomadas durante la necropsia. Las células Vero o cultivos de fibroblastos pueden ser empleados para el aislamiento de los parásitos teniendo propagación de éstos en un lapso de 6 a 8 días (OIE, 2010).

Para el aislamiento *in vivo*, los ratones son los animales que se emplean con mayor frecuencia, los cuales son infectados por vía subcutánea o intraperitoneal con macerado o fluido de las muestras sospechosas.

Dependiendo de la virulencia del aislamiento, el ratón puede desarrollar una infección aguda con abundante carga parasitaria de taquizoítos en 8 a 12 días, o bien puede desarrollar una infección crónica con baja o nula mortalidad y formación de quistes tisulares principalmente en sistema nervioso central (Montoya *et al.*, 2004; Rico-Torres *et al.*, 2005).

1.10.2 Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

La técnica se basa en la unión de un antígeno a una base sólida y sobre él se incuban muestras de suero para la detección de anticuerpos específicos contra algún agente infeccioso. Para identificar la unión de los anticuerpos con el antígeno, se utiliza un segundo anticuerpo conjugado a una enzima. El segundo anticuerpo conserva la capacidad de unión específica al primero mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción, en la cual el sustrato se transforma en un producto de color. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa, debido a su estabilidad y a la reproducibilidad de los resultados. El sustrato para la peroxidasa de rábano es el peróxido de hidrógeno, que al ser reducido da un productos incoloro, por lo que al adicionarse cromógenos que al oxidarse en la reacción enzimática desarrollan color. De éstos, la más utilizada es la ortofenilendiamina, que continúa en forma soluble después de ser oxidada (Medina *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 1996).

El hallazgo de anticuerpos en suero indica que el hospederos fue infectado en algún momento de su vida, sin poder existir alguna asociación directamente con la signología clínica presente debido a que en algunos hospederos se pueden persistir títulos elevados de anticuerpos meses después de la infección, recomendándose así recolectar una segunda muestra con una diferencia de tres a cuatro semanas para establecer una variación en la cantidad de anticuerpos circulantes. Un aumento en el título de anticuerpos en la segunda muestra es indicativo de una infección aguda (Montoya *et al.*, 2004).

1.10.3 Anatomopatología

Para este tipo de técnica se requiere personal capacitado y con experiencia en el reconocimiento de las lesiones provocadas por estos parásitos Apicomplexa. La inmunohistoquímica permite distinguir a *T. gondii* de los demás diagnósticos diferenciales como *Neospora spp*, *Besnoitia sp* y *Sarcocystis spp*. Las lesiones desarrolladas debido a la infección por *T. gondii* se pueden presentar de forma similar tanto en seres humanos como en animales, siendo el patrón general, lesiones de tipo necrótico. Durante el examen *post-mortem* no se presentan lesiones específicas de una infección por *T. gondii*, se debe tomar con reserva los cambios encontrados y recolectar muestras de diferentes tejidos para realizar pruebas complementarias. Las lesiones se encuentran principalmente en pulmón, sistema linfático, corazón, músculo esquelético, hígado, páncreas, bazo y sistema nervioso central (Fowler y Miller, 2008).

En los cortes histológicos las estructuras parasitarias generalmente presentan una forma redondeada u oval. La presencia de quistes tisulares con bradizoítos sin respuesta inflamatoria es indicativo de infección crónica; sin embargo, en los casos de reactivación, la presencia de necrosis, degeneración celular, cúmulos de microglía, infiltrado mononuclear perivascular son cambios presentes. Las lesiones pulmonares se caracterizan por una neumonía intersticial difusa con engrosamiento de los septos alveolares, proliferación de neumocitos tipo II y focos aleatorios de necrosis en alvéolos, bronquiolos y vasos sanguíneos (Fowler y Miller, 2008; McGavin, 2007). En hígado y otros órganos parenquimatosos, los focos de necrosis coagulativa pueden prevalecer multifocalmente con diferentes grados de infiltración de células inflamatorias (Fowler y Miller, 2003; McGavin, 2007).

1.10.4 Biología molecular

En la actualidad, las técnicas moleculares que utilizan la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen herramientas importantes en el diagnóstico de diversos patógenos, sensibilidad y reproducibilidad, que pueden aplicarse a una variedad de muestras provenientes de animales o seres humanos (Contini *et al.*, 2005; Calderaro *et al.*, 2006). La PCR permite generar millones de copias de ADN a partir de una región específica del genoma a través de ciclos sucesivos de amplificación enzimática (Montoya *et al.*, 2004; Rico-Torres, 2005). Existen diversas variantes de PCR que conservan el mismo principio como son la PCR anidada y semianidada, la PCR en tiempo real, es una técnica automatizada que detecta productos de amplificación por sondas marcadas con fluorescencia y la PCR multiplex que utiliza diferentes sondas marcadas para distintos genes, emitiendo diferentes rangos de color en ensayos múltiples en una misma reacción (Rico-Torres, 2005).

Para el diagnóstico de *T. gondii* pueden ser empleados diversos marcadores; uno de los más frecuentes es el gen *B1*, ya que esta secuencia se repite aproximadamente 35 veces en el genoma del parásito y está ausente en las células de mamíferos. Otro marcador empleado es *SAG1* (P30), que codifica para el antígeno de superficie más importante del parásito (Hyman *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2000; Rico-Torres, 2005). Existen diversas variantes de PCR que conservan el mismo principio como son la PCR anidada y semianidada, la PCR en tiempo real, (una técnica automatizada que detecta productos de amplificación por sondas marcadas con fluorescencia), y la PCR multiplex que utiliza diferentes sondas marcadas para distintos genes, emitiendo diferentes rangos de color en ensayos múltiples en una misma reacción (Rico-Torres, 2005). En el año 2000 Homan *et al.*, 2010 identificaron una secuencia de 529 pb que se repite más de 300 veces en el genoma de *T. gondii*. Aunque algunos trabajos comparativos muestran que esta secuencia tiene mayor sensibilidad diagnóstica que el gen *B1*, otros obtienen sensibilidades similares o inferiores.

La técnica de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP), constituye una estrategia eficiente para realizar la genotipificación de *T. gondii*. (Singh *et al.*, 1997). El principio de la técnica se basa en la habilidad de las endonucleasas de restricción para reconocer secuencias de ADN específicas y realizar la digestión enzimática de éstas. Los resultados posteriores a la digestión enzimática se analizan a través de una electroforesis en gel de agarosa.

La observación de patrones de bandas diferentes, en función del polimorfismo de cada marcador, permite establecer la diferenciación de los genotipos del parásito (Sibley y Boothroyd, 1992; Howe y Sibley, 1995). Su simplicidad, su costo relativamente bajo la convierten en la herramienta preferida para la caracterización de *T. gondii* en estudios epidemiológicos (Su *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2013).

2. Justificación

En México existen pocos trabajos acerca de la prevalencia de *T. gondii* y factores de riesgo asociados con gatos domésticos. Los pocos estudios que existen reportan una frecuencia que va desde el 21% hasta el 90%. *T. gondii* es un patógeno zoonótico, cuyo hospedador definitivo es el gato o miembros de su familia, en los que se realiza la fase sexual del parásito, por lo que cobra importancia a nivel de salud pública y veterinaria. Al no existir antecedentes de esta parasitosis en gatos en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo, el cual tiene condiciones que propician el mantenimiento del ciclo biológico, se consideró pertinente determinar algunos aspectos epidemiológicos de esta parasitosis en la zona, para correlacionarlos con sus hallazgos en las poblaciones estudiadas. Este hecho adquiere mayor relevancia en lugares donde la convivencia de gatos y seres humanos u otras especies es estrecha, situación que se presenta particularmente en el Complejo Agroindustrial de Tizayuca, Hidalgo, donde la coexistencia de bovinos, perros, gatos, humanos, y otras especies como ratones, hace necesaria una valoración epidemiológica en este lugar.

Además, se considera importante contribuir y abundar en el conocimiento de los tipos de cepas existentes en esa región mediante la realización de un estudio de genotipificación de *T. gondii* en gatos domésticos y ver si existe una relación entre el genotipo de cepa con las lesiones observadas.

3. Hipótesis

La presencia de factores de riesgo como la edad, género y tipo de alimentación de los gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, favorece la prevalencia de toxoplasmosis felina.

4. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar epidemiológicamente la toxoplasmosis felina en hatos lecheros del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), Hidalgo.

Objetivos específicos

- Describir la población humana y felina de los establos del CAIT, por medio de la aplicación de encuestas.
- Determinar posibles factores de riesgo de la toxoplasmosis a través de la aplicación de encuestas.
- Establecer el diagnóstico de la toxoplasmosis en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo a través de ELISA, PCR, aislamiento e histopatología.

5. Material y métodos

5.1 Tipo de estudio: transversal, prospectivo y observacional

5.2 Lugar de estudio

El Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) está ubicado a los 19° 51' 25" de latitud norte y 98° 50' 8" de longitud oeste. Tiene una extensión de 220 hectáreas que albergan 120 establos especializados en producción de leche, con aproximadamente 16,000 vacas lecheras y 6,000 becerras para recría (Monroy 1999).

5.3 Georreferenciación de los establos

Se obtuvieron las coordenadas geográficas en cada establo de la cuenca lechera, utilizando un equipo de sistema de posición global GPS (por sus siglas en inglés "*Global Positioning System*"), marca *GPSmap*, modelo 76CSx.

5.4 Determinación de la población humana y de animales (gatos y perros) por establo

A través de la aplicación de una encuesta se determinó el número de personas, perros y gatos por establo. Asimismo se determinaron algunas características como si son mascotas o son animales sin dueño, edad, género y tipo de alimentación proporcionada. La aplicación del cuestionario se realizó de Octubre a Diciembre de 2012.

5.5 Análisis de datos

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

5.6 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión: gatos habitantes del CAIT, mayores de 3 meses de edad, con el consentimiento previo de los propietarios del establo. Exclusión: hembras gestantes o en etapa de lactación.

5.7 Obtención de muestras

Se recolectaron muestras de gatos con y sin dueño. Los primeros fueron atrapados mediante la sujeción de los propietarios, mientras que para atrapar a los segundos se colocaron jaulas tipo tomahawk en los establos donde hubo referencia de estos animales. Ambos tipos de animales fueron tranquilizados con xilacina, vía intramuscular.

Después de 10 minutos de administrado el tranquilizante, a cada gato se le puncionó la vena cefálica con una aguja de calibre 22 ó 23, previo rasurado y desinfección de la zona. Se extrajo aproximadamente 1 mL de sangre, se dejó coagular y luego se separó el suero por centrifugación a 2500 rpm, durante 15 minutos, el cual se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

6. Diagnóstico de Toxoplasmosis

6.1 ELISA

Los sueros obtenidos fueron procesados mediante un ELISA indirecto, (modificado de Besné y *et al.*, 2008 (Anexo II) para determinar anticuerpos IgG contra el parásito. El punto de corte se obtuvo al sumar la media más tres veces la desviación estándar de los valores de absorbancia de los gatos negativos.

6.2 Eutanasia y necropsia de gatos: aquellos individuos positivos, fueron eutanasiados conforme a la NOM-033-ZOO-1995, siempre con el consentimiento previo del encargado o dueño del establo.

Se inició con la tranquilización, mediante la aplicación de xilacina intramuscular y se eutanasiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico administrado vía intracardiaca. La necropsia se realizó de acuerdo a lo referido por Aluja y Constantino (2002), se recolectaron muestras de cerebro, corazón, diafragma, músculo esquelético, pulmón, bazo e hígado.

6.3 Histopatología: las muestras destinadas a histopatología se colocaron en frascos de plástico con formalina al 10%, amortiguada con fosfatos, en una relación 1:10 (muestra-formalina) de un tamaño promedio de 2 cm por lado. Los frascos se identificaron consecutivamente, con los datos de cada gato: la edad aproximada del gato y sexo.

Una vez fijados los tejidos, se cortaron en secciones de 0.3 a 0.5 cm de grosor y se incluyeron en casetes de plástico, y se depositaron en un histoquinete convencional (Leica) para su procesamiento automatizado. El procesamiento de las muestras biológicas, se basó en la técnica histológica de rutina descrita por Heffess y Mullick (1995).

6.4 Biología molecular

6.4.1 Extracción de ADN:

Se extrajo el ADN de porciones de cerebro, corazón y diafragma, se siguió el protocolo previamente descrito (Homan *et al.*, 2000; Rico-Torres, 2005). De cada órgano evaluado, se pesaron 200 mg de tejido, se maceró en un mortero y posteriormente fueron procesadas para la extracción de ADN, utilizando un kit comercial GENTRAR, se siguieron las indicaciones del proveedor, con algunas modificaciones realizadas por Cedillo-Peláez (2009), (Anexo II).

6.4.2 Cuantificación y pureza del ADN:

Para determinar la concentración y pureza del ADN se utilizó un nadodrop spectrophotometer ND-1000.

La pureza del ADN se estableció entre 1.7 y 2.0, valores por debajo de 1.7 se consideraron muestras contaminadas con proteínas, mientras que valores por encima de 2.0 se consideraron como contaminación con ARN.

6.4.3 Amplificación del ADN

Para realizar el diagnóstico molecular de *T. gondii*, el ADN extraído de los diferentes tejidos se evaluó por PCR en tiempo real, utilizando como blanco de amplificación el gen *B1* (62 pb), mientras que para la PCR en punto final se utilizaron los marcadores *B1* (362 pb), *B1* (619 pb), secuencia repetida en tándem (529 pb), *GRA6* (344 PB), *GRA6* (779 PB), *SAG2* (546 pb), *SAG3* (225 pb) y *BTUB* (411 pb).

Los iniciadores utilizados se sintetizaron en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM. Las secuencias de los iniciadores y el tamaño del producto esperado se muestran en el Cuadro 2, así como las temperaturas para la PCR de cada uno de los marcadores utilizados.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación del ADN (PCR) de *T. gondii*

Marcador	Iniciadores	Tamaño (pb)	Temperatura	Referencia
B1	TM1: 5-GAGAGGTCCGCCCCCAAG	619 pb	55°C	Rico-Torres 2005
	TM2: 5-CTGCTGGTGCGACGGGAGTG			
B1	TM2:5-CTGCTGGTGCGACGGGAGTG	362 pb		
	TM3:5-CAGGAGTTGGATTTTTGTAGA			
Secuencia repetida en tándem	TOX4:CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG	529 pb	55°C	Homan <i>et al</i> 2000
	TOX5:CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT			
GRA6	GRA6-F1:TTTCCGAGCAGGTGACCT	344 pb	60°C	Su <i>et al</i> , 2006
	R1x:TCGCCGAAGAGTTGACATAG			
SAG3	P43S1:CAACTCTCACCATTCCACCC	311 pb	60°C	Su <i>et al</i> , 2006
	P43AS1:GCGCGTTGTTAGACAAGACA			
	Btb-R:TTGTAGGAACCCCGGACGC			

La especificidad de los iniciadores fue verificada mediante un análisis de homología utilizando la aplicación BLAST (<http://www.ncbi.org/BLAST>).

Para la PCR en tiempo real, las condiciones de la mezcla maestra fueron en un volumen de 10 μ l: 5 μ l de master mix (10X PCR Gold Buffer, Roche), 0.5 μ l de oligo + sonda (Roche), 2.5 μ l de ADN desconocido (Roche), 1.0 μ l de Exo (10X) IPC, 0.2 μ l de (50X) IPC y 0.8 μ l de agua. Como testigo positivo de la prueba se usó el ADN genómico de *T. gondii* de las cepas RH y ME49; como testigo negativo se utilizó agua desionizada que sustituyó al ADN. Las condiciones de amplificación fueron 60°C durante 30 segundos (lectura pre-PCR), 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos (activación y desactivación de la enzima uracil-N-glicosilasa), 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto (amplificación de 62 pb del gen B1 de *T. gondii*), 60°C durante 30 segundos (lectura post-PCR).

Para la reacción de PCR punto final, las condiciones de la mezcla maestra fueron en un volumen de 50 μ l: 5 μ l de amortiguador de PCR (10X PCR Gold Buffer, Roche), 5.0 μ l de MgCl₂ (25 mM, Roche), 1.0 μ l de dNTP's mix (10 mM, Roche), 3.0 μ l de cada iniciador, 1.5 μ l de DMS 5% (Sigma), 0.5 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l Ampli Taq Gold Roche) y 1 μ g/ μ l de cada ADN a evaluar y el resto de agua inyectable. Como testigos positivos de la prueba se usó el ADN genómico de *T. gondii* de las cepas RH y ME49 y como testigo negativo se utilizó agua desionizada que sustituyó al ADN.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C por 3 minutos, y 40 ciclos con desnaturalización a 94°C, 30 segundos alineamiento a 65°C, 60 segundos (dependiendo del iniciador utilizado), una extensión a 72°C, 60 segundos, para terminar con una elongación final a 72°C, por 10 minutos.

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis (cámara horizontal; Biorad) en un gel de agarosa al 1.5% (Invitrogen) con bromuro de etidio, se observó en un transiluminador (Herolab) con luz ultravioleta y se documentó con una cámara digital marca Olympus. Se consideró como caso positivo a aquellos tejidos que amplificaron bandas bien definidas respecto al producto esperado en cualquiera de los marcadores utilizados.

6.5 PCR-RFLP

Las muestras positivas que amplificaron en PCR tiempo real, se sometieron a un análisis PCR-RFLP, con la finalidad de identificar el genotipo del patógeno.

A partir de los productos de amplificación del gen *SAG3* se llevó a cabo la digestión con la enzima *NciI*. La reacción de digestión se realizó en un volumen final de 50 μ l: la reacción incluyó 20 μ l del producto del amplicón, 5 μ l de solución amortiguadora de digestión (NBE4 10X), 0.5 μ l de BSA (10 mg/ml), 0.5 μ l de la enzima *NciI* (20 U/ μ l) y el volumen restante de agua inyectable (Cedillo- Peláez, 2009; Su *et al.*, 2006).

Para el gen *GRA6*, la reacción de digestión se realizó en un volumen final de 50 μ l: 5 μ L de ADN amplificado por PCR, 5 μ L de solución amortiguadora de digestión (NEB2 10x), 0.5 μ L de BSA (10 mg/ml), 1 μ L de la enzima *MseI* (10U/ μ L) y el volumen restante de agua inyectable. La reacción para ambos marcadores se incubó a 37°C, en un termoblock durante toda la noche (Cedillo- Peláez, 2009).

Como controles positivos se incluyeron productos de amplificación de diluciones de ADN de las cepas de referencia RH y ME49 y como control negativo se empleó agua inyectable sustituyendo el ADN a digerir (Cedillo-Peláez, 2009; Su *et al.*, 2006). Los productos de digestión se visualizaron de forma similar a lo descrito para los productos de amplificación por PCR, modificando solamente la concentración del gel de agarosa al 3.5%.

6.6 Bioensayo

6.6.1 Aislamiento en ratones Balb/c

Se tomaron aproximadamente 10 g de cerebro, corazón y diafragma de cada gato. Los órganos fueron colocados en una caja petri por separado, y se les agregó 2 ml de PBS estéril, se maceraron perfectamente con el émbolo de una jeringa, y una vez obtenido el macerado de cada uno de los tejidos, se inoculó 1 mL a ratones Balb/C vía intraperitoneal, utilizando un total de 15 animales entre 3 y 4 semanas de edad.

Los ratones se mantuvieron en observación durante dos meses hasta que mostraran seroconversión o signos clínicos de la enfermedad (Chávez-Crisóstomo, 2010).

6.6.2 Obtención de lavado peritoneal

A los 7 días postinoculación se realizó un lavado peritoneal a cada ratón inoculado para determinar la presencia de taquizoítos. Si durante estos siete días algún ratón aparecía muerto, se siguió el mismo procedimiento. Del lavado se tomó una gota para ser observada al microscopio, y determinar si existían estructuras compatibles con taquizoítos (Chávez-Crisóstomo, 2010).

6.6.3 Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* en ratones

Se obtuvo una muestra de sangre del seno orbital de los ratones inoculados cada semana (días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42) para detectar anticuerpos séricos de clase IgG e IgM contra el parásito por medio de un ELISA indirecto, y determinar si los ratones inoculados seroconvirtieron.

6.6.4 Necropsia

Los ratones que seroconvirtieron para algunas de las dos inmunoglobulinas, fueron eutanasiados por dislocamiento cervical. Se realizó la necropsia con base en lo descrito por Aluja y Constantino (2002), se recolectaron de forma aséptica muestras de diferentes órganos como cerebro, corazón, diafragma, pulmón, hígado y bazo.

Con una fracción de ellos se realizaron improntas de los mismos, para determinar la presencia de quistes tisulares compatibles con *T. gondii* y otra parte de la muestra se preservó en congelación hasta su procesamiento para biología molecular. Del ratón donde se observaron los quistes tisulares se hizo un macerado de cerebro y otro de mezcla de órganos (corazón, diafragma, hígado, bazo y pulmón), para inocular a 2 ratones Balb/C y 2 C57BL6 RAG2^{-/-} con dos volúmenes: 150 y 200 µl.

7. Resultados

Se obtuvieron 70 muestras de suero de gatos, 48 de ellos tenían dueño y 22 eran sin dueño. Del total de gatos, 12 (17.1%), resultaron positivos a *T. gondii*. En los gatos sin dueño la frecuencia fue de 31.8% (7/22), mientras que en los gatos con dueño fue de 10.4% (5/48).

7.1 Caracterización epidemiológica

Con relación a las encuestas se encontró lo siguiente:

7.1.1 Población humana:

Se registraron 712 personas que habitan en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, de las cuales 348 (48.8%) son hombres y 364 (51.2%) son mujeres.

7.1.2 Tenencia de mascotas y presencia de ratas:

En total 88 establos fueron incluidos en el estudio; en 32 de ellos, los habitantes mencionaron tener a un perro (36.3%) y en 29 (32.9%) a un gato como mascotas. En 23 (26%) establos mencionaron tener ambos tipos de animales, y únicamente en 4 (4.5%) no hubo mascotas (Figura 5). En 42 (34%) establos se señaló que habían gatos sin dueño (Figura 6). Cabe señalar que en 56 establos (63.6%) mencionaron tener el problema de la presencia de ratas (Figura 7).

7.1.3 Determinación de toxoplasmosis y factores de riesgo:

Con la información obtenida se identificaron aquellos posibles factores de riesgo presentes en el CAIT, los cuales se describen a continuación:

Se observó una mayor frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en el grupo de gatos sin dueño que aquellos que sí lo tenían (Figura 8). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p = 0.24$), Cuadro 3.

Con relación al género, 43 (61.4%) gatos fueron hembras y 27 (38.6%) machos. La frecuencia de anticuerpos fue mayor en los machos (29.6%) que en los hembras (9.3%); sin embargo la diferencia no fue significativa ($P = 0.35$) Cuadro 4.

Por edad, se conformaron 3 grupos: el primer grupo correspondió a los gatos menores de 6 meses, segundo grupo a los felinos juveniles (6 a 12 meses) y en el tercer grupo se incluyeron gatos adultos (mayores a 12 meses), de acuerdo con lo propuesto por Gyorka (2011). En el grupo 2 se encontraron 4 gatos (18.1%) presentaron anticuerpos contra el parásito, mientras que en el grupo 3 se detectaron 8 (19.0%) individuos (Cuadro 5).

De acuerdo con el tipo de alimentación que reciben los gatos, el 17.1% eran alimentados con carne y/o vísceras crudas, el 28.6% eran alimentados con sobras de comida y el 20% eran alimentados exclusivamente con una dieta comercial. Al comparar a los animales que comen carne cruda con respecto a los que no lo hacen, la frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* fue mayor en los gatos del primer grupo, que en los que no se incluía este tipo de alimento ($P < 0.01$), con una razón de momios de 21.2 (IC 95%=1.8-556.2) Cuadro 6.

7.2 Necropsia y hallazgos macroscópicos

De los animales positivos, solo se realizaron necropsias en cinco gatos (*Felis catus*), 3 hembras y 2 machos. Los cambios más relevantes se observaron en la cavidad torácica (lóbulos pulmonares) en uno de los gatos, en donde se observaron zonas de color rojo multifocales, mientras que en tres de ellos el parénquima pulmonar mostró múltiples nódulos superficiales subpleurales de color grisáceo (Figura 9). El resto de los órganos de esta cavidad, así como cavidades abdominal y la craneana no presentaron cambios patológicos aparentes.

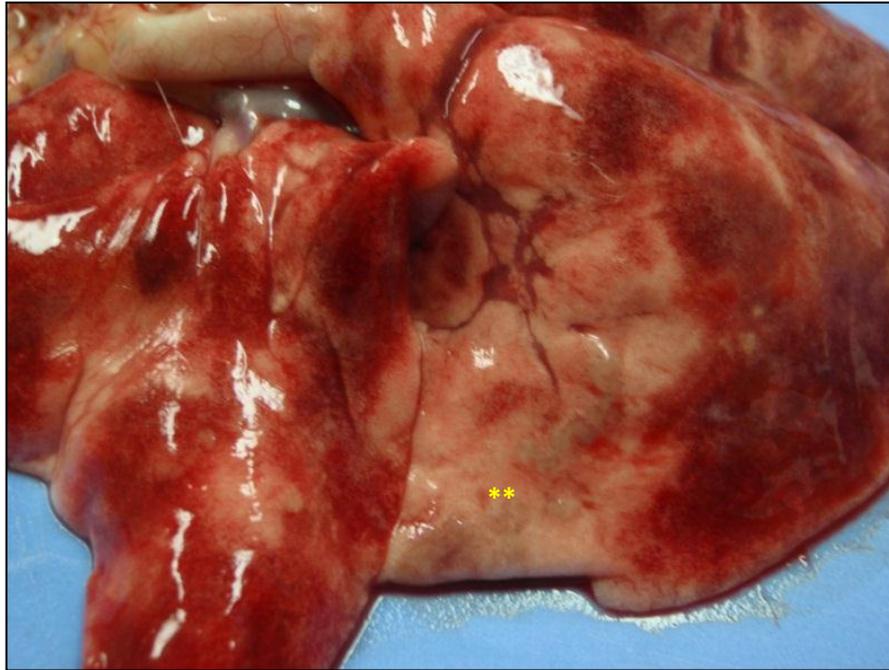


Figura 9. En el parénquima pulmonar, se observaron nódulos superficiales subpleurales (**) de color grisáceo.

7.3 Hallazgos microscópicos:

De los 5 gatos que fueron eutanasiados se tomaron muestras de los tejidos ya mencionados encontrando los siguientes parásitos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados histopatológicos en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo.

ID	Cerebro	Corazón	Diafragma	Pulmón	Bazo	Hígado
7	-	-	<i>Sarcocystis spp</i>	-	-	-
11	-	-	-	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	-	-
21	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	-	-
49	-	-	-	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	-	-

Se revisaron secciones de músculo esquelético (cuádriceps femoral) y diafragma en donde se apreció que el sarcoplasma de las fibras musculares tenía abundantes quistes parasitarios ovales, los cuales presentaban una pared eosinofílica definida y que contenían múltiples estructuras compatibles con bradizoítos del género *Sarcocystis spp.* (Figura 10).

En el tejido pulmonar de tres gatos se observó que la luz de los alvéolos contenía abundante exudado inflamatorio compuesto por numerosos linfocitos y células plasmáticas, menor cantidad de macrófagos y células epitelioides, así como escasas células gigantes multinucleadas, dichas células rodeaban numerosas estructuras parasitarias larvarias compatibles con *Aelurostrongylus abstrusus*, además de hipertrofia de las glándulas peribronquiales, hipertrofia de la musculatura lisa de las paredes de bronquíolos e hiperplasia muscular en las arterias musculares. El diagnóstico morfológico fue: Neumonía granulomatosa difusa severa crónica ocasionada por parásitos nematodos sugerentes a *Aelurostrongylus abstrusus* (*A. abstrusus*) (Figura 11).



Figura 10. Quiste tisular de *Sarcocystis* spp. en diafragma. HE. 400X

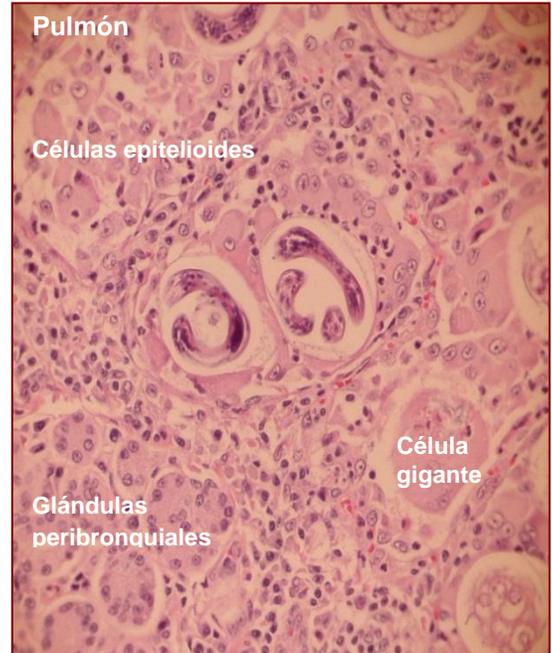


Figura 11. Espacios alveolares con larvas de *A. abstrusus* en pulmón. HE.400X

Inmunohistoquímica para *T. gondii*

Con el fin de confirmar que los quistes tisulares antes descritos pudieran corresponder a *T. gondii*, se realizó la técnica de inmunohistoquímica mediante el complejo biotina-peroxidasa, utilizando un antisuero policlonal anti-*T. gondii* de origen caprino. Se evaluaron secciones de tejido muscular, en donde se observaron quistes tisulares, y se compararon con secciones de tejidos de ratón inoculado con *T. gondii* como control positivo (Figura 12 A).

Al terminar la prueba, la sección de ratón fue inmunopositiva, mientras que el quiste tisular en la sección de músculo del gato en cuestión, resultó negativo (Figura 12 C).

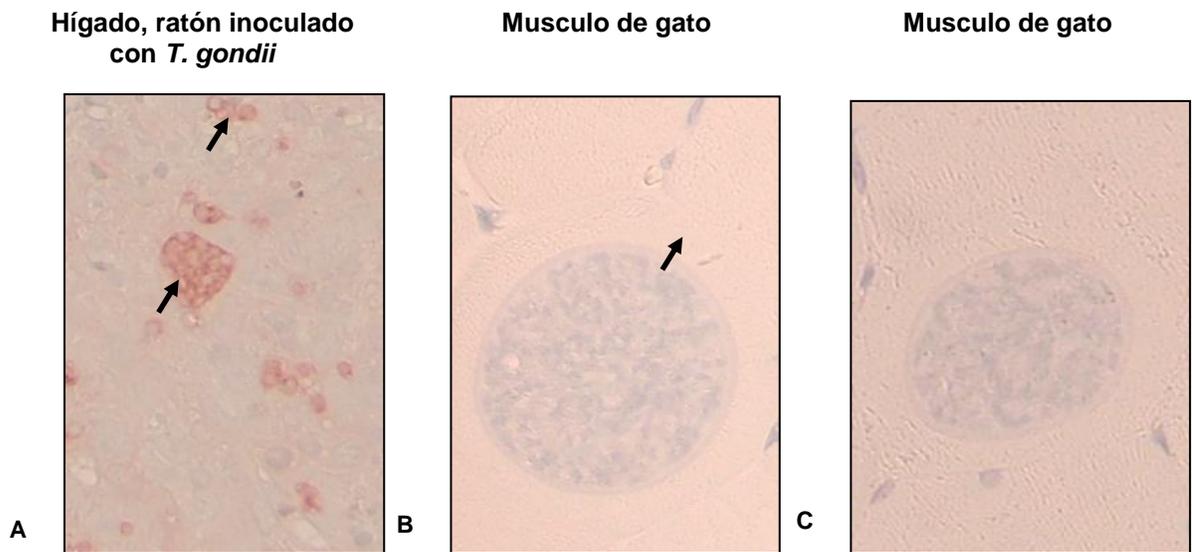


Figura 12. Inmunohistoquímica para la detección de *Toxoplasma gondii*. A) Sección de hígado de ratón inoculado con *T. gondii*, 1000X, observándose múltiples estructuras inmunopositivas a *T. gondii* (flechas). B) Sección de tejido muscular de gato sin áreas de inmunopositividad (control negativo). C) Sección de tejido muscular de gato sin observarse áreas de inmunopositividad (muestra problema)

7.4 Biología molecular

7.5 PCR en tiempo real

Se procesaron 14 tejidos (de 5 gatos), de los cuales 5 fueron positivos para el marcador B1 (Cuadro 8). Una vez identificados los tejidos positivos por esta técnica fueron procesadas por los marcadores moleculares descritos en la metodología.

Cuadro 8. Detección del gen *B1* de *Toxoplasma gondii* en órganos de gatos seropositivos del CAIT de Tizayuca Hidalgo, por PCR en tiempo real

ID	Órgano	PCR en tiempo real	ID	Órgano	PCR en tiempo real
7	Corazón	NEGATIVO	48	Corazón	NEGATIVO
	Diafragma	NEGATIVO		Diafragma	POSITIVO
	Cerebro	NEGATIVO		Cerebro	POSITIVO
11	Diafragma	NEGATIVO	49	Corazón	NEGATIVO
	Corazón	POSITIVO		Diafragma	NEGATIVO
21	Cerebro	NEGATIVO		Cerebro	POSITIVO
	Diafragma	NEGATIVO			
	Corazón	POSITIVO			

ID: Identificación del gato

7.6 PCR punto final de los tejidos de gatos

De los 14 casos evaluados, 5 casos fueron positivos, se obtuvieron productos de amplificación para los genes *B1*, *SAG3* y para las secuencias repetidas en tándem. En el ADN extraído del cerebro del gato 49 (G49), el gen *B1* amplificó un producto de 362 pb, visualizándose una banda tenue pero bien definida (Figura 13), el resto de los tejidos fueron negativos para este marcador.

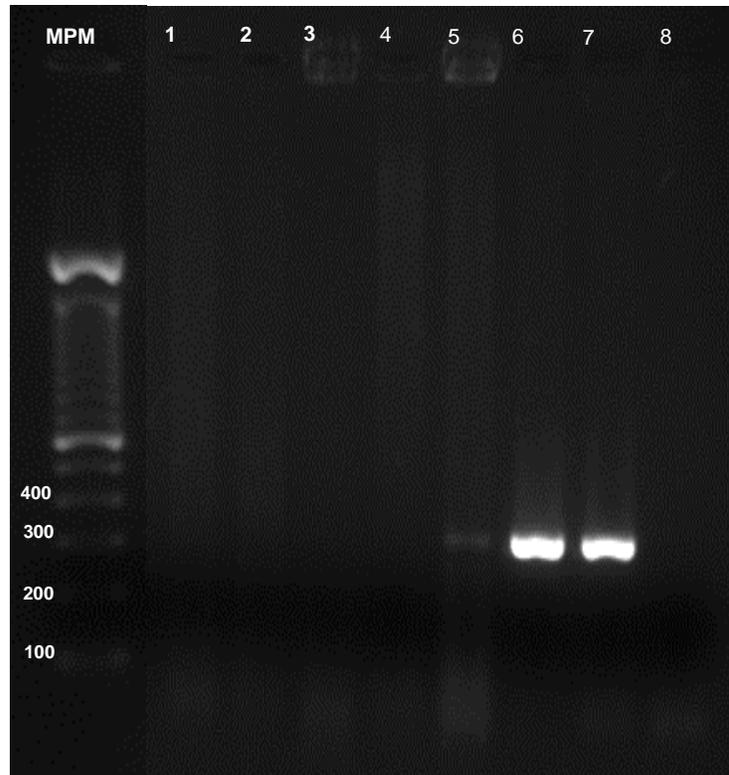


Figura 13. PCR punto final para la detección del gen *B1* de 362 pares de bases (pb) de *Toxoplasma gondii*. Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb. Carril 1: G11 (corazón), carril 2: G21 (corazón), carril 3: G48 (cerebro), carril 4:G48 (diafragma), carril 5: G49 (cerebro), carril 6: control positivo (RH), carril 7: control positivo (ME49), carril 8: agua destilada. Gel de agarosa al 1.5%

Para el marcador *SAG3*, en el corazón del G21 y el diafragma del G48 se visualizó una banda (Figura 14), de un peso esperado 311 pb, y otra banda por arriba de este peso.

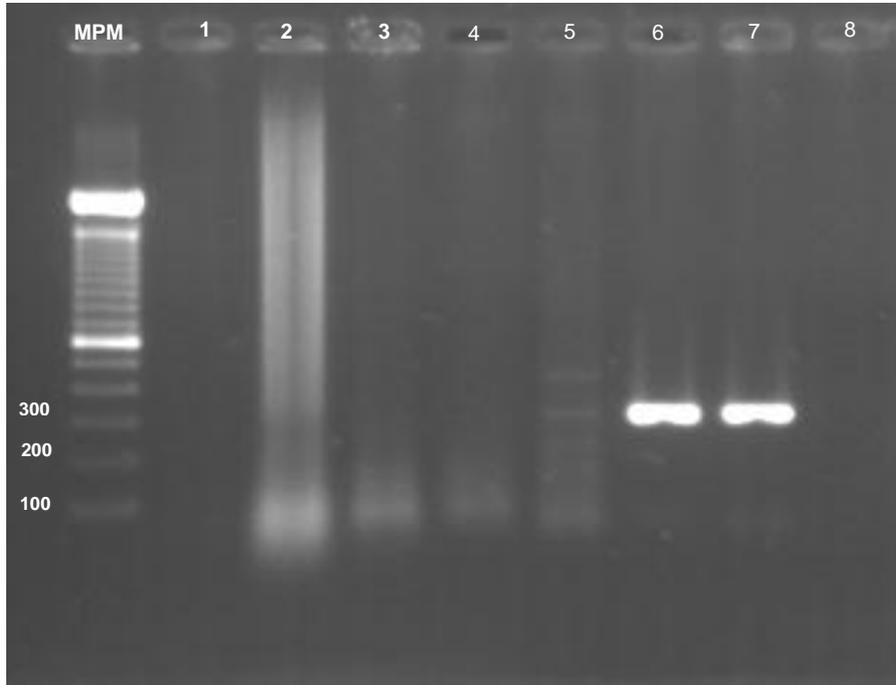


Figura 14. PCR punto final para la detección del gen *SAG3* de 311 pares de bases (pb) de *Toxoplasma gondii*. Carril 1: G11 (corazón), carril 2: G21 (corazón), carril 3: G48 (cerebro), carril 4: G48 (diafragma), carril 5: G49 (cerebro), carril 6: control positivo (RH), carril 7: control positivo (ME49), carril 8: agua destilada. Gel de agarosa al 1.5%

En el caso de la secuencia repetida en tándem, en el corazón del G21 y en el diafragma del G48, amplificaron para un producto de 529 pb, se visualizaron bandas tenues pero bien definidas (Figura 15).

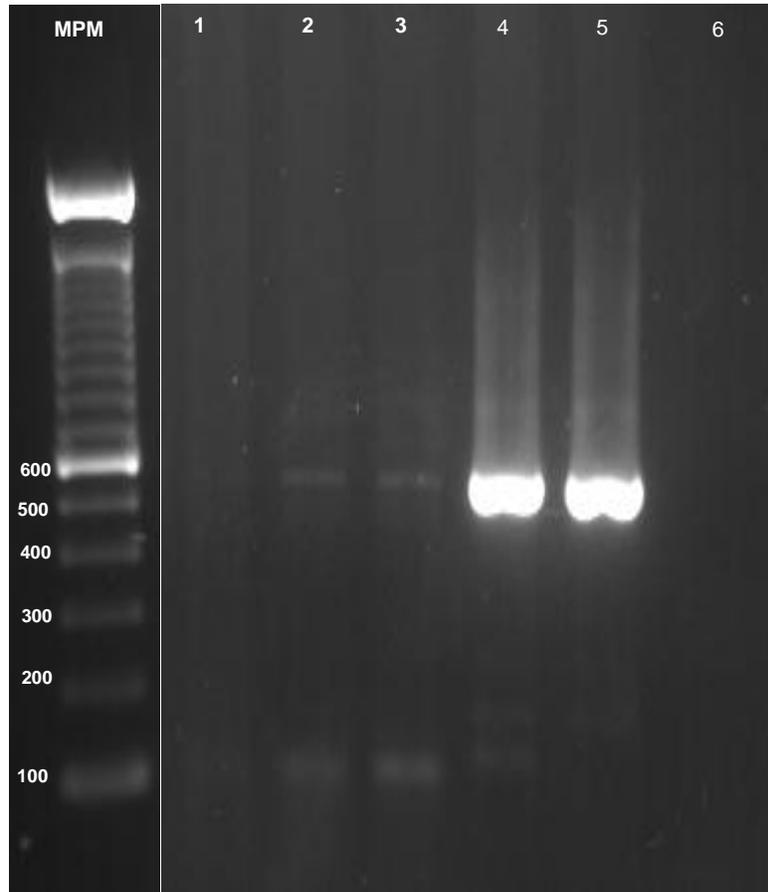


Figura 15. PCR punto final para la detección de secuencia repetida en tándem de 529 pares de bases (pb) de *Toxoplasma gondii*. Carril 1: G11 (corazón), carril 2: G21 (corazón), carril 3: G48 (diafragma), carril 4: control positivo (RH), carril 5: control positivo (ME49), carril 6: agua destilada. Gel de agarosa al 1.5%

Con respecto a los tejidos de gatos analizados, en el G7, los tejidos analizados fueron negativos tanto en PCR tiempo real, así como para los marcadores de PCR punto final. En 5 tejidos (4 gatos) fueron positivos a PCR en tiempo real, de estos solo el cerebro del G48 fue positivo al marcador SAG3, presentando dos bandas extras una del peso esperado de 311 pb y la segunda de 430 pb. El corazón de G21 fue positivo para el marcador de secuencias repetidas en tándem, observándose dos bandas extras la primera fue de 529 pb que es del tamaño del producto esperado y la segunda de 120 pb, mismas bandas se obtuvieron para el diafragma del G48, con respecto al G49, amplificó cerebro para el marcador B1 de 362 pb (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados moleculares en tejidos de gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo.

Marcador	Identificación de la muestra					
	G7	G11	G21	G48		G49
		Corazón	Corazón	Cerebro	Diafragma	Cerebro
B1 (62 pb)	-	+	+	+	+	+
B1 (619 pb)	-	-	-	-	-	-
B1 (362 pb)	-	-	-	-	-	+
SAG3 (311 pb)	-	-	-	+ 311 pb, 430 pb	-	-
Secuencias repetidas (529 pb)	-	-	+529 pb 120 pb	ND	+529 pb 120 pb	-
	-					

■ Banda del producto esperado

ND: No se determinó

G7 (gato 7) eliminado porque en tiempo real todas las muestras fueron negativas

7.7 Determinación de anticuerpos contra *T. gondii* en ratones

De los bioensayos, únicamente un ratón inoculado con cerebro y corazón del gato 49 seroconvirtió para alguna de las dos inmunoglobulinas (Figura: 16 y 17).

7.8 Necropsia

Los ratones que fueron positivos para algunas de las inmunoglobulinas, se eutanasiaron y de los tejidos obtenidos, se realizó impronta de cada uno de ellos, con la finalidad de observar quistes tisulares del parásito, únicamente en el ratón inoculado con homogenizado de cerebro, del gato 49 se pudo observar quistes tisulares de *T. gondii*. (Figura 18).

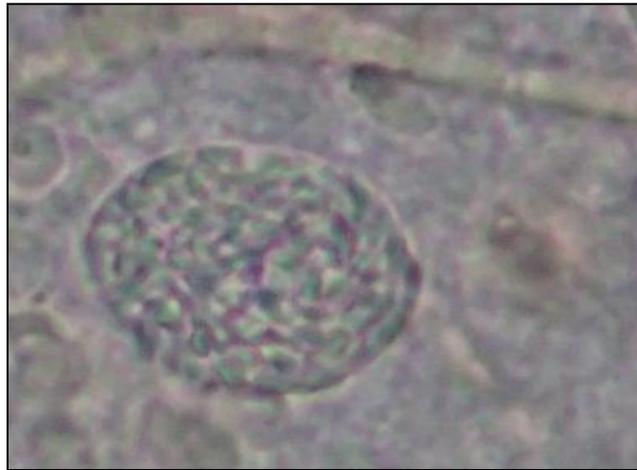


Figura 18. Quiste tisular en cerebro de ratón Balb/C, inoculado con cerebro de gato 49

Se logró el aislamiento del parásito a partir del tejido de cerebro del G49, a partir de un segundo pase en ratones Balb/C, donde se identificaron figuras parasitarias en forma de media luna, compatibles con (taquizoítos), en el lavado peritoneal.

7.9 PCR punto final del ratón inoculado con cerebro del gato 49

De los tejidos del ratón inoculado con cerebro del gato 49, se realizó la amplificación para el marcador GRA6. Únicamente los tejidos de cerebro, corazón y pulmón fueron positivos, mientras que el bazo y el hígado fueron negativos para este marcador (Figura 19).

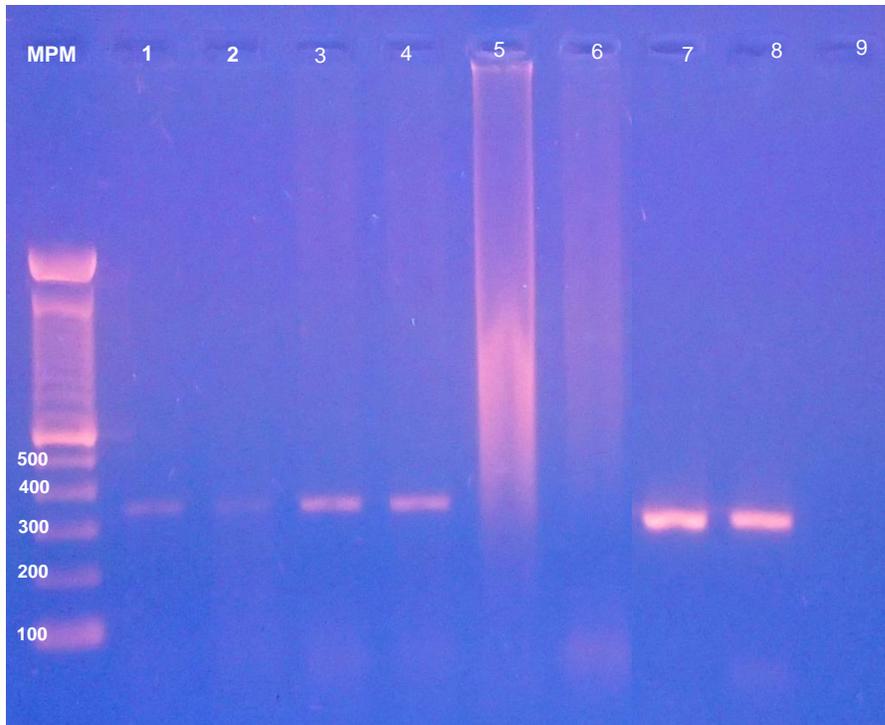


Figura 19. PCR punto final para la detección del gen *GRA6* de 344 pares de bases (pb) de *Toxoplasma gondii* a partir de tejidos de ratón. Carriles 1: impronta de cerebro, carril 2: cerebro, carril 3: corazón, carril 4: pulmón, carril 5: bazo, carril 6: hígado, carril 7: RH, carril 8: ME49, carril 9: agua destilada. Gel de agarosa al 1.5%

7.10 PCR-RFLP

Se logró caracterizar genéticamente a dos muestras. La primera de ellas corresponde al cerebro del gato 48, realizada a partir de la amplificación del gen SAG3, el cual fue digerido con la enzima *NciI*. La digestión del ADN evidenció tres bandas de 60, 100, 150 pb, así como una banda extra de 420 pb, la cual es sugerente de la que presentó el control positivo de la cepa RH, que correspondió a alelos para el genotipo I (Figura 20).

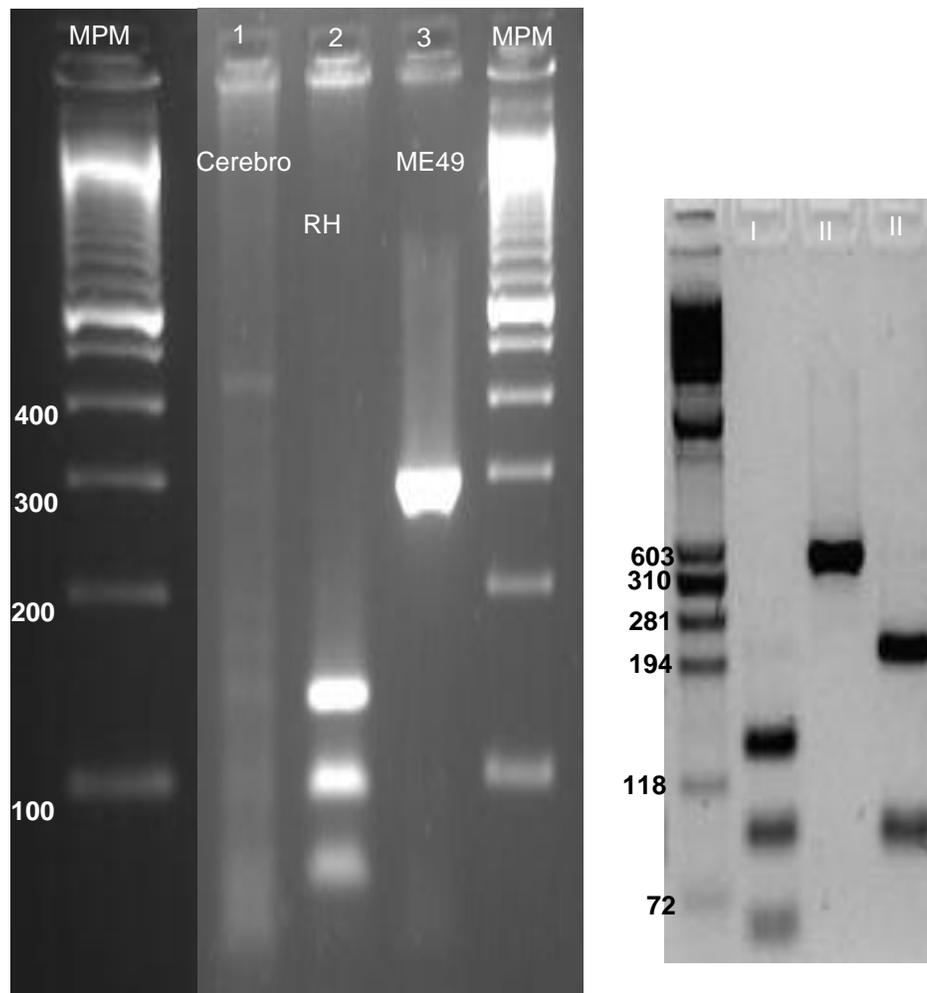


Figura 20. RFLP del gen *SAG3* de *Toxoplasma gondii* del gato 48. La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima de restricción *NciI*. Después de la digestión se obtuvo un patrón de tres bandas para las cepas tipo I, ADN sin digerir para las de tipo II y un patrón de dos bandas para las tipo III, como se muestra en la imagen de la derecha. Tomado y modificado de Su *et al.*, 2006. Gel de agarosa al 3.5%

La segunda tipificación corresponde al aislamiento del ratón inoculado con cerebro del gato 49, la digestión se realizó a partir del marcador *GRA6*, se observaron dos bandas una de 70 pb y 170 pb semejantes al patrón de alelos del genotipo III (Figura 21).

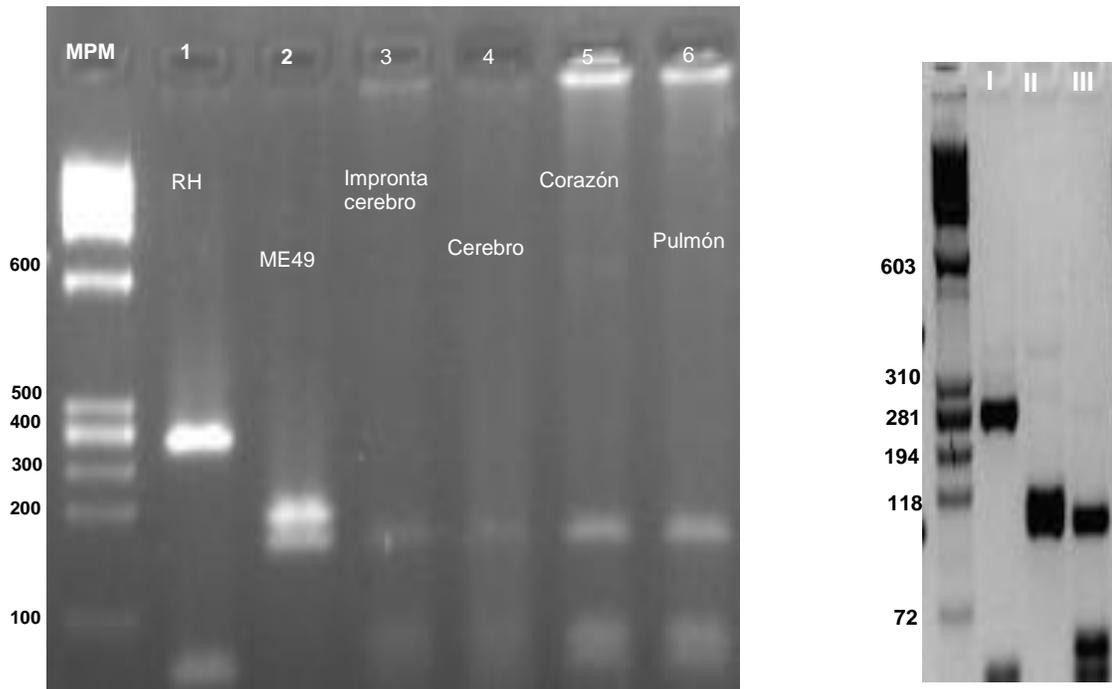


Figura 21. RFLP del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii*, a partir de tejidos de ratón. La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima de restricción *Mse I*. Después de la digestión se obtiene un patrón de dos bandas para las cepas tipo I, ADN sin digerir para los tipos II y un patrón de dos bandas para las tipo III, como se muestra en la imagen de la derecha. Tomado y modificado de Su *et al.*, 2006. Todas las muestras fueron digeridas, el patrón mostrado corresponde a una cepa tipo III. Gel de agarosa al 3.5%

8. Discusión

Los felinos son los únicos hospederos en los que se desarrolla la fase sexual del ciclo del parásito y donde se producen los ooquistes, por lo que su presencia es esencial en el ciclo biológico de este protozoo (Jones y Dubey, 2010).

El 17% de los gatos analizados (12/70) presentaron anticuerpos IgG contra *T. gondii*. Este valor es menor a lo reportado en otros estados de la República Mexicana, que van del 21% al 70%, lo cual puede explicarse debido a las técnicas utilizadas (ELISA y la PCR), tipo de gato (con dueño y sin dueño), además de factores como: edad, sexo, alimento proporcionado, clima, así como la presencia de plagas (Esquivel- Alvarado *et al.*, 2007; Galván *et al.*, 1999; García-Márquez *et al.*, 2008; Besné-Mérida *et al.*, 2008 y Castillo-Morales *et a.*, 2012; Györke *et al.*, 2011).

Asimismo los resultados del presente estudio coinciden con el planteamiento de Dubey (2010), quien indica que la seroprevalencia de *T. gondii* en cualquier especie varía según el área geográfica analizada, siendo mayor en climas cálidos y zonas bajas y húmedas, en comparación con climas fríos y zonas montañosas y secas; lo cual tiene relación con las condiciones ambientales que favorecen la esporulación y la supervivencia de los ooquistes. Mientras que en Tizayuca generalmente el clima es más seco, con lluvias únicamente en verano, lo cual no son condiciones tan favorables para permitir la esporulación de los ooquistes. Con respecto a la frecuencia de seropositividad encontrada entre gatos con dueño y sin dueño, la mayor frecuencia se encontró en el segundo grupo, lo cual puede deberse al estilo de vida del animal; este tipo de gatos al tener acceso al exterior, tienen una mayor probabilidad de cazar, algunos hospederos intermediarios (aves y ratones) con quistes tisulares del parásito (Lappin, 2010; Györke *et al.*, 2011).

El hecho de no haber observado diferencias por género en los gatos, sugiere que ambos son susceptibles a la infección por el parásito (Fernández *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 1999).

Respecto a la edad, el hecho de haber encontrado una mayor positividad en los gatos adultos puede deberse a que con la edad se incrementa la posibilidad de contacto con algunos de los estadios de *T. gondii* (Lucas *et al.*, 1999 y Castillo-Morales *et al.*, 2012).

Es importante señalar que los gatos sin dueño fueron más susceptibles a infectarse con el parásito dado que principalmente se alimentan de presas vivas, lo cual es importante por la convivencia que presentan no solo con los gatos con dueño, sino también con otro tipo de animales, además del ser humano (Chávez-Crisóstomo, *et al.*, 2010).

En trabajos similares se ha reportado que gatos que consumían carne o vísceras crudas tenían mayores niveles de anticuerpos comparándolos con aquellos que tenían una alimentación basada en alimento comercial, ya que en dichos tejidos es posible la presencia de quistes, principalmente en sistema nervioso central, músculo estriado esquelético y cardíaco, y algunos otros órganos que generalmente se proporcionan como comida a los gatos (Lucas *et al.*, 1999; GyöCzke *et al.*, 2011 y Besné *et al.*, 2008).

Con respecto a la no detección de lesiones macroscópicas sugerentes de *T. gondii* durante la necropsia, incluyendo a los gatos con diagnóstico confirmado de PCR, puede ser debido a que la infección por el parásito depende en gran medida del sistema inmune del hospedero, el cual debe de ser capaz de controlar al parásito, a pesar de los mecanismos de evasión con los que cuenta (Barrs *et al.*, 2006; Jokelainen *et al.*, 2012 y Ha-Young *et al.*, 2009).

En relación a la ausencia de lesiones histopatológicas existen trabajos donde se informa que en secciones de tejidos teñidos por HE no se observaron quistes tisulares de *T. gondii*, debido a que puede existir poca cantidad de los parásitos para poder ser observados, o bien las lesiones pueden ser muy pequeñas, las cuales pueden pasar inadvertidas, mismos resultados se han descritos en ovejas y cabras (Silvia *et al.*, 2013; Jokelainen *et al.*, 2012).

Otra razón es que durante la necropsia, se pueden obtener muestras de tejido que no tengan quistes, lo cual también ha sido reportado por Gallego *et al.*, 2006.

En un trabajo realizado en Transilvania para determinar los parásitos más frecuentes en gatos y la asociación con factores de riesgo, se encontró que *Toxocara cati* (20.3%) fue uno de los más frecuentes, mientras que *T. gondii*/*H. hammondi* (1.2%), *Sarcocystis spp.* (1%), tuvieron una escasa frecuencia, cabe destacar que este estudio se realizó en condiciones semirurales, donde los gatos tienen acceso al exterior y, pueden cazar algunos de los hospederos intermediarios de los parásitos, además de la poca o nula ausencia de desparasitaciones en los gatos (Mircean *et al.*, 2010), situación similar a la de los gatos del presente estudio. De los 5 gatos eutanasiados, en uno de ellos se encontró *Sarcocystis spp.*, que pertenece al Phylum Apicomplexa con afinidad tejido muscular (Dubey *et al.*, 2000). Del total de gatos en 4 de ellos se encontró *A. abstrusus* el cual es un nemátodo, cuyos hospederos intermediarios son los caracoles y las babosas (Pérez *et al.*, 2012).

En el país existen cuatro reportes de aislamientos en gatos, los genotipos encontrados corresponden a los tipo I, III y recombinantes (Besné-Mérida *et al.*, 2008; Dubey *et al.*, 2009).

En relación a los resultados del aislamiento, el porcentaje de positivos fue menor a lo que se reporta en la literatura, dado que de 15 ratones inoculados solo en 1 se pudo lograr aislar al parásito, lo que representa el 6%, mientras que Dubey., 1995 obtuvo el 14.3% y Montoya *et al.*, 2009 encontraron un 64%, ya que ellos utilizaron 10 y 5 g de tejido respectivamente, mientras que en este trabajo se inocularon 100 µl (equivalente a 3000 µg).

Otra posibilidad de haber obtenido un porcentaje, bajo de aislamientos, fue la técnica empleada al momento de la inoculación, dado que a la hora de realizar la inoculación las muestras no fueron digeridas con pepsina o bien tripsina, como lo señalan algunos protocolos, aquí el único método utilizado fue la de maceración del tejido o simplemente puede deberse a que la porción inoculada en los ratones, no llevara quistes tisulares (Gallego *et al*, 2006; Besné *et al*, 2010; Montoya *et al*, 2009).

Es importante señalar que del total de ratones que fueron inoculados, ninguno murió a causa de la infección, los únicos signos clínicos que presentaron fue pelo hirsuto, decaimiento, los cuales son inespecíficos del parásito, debiéndose al manejo al momento de inocularlos, por lo que el presente estudio concuerda con otros trabajos en donde se han infectado ratones con *T. gondii*, permaneciendo clínicamente sanos, dado que el tejido inoculado no llevaba quistes tisulares o bien que al ser una cepa no virulenta el sistema inmune del ratón, logra controlarla (Dubey, 1992; Canada *et al.*, 2002).

Al respecto aquellos animales que fueron positivos por serología, no se encontró relación entre los resultados de esta y PCR, ya que no todos los tejidos de los gatos fueron positivos por biología molecular. El hecho de ser animales seropositivos no garantiza que se pueda aislar el ADN parasitario a partir de algún tejido dado el tamaño microscópico de los quistes tisulares y al tamaño de la muestra analizada (Gallego, 2006). Existen estudios, donde se ha observado una mayor afinidad por músculo esquelético, seguido de tejido nervioso, cuyos resultados concuerdan con lo obtenido en el trabajo dado que del total de tejidos analizados, 3 fueron positivos en diafragma y 2 en cerebro (Dubey *et al.*, 2006).

Respecto a que por PCR en tiempo real, se pudieron detectar mayor cantidad de tejidos positivos en comparación con la PCR en punto final, se debe a que la primera tiene una sensibilidad analítica del 98% comparándola con otras técnicas, mientras que la PCR convencional permite detectar el ADN de 10 taquizoítos, la PCR en tiempo real, detecta el ADN de un taquizoíto (Priya *et al.*, 2002).

También se observó durante el estudio, que las muestras que resultaban positivas para algún gen no mostraron amplificación de otros marcadores. En este caso en las muestras donde solo se amplificó el gen B1 y ningún otro, puede deberse en parte, al número de copias (35) del gen B1 presentes en el genoma de *T. gondii* (Hyman *et al.*, 1995), se conoce que cuando la secuencia molde se presenta en múltiples copias en el genoma, la sensibilidad analítica del ensayo se incrementa (Weiss, 1995).

Si el parásito se encuentra muy disperso en los tejidos se deberá recolectar y procesar mayor cantidad de muestra de un órgano para asegurar su detección por PCR o bien otra alternativa es tomar diferentes muestras del órgano a evaluar y hacer un homogenizado del tejido, para incrementar las posibilidades de detección por ejemplo, en el procesamiento del corazón del gato se utilizó exclusivamente una porción del ápice y otra de un ventrículo para que en conjunto se obtuvieran aproximadamente 300 mg de tejido (Wastling *et al.*, 2003).

Otro de los marcadores utilizados fue el de las secuencias repetidas en tándem, que permitió identificar un mayor número de muestras positivas comparándolo con los otros marcadores utilizados, esto se explica dado que las secuencias repetidas en tándem, están 200 a 300 veces en el genoma de *T. gondii* teniendo una mayor sensibilidad que el B1 (Homan *et al.*, 2000), aumentando la probabilidad de detección en las muestras que llegan a tener el ADN del parásito.

En el trabajo se pudo observar que para algunos marcadores si hubo amplificación, mientras que para otros no la hubo, o se obtuvieron bandas por encima o por debajo del peso molecular esperado, esto podría deberse a que la cepa aislada no es una cepa típica, por lo que se especula que presenta cambios en las secuencias de este gen y por lo tanto, los iniciadores usados no pudieron hibridar con la secuencia que posee este gen en particular de esta cepa aislada (Besné *et al.*; 2008). Para comprobarlo es necesario realizar la caracterización genética del *T. gondii* a partir del aislado y que actualmente se mantiene en el INP.

9. Conclusiones

La presencia de *Toxoplasma gondii* en los gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, trae consigo un riesgo potencial de infección para todos los posibles hospederos, ya sean intermediarios o definitivos, exponiendo al ser humano a una zoonosis.

El principal factor de riesgo determinado fue el asociado a gatos alimentados con una dieta que incluyera carne y/o vísceras crudas.

Se logró obtener un aislado de *Toxoplasma gondii*, a partir de ratones Balb/c, el cual presentó un genotipo tipo III para el marcador *GRA6*.

Los gatos de la cuenca lechera presentaron infecciones con *Sarcocystis spp* y *Aelurostrongylus abstrusus*.

10. Perspectivas

Es importante considerar y estudiar la presencia de la toxoplasmosis en otros animales como los bovinos, perros y fauna silvestre, sin dejar a un lado a la población humana (hospederos intermediarios), por la convivencia con el gato (hospedero definitivo).

De los aislados obtenidos se podrán realizar las secuenciaciones correspondientes y compararlas con las reportadas en las diferentes especies.

10. Bibliografía

Ajzenberg D, Bañuls A.L, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, *et al.* Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int J. Parasitol. 2004. 34:1185–96.

Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: A collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog. 2005. 137-148.

Aluja SA. Constantino FC. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2^{ed}. Manual moderno. 2002. México. DF.

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. J. Parasitol. 2007 93(5):1214-6.

Barrs VR, Martin P, Beatty JA. Antemortem diagnosis and treatment of toxoplasmosis in two cats on cyclosporin therapy. Aust Vet J. 2006.84(1-2):30-5.

Besn -Mérida, JA. Figueroa-Castillo, JJ. Martínez-Maya, H. Luna-Past n, E. Calder n-Segura, and D. Correa, "Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. 2008. Vet Parasitology. 157: 310–313.

Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(3):607-23.

Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. Lancet. 1997;350(9072):173-7.

Bowman JD, Georgis Parasitology for veterinarians, 2ed., Elsevier, U.S.A., 2004.

Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S. Comparison between two real-time PCR assay and a nest-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. Acta Biomed. 2006. 77:75-80.

Canada N, Meireles CS, Rocha A, da Costa JM, Erickson MW, Dubey JP. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses.

Castillo-Morales V, Acosta-Viana KY, Guzmán-Marín ES. Jiménez-Coello M. Segura-Correa J. Aguilar-Caballero J. Ortega-Pacheco A. Prevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Cats from the Tropics of Mexico Using Serological and Molecular Test. 2012. Interdiscip Perspect Infect Dis. (10): 1-6

Cedillo- Peláez C. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna Silvestre. (Tesis de maestría). México, D.F. FMVZ. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009.

Chávez- Crisóstomo DO. Aislamiento de *Toxoplasma gondii*, de tejido cerebral de un bovino infectado naturalmente en México. (Tesis de Maestría). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010.

Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A, Picot S. Evaluation of a real time PCR based assay using the lighcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradizoite gene in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. Int J Parasitol 2005; 35:275-83.

Correa D, Caballero-Ortega H, Rico- Torres CP, Cañedo- Solares I, Ortiz-Alegria LB, Becerra-Torres E. Advances in the immunology of parasitic diseases in: Terrazaz, editor. Immunology of congenital toxoplasmosis. 2007. Research signpost, 199-224.

Dardé ML. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol. 1996; 219: 27-41.

Dolores EH, Sreekumar C. Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev . 2004; 6: 41-6.

Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC. Press Boca Raton, Florida. Usa. 1988.

Dubey JP, Brown CA, Carpenter JL, Moore JJ . Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. Vet Parasitol. 1992; 44(3-4):305-9.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998; 28: 1019-1024.

Dubey J, Bhaiyat M, de Allie C, Macpherson C, Sharma R, Sreekumar C, *et al.* Isolation tissue distribution and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens Grenada, West Indies. J. Parasitol. 2000; 91:557-60.

Dubey JP. Unexpected oocysts shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: *In vivo* stage conversion and strain variation. Vet Parasitol. 2005; 133: 289-298

Dubey J, Sundar N, Gennari S, Minervino A, Farias N, Ruas J, *et al.* Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the

North Parana state and the South state Rio Grande do Sul, Brazil revealed high diverse and distinct parasite populations. *Vet Parasitol.* 2007.143:182-8. 102.

Dubey JP, Moura I, Majumdar D, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OCH, Kelly P, Krecek RC, Su C. Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. *J Parasitol.* 2009; 136: 589–594.

Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans.* (2010). CRC PRESS. 2 edición: Betsville, Maryland, USA. Pag: 52-54.

Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans.* 2010. 2nd ed. Maryland: CRC Press. 319 pp.

Fernández F, Ouviaña G, Clot E, Fernandez GR, Codoni C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina, 1993. *Vet Parasitol.* 1995; 59:75-79.

Fowler ME, Miller RE. Editor. *Zoo and wild animal medicine. Currente therapy.* Vol 6. St Louis, Missouri, USA. Saunders. 2008.

Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín E. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Trop.* 2006; 97: 161–167.

Galván-Ramírez ML, Sánchez VG, Vielma SM, Soto MJL. Presence of anti-*Toxoplasma gondii* in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. 1999. *Rev Soc Bras Medic Trop.* 32: 483-488.

Galván-Ramírez ML. Mondragón RF. *Toxoplasmosis en humano.* Guadalajara, México: Ediciones Cuellar, 2001: 105-109.

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

Green C. *Enfermedades infecciosas en perros y gatos.* 2 edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 2000.

Grigg M, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 2001; 294:61-5.

Guevara CD. Identificación de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en heces de gatos del Distrito Federal, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1986.

Györke A, Opsteegh M, Mircean V, Iovu A, Cozma V. *Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: Evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors. Pre Vet Med. 2011.15; 102 321– 328.

Ha-Young K, You-Chan B, Gye-Hyeong W, Jae-Won B, Byeong Yeal J, Jung-Won P, Jae-Yong C, Hiroyuki N, Yi-Seok J, O-Soo L. Toxoplasmic meningoencephalitis in a stray cat in Korea. K J Vet Res. 2009. 49(4): 291-295.

Heffess CS, Mullick FG. Métodos histotecnológicos. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington, DC.1995.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. C Microbiol Inf. 2002; 8:634-40.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biological and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. A Heal Res Rew. 2005; 6 (1): 41-61.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biological and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. A Heal Res Rew. 2005. 6(1):41-61.

Homan WL, Vercammen M, Braekeleer J, Verschueren. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol 2000.30(1) 69-75.

Howe D, Sibley L. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. 1995. J Infected Dis 172:1561-6.

Howe DK, Honore S, Deroouin F, Sibley D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. 1997. J Clin Microbiol. 35 (6): 1411-1414

Hyman JA, Jhonson LK, Tsai MM, O'Leary TJO. Specificity of polymerase chain reaction identification of *Toxoplasma gondii* infection in paraffin-embedded animal tissues. J Vet Diagn Invest.1995.7(2): 275 – 278.

Jokelainen P, Simola O, Rantanen E, Näreaho A, Lohi H, Sukura A. Feline toxoplasmosis in Finland: cross-sectional epidemiological study and case series study. J Vet Diagn Inves. 2012; 24(6):1115-24.

Jones CD, Okhravi N , Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30 and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Inves Ophthalmol Vis Sci.* 2000. 41(3): 634-644

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis recent developments. *Exp Parasitol.* 2010. 124(1):10-25

Khan A, Su C, German M, Storch GA, Clifford DB, Sibley D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5881-7.

Krauss H, Weber A. Zoonoses Infectious Diseases Transmissible from animals to humans. 2003.3 ed. Canada: ASM. Press.

Lappin MR. Update on the diagnosis and management of *Toxoplasma gondii* infection in cats. *Top Com Ani Med.*2010. 25(3):136-41.

Lehmann T, Graham DH, Dahl ER, Bahia-Oliveira LM, Gennari SM, Dubey JP. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect Genet Evol.* 2004. 4:107-14.

Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences Science USA.* 2006. 103:11423-8.

Lucas SR, Hagiwara MK, Loureiro Vd, Ikesaki JY, Birgel EH. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats. *Rev Inst Trop de São Paulo.* 1999. 41(4):221-4.

Martínez BI, Ruiz GLA, Gutiérrez QM, Fernández PAM, Vázquez TO. Frecuencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos de la ciudad de México y área metropolitana. 1996. *Revista Mexicana Patología Clínica.* 43: 121-127.

Maruyama S, Hiraga S, Yokoyama E, Naoi M, Tsuruoka Y, Ogura Y. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* infections among pet cats in Kanagawa and Saitama prefectures. *J Vet Med Sc.*1998; 60:997-1000.

McGavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease. 4 th ed. Mosby Elsevier. China. 2007.

Medina E, Mata O, Carpio JC, Zabala A, Ruíz A. En: Correa D, Mandujano A, Medina Y, Editores. Manual de técnicas modernas en inmunología teoría y práctica. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico, SSA, México, 2001:15-20

Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4:876.

Mircean V, Titilincu A, Vasile C. Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. Vet Parasitol. 2010 Jul 15;171(1-2):163-6.

Miró G, Montaya A, Santos JC, Frisuelosa MA, Fuentes I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. Vet Parasitol. 2004; (126) 249–255.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004; 363 (9425):1965-1976.

Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. The Journal of Infections Diseases. 2002; 185.

Muñiz HS, Mondragón FR. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. Revista de Educación Bioquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009. 28 (2): 52-58.

Muñiz SH, Mondragón RF. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. 2009. REB. 28(2): 52-58.

Nogami S, Moritomo T, Kamata H, Tamura Y, Sakai T, Nakagaki K, Motoyoshi S. Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* in domiciled cats in Japan. J Vet Med Sci. 1998; 60: 1001-1004.

Organización Mundial de Epizootias. Disponible en URL: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.10.%20Toxoplasmosis.pdf. Consultado en: Mayo 2013.

Ovalle F, García A, Thibauth J, Lorca M. Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Valdivia city, Chile. Boletín Chileno Parasitología. 2000; 55(3-4):94-9.

Pena HF, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res Vet Sci. 2006. 81(1):58-67.

Pérez TG, Tellechea MF, Villone S, Gueijman J. Revisión de la neumonía verminosa por *Aelurostrongylus*: a propósito de un caso clínico. Hospital veterinario de Virreyes, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires Argentina. Consultado Marzo 2010 en: <http://www.aamefe.org/aelurostrongylosis1.html>.

Priya J, Calderon MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, *et al*. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting Toxoplasmic encephalitic in patients with AIDS. J Clin Microbiol 2002; 40:4499-4503.

Rajendran C, Su C. Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. 2012. Infect Genet Evol. 12(2) 359-368.

Rico-Torres CP, Estandarización y validación a nivel de laboratorio de una prueba de PCR para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas. (Tesis de Licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2005.

Sharif M, Daryani A, Nasrolahei M, Ziapour SP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats in Sari, northern Iran. Trop Anim Health and Prod . 2009;41(2):183-7.

Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strain of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature. 1992. 359:82-5.

Sibley D, Khan A, Ajioka W, Rosenthal B. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009.364:2749-61.

Silva AF, Oliveira FC, Leite JS, Mello MF, Brandão FZ, Leite RI, Frazão-Teixeira E, Lilenbaum W, Fonseca AB, Ferreira AM. Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. Vet Parasitol. 2013. 191(3-4):347-52

Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Int J Parasitol. 1997. 27 (10): 1135-1145.

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

Sung-Hee H. Young-Il J. Jae-Young K. , Shin-Hyeong C. Won-Ja L. Sang-Eun L. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Household Cats in Korea and Risk Factors. 2013. Kor J Parasitol. 51(3) 357-361.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13):1217-58.

Tenter MA, Heckeroth RA, Weiss ML. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000. 30(12-13): 1217–1258.

Velmurugan GV, Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. Vet Parasitol. 2008; 155:314-8.

Wang Q, Wei J, Yong JC, Chun YL. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies circulating antigens and DNA in stray cats in Shanghai, China. 2012. Parasit Vectors. 5:190

Wastling JM, Mattsson JG. Detection of *T.gondii*. Methods Molecular Biology. 2003; 216:289-97.

Weiss JB. DNA probes and PCR diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995; 8:313-30.

11. Anexos

ANEXOS I: Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de carbonatos (15 mM, pH: 9.6)

- 1.59 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 1.26 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Disolver los carbonatos en 800 ml de agua destilada
- Ajustar el pH a 9.6, se afora a 1000 ml
- Mantener a 4 °C

PB 10X

- Se pesan 2.62 g de Fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) más 11.5 g de Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4), se disuelve en 200 ml de agua destilada
- Se afora a 1000 ml

PBS 1X

- Se pesan 8.75 g de cloruro de sodio y se disuelve en 100 ml de PB 10X
- Se afora a 1000 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 7.2

Solución amortiguadora de lavado (PBS-Tween 20 al 0.05%)

- Medir 500 μL de Tween 20
- Diluir en 1000 mL de PBS 1X, ajustar el pH 7.2
- Mantener a 4°C

Solución de cromógeno sustrato (ELISA) para peroxidasa

- Añadir 5 ml de ácido cítrico (0.1 M) y 5 ml de citrato de sodio (0.1 M)
- Se agrega 5 mg de orto-fenilendiamina (OPD)
- Adicionar 4 µl de H₂O₂

NOTA: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla (máximo de 30 minutos).

Solución de formalina neutra al 10% tamponada

Procedimiento:

- Se colocan 500 mL de agua destilada
- Posteriormente se agregan los 4 g de fosfato monobásico
- Se agregan 50 mL de la formalina
- Agregar 6.5 g de fosfato dibásico mas el resto de agua destilada
- Adicionar 50 mL de la formalina restante

ANEXOS II: Técnicas de laboratorio

A) ELISA indirecto gato (tomado y modificado de Besné y *et al.* 2008).

- Los pozos de la placa se sensibilizan con extracto crudo de *Toxoplasma gondii* a una concentración de 2 µg/µL, diluido en solución de carbonatos (pH:9)
- De la mezcla adicionar 100 µL/pozo a las placas de ELISA
- Incubar durante toda la noche a 4°C
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Cada pozo se bloquea con 200 µL albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y se incuba a 37 °C durante 30 minutos
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Se adiciona el suero problema, diluido 1:200 en PBS-Tween 0.05%, agregando 100 µL/pozo
- Se incuba durante 2 horas a 37°C
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Se adiciona el conjugado anti-IgG de gato, diluido 1:10,000 en PBS-Tween 0.05%, agregando 100 µL/pozo
- Se incuba durante 2 horas a 37°C
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Se agregan 100 µL por pozo del cromógeno-sustrato para peroxidasa (ácido cítrico, citrato de sodio y OPD, y H₂O₂)
- Se deja incubar en la oscuridad, no por más de 30 minutos
- Se agregan 50 µL por pozo de una solución de ácido sulfúrico 2N
- Se realiza la lectura en un espectrofotómetro para ELISA a 490 nm

ELISA indirecto ratón (tomado y modificado de Besné *et al*, 2008).

- Se sensibiliza los pozos de la placa con extracto crudo de *Toxoplasma gondii* a una concentración de 2 µg/µL, diluido en solución amortiguadora de carbonatos (pH 9)
- De la mezcla adicionar 100 µL/pozo a las placas de ELISA
- Incubar durante toda la noche a 4°C
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Cada pozo se bloquea con 200 µL albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y se incuba a 37 °C durante 30 minutos
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Se adiciona el suero problema, para el caso de IgG:1:250, IgM:1:50 diluido en PBS-Tween 0.05%, agregando 100 µL/pozo
- Se incuba durante 2 horas a 37°C
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Se adiciona el conjugado, anti-IgG a una dilución de 1:1000, anti-IgM:1:500 diluido en PBS-Tween 0.05%, agregando 100 µL/pozo
- Se incuba durante 2 horas a 37°C
- Se lava la placa por 5 veces con PBS- Tween 0.05%
- Se agregan 100 µL por pozo del cromógeno-sustrato para peroxidasa (ácido cítrico, citrato de sodio y OPD, y H2O2)
- Se deja incubar en la oscuridad, no por más de 30 minutos
- Se agregan 50 µL por pozo de una solución de ácido sulfúrico 2N
- Se realiza la lectura en un espectrofotómetro para ELISA a 490 nm

Extracción de ADN

- Se pesan 200 mg de cada tejido, el cual se coloca en un mortero para macerar muy bien el tejido
- La mezcla se trasfiere a un tubo eppendorf 1.5 mL, donde se coloca 1.5 mL de solución de lisis celular
- Se agrega la solución se mezcla, y los tubos se colocan en el termoblock a 65 °C, durante una hora, pasado el tiempo, se retiran del termoblock y se dejan enfriar a temperatura ambiente por unos 5 min
- Mientras tanto se ajusta la temperatura del termoblock a 55 °C, los tubos que se retiran del termoblock se le agregan 10 µL de proteinasa K (20 mg/ml), y se deja incubando toda la noche
- Al otro día se sacan los tubos eppendorf, y el contenido se transfiere a tubos falcon de 15 mL, a los cuales se le agregan 2 mL de solución precipitadora de proteínas, se mezcla perfectamente y se meten a centrifugar a 4000 rpm durante 10 min
- Transcurrido el tiempo, se recupera el sobrenadante y se trasfiere a un nuevo tubo de 15 mL, agregando 2 mL de isopropanol y se agita por inmersión (20 veces)
- Se centrifugan a 4000 rpm durante 10 min, pasado el tiempo se sacan los tubos y decantas cuidadosamente de una sola intención
- Posteriormente se agregan 2 mL de etanol al 70% frío, para lavar el botón de ADN, se vuelve a centrifugar 4000 rpm durante 10 min, es muy importante decantar con mucho cuidado y dejas tus tubos secando por una hora.
- Finalmente se agregan 100 µL de solución hidratadora, y se congelan -20 °C hasta su posterior uso

Lista de cuadros

Cuadro 3. Frecuencia de anticuerpos IgG anti-*T.gondii* en gatos con y sin dueño del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo

Tipo	Número	Positivos	RM (95%)	P
Con dueño	47	5 (10.6%)	1.58 (0.4-5.6)	0.24
Sin dueño	23	7 (30.4%)		

Cuadro 4. Frecuencia de anticuerpos IgG anti-*T.gondii* por género en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo

Género	Número	Positivos	RM IC (95%)	P
Machos	27	8 (29.6%)	0.76 (0.20-2.82)	0.35
Hembras	43	4 (9.3%)		

Cuadro 5. Relación de seropositividad por edad de anticuerpos contra *T. gondii* en gatos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo

Rango de edad (años)	Número de gatos	Positivos (%)
Grupo 1: 2 a 6 meses	6	0 (0%)
Grupo 2: 6 a 12 meses	22	4 (18.1%)
Grupo 3:>12 meses-10 años	42	8 (19.0%)

Cuadro 6. Tipo de dieta proporcionada a los gatos (con dueño) y su relación con la seropositividad a anticuerpos contra *T.gondii* en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo.

Tipo de alimento	Número de gatos (%)	Positivos (%)	OR IC (95%)	P
Grupo I	13 (27%)	5 (10.4%)	21.2(1.8-556.2)	0.08
Grupo II	21 (43.7%)	1 (2.0%)	0.2(0.0-2.2)	0.1
Grupo III	14 (29.1%)	0 (0%)	0(0-2.2)	0.1

Grupo I: gatos que dentro de su dieta se incluía carne y/o comida con vísceras crudas

Grupo II: gatos que dentro de su dieta se incluían sobras de comida casera u otro tipo de alimento, excepto comida cruda

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

Lista de figuras



Figura 5. Distribución de mascotas en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca. Hidalgo (2013).



Figura 6. Distribución de la población de gatos en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca. Hidalgo (2013).



Figura 7. Presencia de ratas en establos, en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca. Hidalgo (2013).



Figura 8. Establos con gatos positivos a ELISA, en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca. Hidalgo (2013).

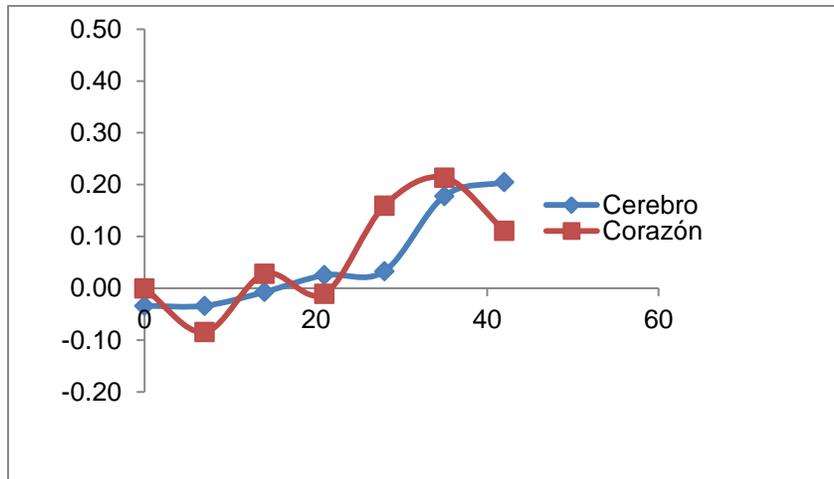


Figura 16. Cinética de anticuerpos IgM contra *T. gondii* de ratones inoculados con órganos de un gato seropositivo (G49).

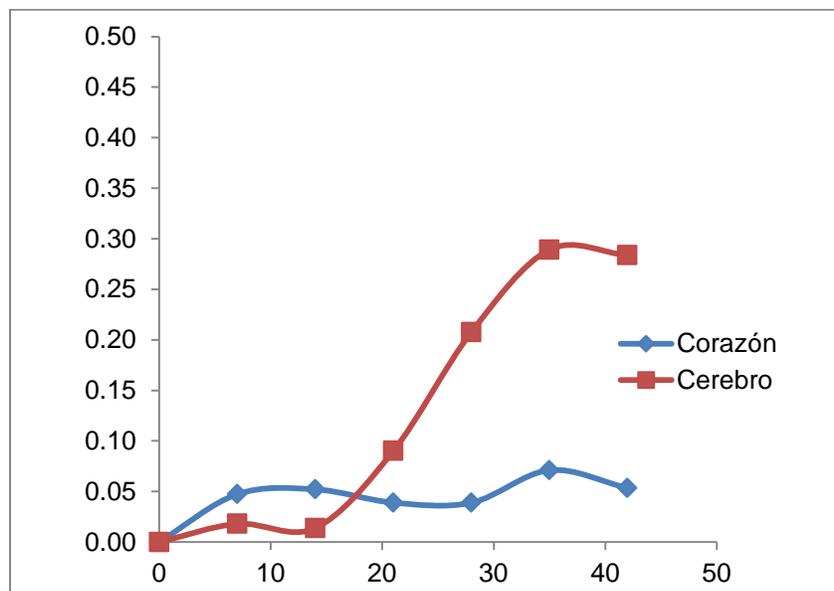


Figura 17. Cinética de anticuerpos IgG contra *T. gondii* de ratones inoculados con órganos de un gato seropositivo (G49)