



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**CONCORDANCIA ENTRE LA SEROTIPIFICACIÓN Y LA GENOTIPIFICACIÓN
DE *Toxoplasma gondii* EN MUESTRAS POSITIVAS DE BORREGOS DEL
ESTADO DE COLIMA, MÉXICO**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:
MARÍA FERNANDA MONROY BAROJA**

**TUTOR PRINCIPAL
HERIBERTO CABALLERO ORTEGA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**COMITÉ TUTORAL
MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**IRENE CRUZ MENDOZA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX

FEBRERO 2019



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 (LIE) de la Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.

Trabajo financiado por el proyecto “Polimorfismo genético y filogeografía de *Toxoplasma gondii* en diferentes regiones climáticas de México” registro INP 013/2012.

Alumna becaria de CONACyT, de agosto de 2016 a julio de 2018 con número de registro 610289.

Dedicatoria

A mis papás y hermanas por apoyarme a la distancia y ser siempre un ejemplo de esfuerzo y perseverancia a pesar de las dificultades que se puedan presentar.

A mi esposo por estar conmigo en las buenas y malas, por hacerme sonreír y creer en mí en todo momento.

A todas mis mascotas, por darme tanta felicidad y amor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su excelencia y gran nivel académico.

A mi tutor el M. en C. Heriberto Caballero por su paciencia, enseñanzas y guía a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Dolores Correa por abrirme las puertas del Laboratorio de Inmunología Experimental y enseñarme lo que significa la pasión por la ciencia.

A todos mis compañeros del LIE, porque desde un inicio me hicieron sentir en casa, me enseñaron a trabajar en equipo y con sus conocimientos y comentarios me han ayudado a crecer académicamente.

A la M. en C. Claudia Rico por ser una gran maestra y apoyarme en todo lo relacionado con biología molecular.

Al M. en C. Luis Valenzuela por tenerme paciencia y resolver mis dudas, gracias por compartir tus conocimientos y tiempo conmigo.

A Héctor Luna por ser un excelente maestro de serología, muchas gracias por toda su paciencia y consejos prácticos.

A la M. en C. Lizbeth Xicoténcatl por enseñarme y ayudarme con los ensayos de serotipificación y western blot y también por brindarme tu amistad.

A la Dra. Sara Méndez por su tiempo y ayuda con el proceso de clonación.

A las integrantes de mi jurado: Dra. Irene Cruz Mendoza, Dra. Bertha Josefina Espinoza, Dra. Guadalupe Prado Ochoa, Dra. Dolores Correa Beltrán, por sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

A Mariuxi y David por ser parte de mi familia, gracias por estar siempre pendientes de mí y motivarme a seguir.

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito zoonótico, con una gran diversidad genética a nivel mundial. El genotipo del parásito es uno de los factores más importantes en la determinación de la severidad clínica en humanos y animales. La caracterización de *T. gondii* se puede realizar mediante genotipificación usando marcadores genéticos asociados a la virulencia del parásito; uno de estos es la proteína 6 de los gránulos densos (GRA6). Otra alternativa es la serotipificación, que permite el reconocimiento de péptidos antigénicos y polimórficos por anticuerpos séricos de los hospedadores infectados con *T. gondii*. Los principales péptidos usados son los de GRA6. En este trabajo se determinó la concordancia entre el serotipo y el genotipo de *GRA6* de *T. gondii* en muestras de borregos del estado de Colima. De un banco de muestras de tejido y suero de borregos semi cautivos destinados para consumo humano, se seleccionaron aquellas positivas por PCR tiempo real para el gen *B1*; se analizaron mediante una PCR semi anidada para el gen *GRA6* y sus productos fueron secuenciados. En dos muestras con probable infección mixta se realizó la clonación y secuenciación de este gen. Los sueros de estas muestras se probaron en ensayos de serotipificación usando 3 péptidos de GRA6 diseñados *in silico* (GRA6-I, GRA6-II, GRA6-III). En doce muestras de tejido se detectó el DNA del parásito por PCR tiempo real; de éstas, 10 fueron positivas para el gen *GRA6* y mediante secuenciación se identificó el alelo III. En dos muestras, se encontró infección mixta con alelos II+III. Por serotipificación, seis muestras presentaron un serotipo I/II/III, una muestra tuvo el serotipo I/II, una más presentó el serotipo II y dos no reaccionaron con ningún péptido. Seis de diez sueros (60%) mostraron concordancia parcial entre el serotipo y genotipo de *GRA6*. La reacción de anticuerpos séricos con más de un péptido puede ser por reacción cruzada entre las secuencias de los péptidos o debido a una infección mixta, como se demostró en dos borregos. La falta de reactividad a todos los péptidos puede estar relacionada con la cinética de IgG a lo largo de la infección o por la presencia de cepas atípicas, que generan una respuesta humoral diferente. La serotipificación es una técnica útil para la caracterización genética de *T. gondii*; no obstante, debe ser afinada para mejorar la discriminación del serotipo y tener un panorama más amplio de la diversidad genética del parásito y su asociación con la severidad clínica de la toxoplasmosis en México.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, *GRA6*, concordancia, serotipo, genotipo

Abstract

Toxoplasma gondii is a zoonotic parasite, with great genetic diversity worldwide. The parasite genotype is one of the most important factors determining clinical outcome in humans and animals. This protozoan can be genotyped using genetic markers associated with its virulence, one of them is dense granule protein 6 (GRA6). Another alternative is serotyping, which allows the detection of serum antibodies from the *T. gondii* infected hosts that specifically recognize antigenic and polymorphic peptides from parasite proteins; the main peptides used are those from GRA6. The aim of this study was to determine the concordance between the genotype and the serotype of *T. gondii* GRA6 gene/protein in sheep from Colima State, Mexico. Twenty-six tissues (heart or diaphragm) from semi-captive sheep destined for human consumption were analyzed for the presence of parasite DNA by real-time PCR amplifying the *B1* gene. Then, they were analyzed by a semi-nested PCR for the *GRA6* gene and their products were sequenced. To verify the presence of mixed infection, cloning and sequencing of this gene was performed in two samples. In parallel, sera samples were used in serotyping assays. We used three, *in silico* design, GRA6 peptides (GRA6-I, GRA6-II, GRA6-III). Twelve of twenty-six tissue samples were positive by real-time PCR; from these, 10 were positive for the *GRA6* gene and by sequencing we identified the type III allele. In two samples, mixed infection with *GRA6* alleles type II and III was found. By serotyping, six samples showed a serotype I/II/III, one sample had serotype I/II, one more presented serotype II and two did not react with any peptide. Six out of ten sera (60%) showed partial concordance between *GRA6* serotype and genotype. The reaction with more than one peptide may be explained by cross-reactivity between the peptide sequences or due to mixed infection as demonstrated in two sheep. The lack of reactivity to all peptides could be related to the kinetics of IgG throughout the infection or the presence of atypical strains, which induce a different humoral response. Serotyping is a useful technique for *T. gondii* characterization; however, must be refined to improve serotype discrimination and have a broader picture of the genetic diversity of the parasite and its association with the clinical severity of toxoplasmosis in Mexico.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *GRA6*, concordance, serotype, genotype

Contenido

1. Introducción	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Biología de <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.3. Epidemiología	6
1.4. Susceptibilidad del hospedador a la toxoplasmosis	11
1.5. Respuesta inmune a la infección por <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.6. Presentaciones clínico-patológicas de la infección por <i>T. gondii</i>	14
1.7. Diagnóstico de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.8. Genoma y diversidad genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	24
1.9. Asociación entre el genotipo de <i>T. gondii</i> y la severidad clínica	29
1.10. Caracterización genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
1.11. Concordancia entre la serotipificación y genotipificación de <i>T. gondii</i>	35
2.Planteamiento del problema	38
3.Hipótesis de investigación	39
4.Objetivo	39
5.Material y Métodos	40
5.1. Tipo de estudio	40
5.2. Lugar de estudio	40
5.3. Muestras biológicas	40
5.4. Técnicas de laboratorio	40
5.5. Análisis estadístico	49
6.Resultados	50
6.1. PCR en tiempo real	50
6.2. PCR semianidada del gen <i>GRA6</i>	52
6.3. PCR-RFLP del gen <i>GRA6</i>	53
6.4. Análisis de las secuencias del gen <i>GRA6</i>	55
6.5. Verificación de la infección doble por clonación y secuenciación	57
6.6. Western blot	62
6.7. Serotipificación usando péptidos de <i>GRA6</i>	63
6.8. Concordancia entre la genotipificación y serotipificación de <i>GRA6</i>	63
7.Discusión	65
8.Conclusiones	71
Referencias	72
Anexos	89

Lista de cuadros

Cuadro 1. Frecuencia de la infección por <i>Toxoplasma gondii</i> en animales domésticos en México	8
Cuadro 2. Frecuencia de la infección por <i>Toxoplasma gondii</i> en borregos (<i>Ovis aries</i>) de México	11
Cuadro 3. Serotipificación de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras previamente genotipificadas	36
Cuadro 4. Oligonucleótidos y sonda para el gen <i>B1</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	42
Cuadro 5. Oligonucleótidos para la PCR semianidada del gen <i>GRA6</i>	43
Cuadro 6. Secuencias de péptidos de <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	48
Cuadro 7. Banco de muestras biológicas de borregos empleadas en el estudio	51
Cuadro 8. DNA de borregos probados mediante qPCR y PCR punto final para la detección de <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	54
Cuadro 9. Serotipo y genotipo de <i>GRA6</i> encontrado en diez borregos del Estado de Colima	64

Lista de figuras

Figura 1. Estadios biológicos de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 3. Mapas de México que indican el rango de prevalencia por estado de anticuerpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> de los años 2000 y 2006	8
Figura 4. Estructura genética de 138 genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
Figura 5. Estructura genética de la población de <i>Toxoplasma gondii</i>	27
Figura 6. Estrategia general del estudio	41
Figura 7. Modelos tridimensionales de péptidos de GRA6 I, II y III	49
Figura 8. PCR en tiempo real para la detección del gen <i>B1</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> en tejidos de borregos	50
Figura 9. PCR externa (854 pb) del gen <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	52
Figura 10. PCR semianidada interna para el gen <i>GRA6</i> (344 pb) de <i>Toxoplasma gondii</i> en músculo cardiaco y estriado de borregos	53
Figura 11. PCR-RFLP del gen <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> en músculo cardiaco y estriado de borregos	54
Figura 12. Alineamiento de las secuencias de <i>GRA6</i> con cepas de referencia	55
Figura 13. Alineamiento de las secuencias de <i>GRA6</i> con la cepa TgCatPr09	56
Figura 14. Sitios polimórficos del gen <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	56
Figura 15. Secuencias del gen <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> sugerentes de infección mixta	57
Figura 16. PCR (A) y RFLP (B) del gen <i>GRA6</i> (344pb) de <i>Toxoplasma gondii</i> del borrego 2	58
Figura 17. PCR (A) y RFLP (B) del gen <i>GRA6</i> (344pb) de <i>Toxoplasma gondii</i> del borrego 11	59
Figura 18. Alineamiento de las secuencias del gen <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> de los borregos 2 y 11 con las cepas de referencia	60

Figura 19. Alineamiento de las secuencias de <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> de los borregos 2 y 11 con las cepas VEG y TgCatPr09	61
Figura 20. Alineamiento de las secuencias de <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> de los borregos 2 y 11 con la cepa ME49	61
Figura 21. Polimorfismos en los sitios de restricción de la enzima MseI en la secuencia del gen <i>GRA6</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	62
Figura 22. Detección de sueros de borregos negativos a <i>Toxoplasma gondii</i> por western blot	63
Figura 23. Correlación de los índices de reactividad (IR) entre los péptidos de <i>GRA6</i>	64

1. Introducción

1.1. Generalidades

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado, que infecta a animales de sangre caliente, incluidos los humanos (Morisset *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009; Maksimov *et al.*, 2013). Es la única especie dentro del género *Toxoplasma* y es considerado uno de los patógenos eucariotas más exitosos, debido al gran número de especies hospedadoras que infecta en todo el planeta, provocando una de las zoonosis más ampliamente distribuidas en el mundo (Kaplan *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010).

1.2. Biología de *Toxoplasma gondii*

Este parásito se puede transmitir mediante la ingestión de carne cruda o mal cocida que contenga quistes tisulares; de igual forma, un individuo puede infectarse con este protozooario mediante la ingestión de alimentos, agua o tierra contaminados con ooquistes, por ejemplo, a través de la jardinería o al cambiar la arena de la caja de los gatos. Otras maneras de contraer la infección son la transmisión vertical a través de la placenta y el trasplante de órganos (Tenter *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001; Khurana y Batra, 2016).

1.2.1. Taxonomía

De acuerdo con Dubey (2010), la clasificación taxonómica de *Toxoplasma gondii* es la siguiente:

Phylum: Apicomplexa; Levine, 1970

Clase: Sporozoasida; Leukart, 1879

Subclase: Coccidiasina; Leukart, 1879

Orden: Eimeriorina; Leger, 1911

Familia: Toxoplasmatidae; Biocca, 1956

Género: *Toxoplasma*; Nicolle y Manceaux, 1909

Especie: *Toxoplasma gondii*

1.2.2. Estadios de *Toxoplasma gondii*

1.2.2.1. Taquizoítos

Los taquizoítos son el estadio de multiplicación rápida y tienen la capacidad de infectar cualquier célula nucleada. Poseen una forma de media luna, aproximadamente de 2 por 6 micrómetros (μm), con un extremo anterior puntiagudo (conoidal) y un extremo posterior redondeado (Figura 1A). Por lo general, presentan un núcleo con ubicación central. Un taquizoíto está conformado por la película (compuesta por tres membranas, el plasmalema y dos membranas aplicadas cercanamente que forman el complejo de membranas interno), el citoesqueleto (microtúbulos, anillos apicales, anillos polares, conoide), organelos secretorios (roptrias, micronemas, gránulos densos), microporo, mitocondria, retículo endoplásmico rugoso y liso, aparato de Golgi, ribosomas, núcleo, gránulos de amilopectina y apicoplasto (Dubey *et al.*, 1998).

1.2.2.2. Bradizoítos y quistes tisulares

Los bradizoítos son el estadio de multiplicación lenta, miden entre 5-8.5 x 1-3 μm y se ubican dentro de un quiste tisular (Figura 1B). Los quistes tisulares crecen y se mantienen de forma intracelular mientras que los bradizoítos continúan su división mediante endodiogenia. Los bradizoítos tienen algunas diferencias estructurales con respecto a los taquizoítos; presentan el núcleo más cerca del extremo posterior, son más delgados y contienen varios gránulos de amilopectina que se tiñen de rojo con la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), mientras que en los taquizoítos este material está en partículas discretas o ausente (Dubey *et al.*, 1998).

El tamaño de los quistes varía, los quistes tisulares jóvenes pueden ser tan pequeños como de 5 μm de diámetro y contener solamente dos bradizoítos mientras que los quistes maduros pueden tener cientos de organismos. Los quistes tisulares en el cerebro son por lo general esféricos y alcanzan un diámetro de 70 μm , mientras que los quistes intramusculares son elongados y pueden medir 100 μm de

longitud (Dubey, 2010). La pared del quiste tisular está compuesta por una membrana externa cubierta por una matriz densa que contiene vesículas membranosas, mide entre 200 a 850 nm de grosor y es ligeramente positiva a la tinción de PAS (Zhang *et al.*, 2001). Los quistes tisulares son más prevalentes en los tejidos nerviosos y musculares, incluyendo el cerebro, ojos, músculo esquelético y cardíaco; pueden permanecer intactos sin causar daño y persistir por mucho tiempo en el organismo del hospedador sin promover una respuesta inflamatoria (Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 2010).

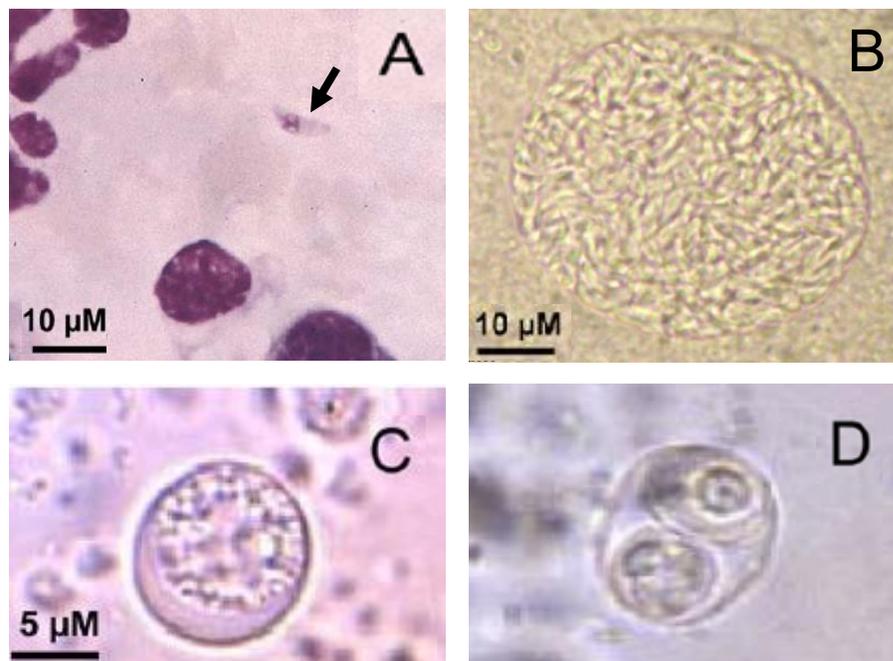


Figura 1. Estadios biológicos de *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoíto en muestra de fluido de lavado broncoalveolar teñido con Giemsa (flecha negra; magnificación, 500x), (B) Quiste tisular en el cerebro de un ratón infectado (magnificación, 500x), (C) Ooquiste no esporulado (magnificación, 500x), (D) Ooquiste esporulado (magnificación, 1000x). Tomado de Robert-Gangneux y Dardé, 2012.

1.2.2.3. Estadios enteroepiteliales asexual y sexual

Los bradizoítos liberados de un quiste tisular penetran en las células epiteliales del intestino delgado de los felinos, donde se desarrollan cinco tipos

morfológicamente distintos de esquizontes de *T. gondii* antes de que comience la gametogonia. Los esquizontes dan origen a los merozoítos, los cuales miden 4.5-6.1 x 1.1-2.9 μm . Los esquizontes y gamontes se desarrollan exclusivamente en los enterocitos mientras que los taquizoítos se encuentran solamente en la lámina propia (Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 2010).

Después de la división asexual, inicia el ciclo sexual con formación de los gametos femenino (macrogameto) y masculino (microgameto). Los macrogametos son esféricos, contienen un núcleo central y varios gránulos positivos mediante PAS. Los microgametos tienen forma ovoide a elipsoidal y son biflagelados (Dubey *et al.*, 1998).

1.2.2.4. Ooquistes

Los ooquistes sin esporular tienen forma esférica y miden 10 a 12 μm de diámetro (Figura 1C). Mediante microscopía óptica, la pared del ooquiste consta de dos capas incoloras. Por su parte, los ooquistes esporulados son esféricos o elipsoidales y miden 11 a 13 μm de diámetro. Cada ooquiste contiene dos esporocistos o esporoblastos y cada uno contiene 4 esporozoítos (Figura 1D). Comparando la ultraestructura, los esporozoítos son similares a los taquizoítos, aunque poseen micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina en abundancia. Los esporozoítos miden 2 x 6-8 μm con un núcleo subterminal (Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 2010).

1.2.3. Ciclo de vida

Los felinos domésticos y silvestres desempeñan un papel importante en la epidemiología porque son los hospedadores definitivos del parásito y eliminan los ooquistes de *T. gondii* al ambiente (Dubey, 2010; Maksimov *et al.*, 2013). Después de que un felino ha ingerido quistes tisulares, su pared es destruida por las enzimas proteolíticas en el estómago e intestino delgado. Los bradizoítos que se liberan, penetran en las células epiteliales del intestino delgado e inician el desarrollo de 5 tipos morfológicos, conocidos como estadios enteroepiteliales (tipos A a E), y entre

cada estadio se producen varias generaciones. Los tipos C, D y E se multiplican mediante esquizogonia, un mecanismo de reproducción asexual, en el cual el núcleo se divide dos o más veces sin que exista la división del citoplasma. Antes o de manera simultánea con la última división nuclear, la formación del merozoíto inicia cerca del centro del esquizonte. Los merozoítos se mueven a la periferia del esquizonte y la membrana plasmática de éste se invagina alrededor de cada merozoíto formando su respectiva membrana plasmática. Finalmente, los merozoítos se separan del esquizonte en el extremo posterior (Dubey, 2010).

El ciclo sexual comienza dos días después de la ingestión de quistes tisulares por un felino. Se sugiere que los esquizontes tipos D y E inician la formación de los macrogametos y microgametos. Estos últimos emplean sus flagelos para nadar, penetrar y fertilizar a los macrogametos maduros para formar cigotos. Después de la fertilización, se forma la pared del ooquiste alrededor del cigoto, las células epiteliales infectadas se lisan y descargan los ooquistes al lumen intestinal, los cuales son excretados al ambiente junto con las heces. La esporulación de los ooquistes ocurre entre 1 a 5 días dependiendo de la temperatura y oxigenación del ambiente (Dubey, 2010). Los ooquistes también son infectivos para los felinos, aunque son menos eficientes que los quistes tisulares (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

Los hospedadores intermediarios como mamíferos y aves se infectan por la ingestión ya sea de ooquistes o quistes tisulares. Después de la ingestión, los esporozoítos (ooquistes) o bradizoítos (quistes tisulares) emergen e invaden la mucosa intestinal, donde se transforman en taquizoítos; éstos pueden invadir casi cualquier célula nucleada (Rougier *et al.*, 2017).

En las células infectadas, los parásitos se encuentran dentro de vacuolas parasitóforas donde se dividen asexualmente mediante endodiogenia, una forma de reproducción especializada en la cual dos células hijas se forman a partir de una célula madre (Dubey, 2010) (Figura 2), para después egresar activamente de la célula infectada; proceso que depende de la liberación de proteínas de adhesión y factores de lisis secretados por las micronemas (Roiko *et al.*, 2014). La

transformación a bradizoítos sucede por la presión del sistema inmune y otros factores estresantes que se desconocen; los bradizoítos se replican lentamente dentro quistes tisulares. Probablemente, los quistes tisulares permanecen a lo largo de la vida del hospedador (Rougier *et al.*, 2017).

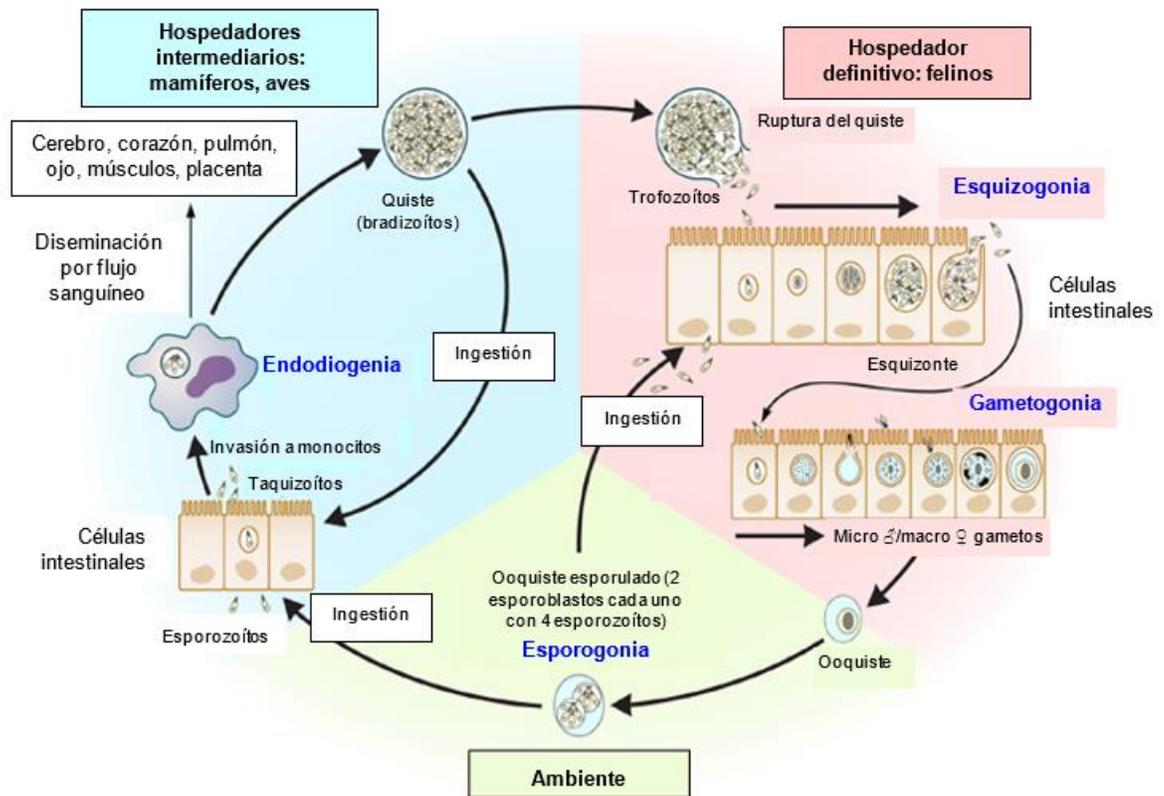


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Si un hospedador intermediario o definitivo ingiere oocistos o quistes tisulares, en su organismo sucede la reproducción asexual de *T. gondii* y solamente en el hospedador definitivo (felinos) ocurre la reproducción sexual, lo que genera la excreción de oocistos al ambiente, en el cual esporulan y se vuelven infectivos. Tomado y modificado de Robert-Gagneux y Dardé, 2012.

1.3. Epidemiología

La infección por *T. gondii* es más prevalente en climas cálidos y áreas de altitud baja y húmedas que en clima frío, regiones montañosas y áreas secas. Esto se relaciona con las condiciones favorables para la esporulación y sobrevivencia de los oocistos en el ambiente (Dubey, 2010). Los felinos son los hospedadores

definitivos y juegan un papel fundamental en la epidemiología y mantenimiento de la enfermedad, ya que en su sistema digestivo se lleva a cabo el ciclo sexual del parásito; el resto de los mamíferos y las aves actúan como hospedadores intermediarios (Dubey y Jones, 2008).

La prevalencia de la infección por *T. gondii* en humanos a nivel mundial varía desde 10% hasta 80% dependiendo del clima y el desarrollo de la población (Kaplan *et al.*, 2009). Esta parasitosis tiene importancia en salud pública e impacto económico en medicina veterinaria, debido a que puede ocasionar abortos, malformaciones, lesiones oculares o incluso la muerte (Dubey, 2010). Particularmente, la toxoplasmosis puede causar lesiones severas en niños con infección congénita y pacientes inmunocomprometidos (Sousa *et al.*, 2008), aunque se han reportado casos graves de la enfermedad en individuos inmunocompetentes (Carme *et al.*, 2002; Demar *et al.*, 2007).

1.3.1. Toxoplasmosis en México

En México, la prevalencia de la infección por *T. gondii* en humanos fue de 40.0% y 43.9%, en 2000 y 2006, respectivamente (Figura 3; Caballero-Ortega *et al.*, 2012). En el año 2005, se realizó un estudio para determinar la frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en infantes de la Ciudad de México y se determinó una frecuencia de dos casos de toxoplasmosis congénita por cada 1000 nacimientos (Vela-Amieva *et al.*, 2005). En distintos estados de México se ha reportado la frecuencia de la infección por *T. gondii* en animales domésticos, principalmente mediante el empleo de técnicas serológicas, lo que implica que el parásito está ampliamente distribuido en el país (Cuadro 1).

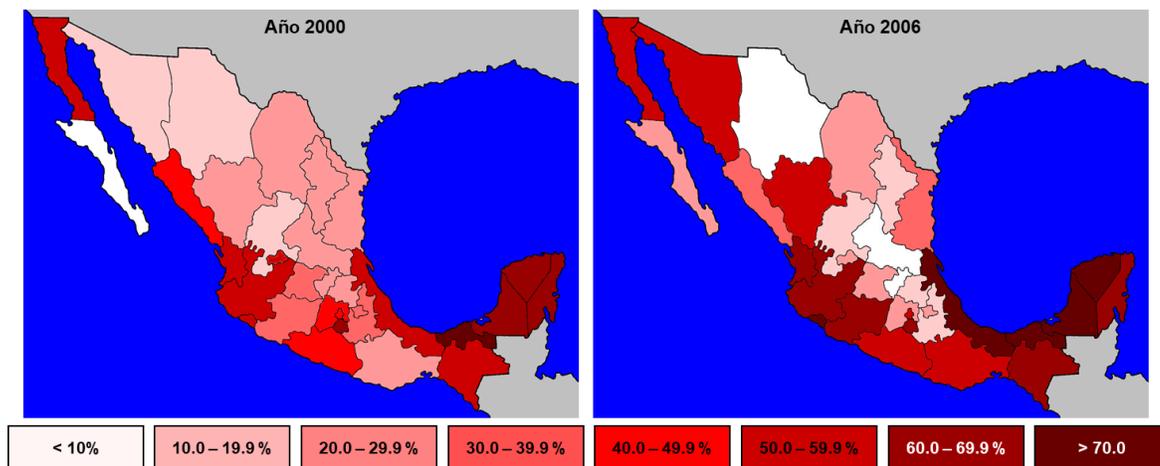


Figura 3. Mapas de México que indican el rango de prevalencia por estado de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* de los años 2000 y 2006. Los rangos de prevalencia se muestran en diferentes tonos de rojo. Tomado de Caballero-Ortega *et al.*, 2012.

Cuadro 1. Frecuencia de la infección por *Toxoplasma gondii* en animales domésticos en México

Especie	Estado	Frecuencia	Técnica	Referencia
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Edo. Méx.	6.2%	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2004
	Ciudad de México	(13/208)		
	Durango	6.9% (36/519)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2012d
Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Edo. México	26.9% (77/286)	ELISA	Figueroa-Castillo <i>et al.</i> , 2006
	Ciudad de México			
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	Jalisco	IgM 8.3% (2/24) IgG 70.8% (17/24)	ELISA	Galván-Ramírez <i>et al.</i> , 1999
	Colima	28.8% (23/80)	ELISA	García-Márquez <i>et al.</i> , 2007
	Durango	21.0% (22/105)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2007

		9.3 % (14/150)	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2009
	Ciudad de México	21.8% (37/169)	ELISA	Besn�-Mérida <i>et al.</i> , 2008
	Yucat�n	IgM 75.5% (166/220) IgG 91.8% (202/220)	ELISA	Castillo-Morales <i>et al.</i> , 2012
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	Durango	51.5% (52/101)	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2007c
		45.3% (68/150)	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2009
	Oaxaca	61.7% (95/154)	ELISA	Cedillo-Pel�ez <i>et al.</i> , 2012
	Guanajuato	42.5% (31/73)	ELISA	Cedillo-Pel�ez <i>et al.</i> , 2011a
		29.4% (74/252)	ELISA	Cedillo-Pel�ez <i>et al.</i> , 2015
Cerdo (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Morelos	8.9% (107/1203)	ELISA	Garc�a-V�zquez <i>et al.</i> , 1993
	Jalisco	2.1% (1/48)	ELISA	Galv�n-Ram�rez <i>et al.</i> , 2010
	Durango	12.7% (136/1074)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2011a
	Oaxaca	Traspatio 17.2% (58/337) Granja 0.5% (1/188)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2012e
Caballo (<i>Equus caballus</i>)	Durango	6.1% (30/495)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2012b

Burro (<i>Equus asinus</i>)	Durango	10.9% (26/239)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2015
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Morelos	11.9% (47/397)	ELISA	García-Vázquez <i>et al.</i> , 1993
		55%		
	Morelos	(65/118)	IFAT	García-Vázquez <i>et al.</i> , 1990
	San Luis Potosí	29% (27/93)		
Cabra (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Morelos	3.2% (23/707)	ELISA	García-Vázquez <i>et al.</i> , 1993
	Durango	31.0% (174/562)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2011b
	Michoacán	15.2% (52/341)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2013c

MAT: prueba de aglutinación modificada. ELISA: ensayo inmunoenzimático. IFAT: prueba de inmunofluorescencia indirecta.

Específicamente en borregos (*Ovis aries*) se ha reportado un rango de frecuencia entre 15 a 84% en diferentes estados de México (Cuadro 2). Esta especie tiene un potencial zoonótico importante ya que puede infectarse con *T. gondii* y alojar quistes tisulares, con el riesgo de transmitir la parasitosis a los humanos si ingieren su carne cruda o mal cocida (Dubey, 2009). Además, es un buen centinela del riesgo de infección y de los genotipos del parásito que están presentes en una región determinada (Caballero-Ortega *et al.*, 2008b).

Cuadro 2. Frecuencia de la infección por *Toxoplasma gondii* en borregos (*Ovis aries*) de México

Especie	Estado	Frecuencia	Técnica	Referencia
Borrego (<i>Ovis aries</i>)	Morelos	55% (53/97)	IFAT	García-Vázquez <i>et al.</i> , 1990
	San Luis Potosí	39% (37/95)		
	Guanajuato	20% (60/303)		
	Morelos	37.9% (266/702)	IFAT	Cruz-Vázquez <i>et al.</i> , 1992
	Colima	29.2% (102/351)	ELISA	Caballero-Ortega <i>et al.</i> , 2008a
	Puebla	77.0-84.0%	ELISA WB	Caballero-Ortega <i>et al.</i> , 2008b
	Durango	15.1% (77/511)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2012c
	Oaxaca	23.1% (99/429)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2013a
Michoacán	29.9% (121/405)	MAT	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2013b	

IFAT: prueba de inmunofluorescencia indirecta. ELISA: ensayo inmunoenzimático. WB: Western blot. MAT: prueba de aglutinación modificada.

1.4. Susceptibilidad del hospedador a la toxoplasmosis

Existen diversos factores que participan en la susceptibilidad a la toxoplasmosis; de parte del hospedador se deben considerar, ante todo, la eficacia y el perfil de la respuesta inmune, la cual depende de la evolución de la especie, la edad, el fondo genético y la presencia de coinfecciones, mientras que por parte del parásito se deben tomar en cuenta la carga parasitaria, el estadio, la ruta de transmisión y la virulencia de la cepa, siendo éste último otro factor importante (Xiao *et al.*, 2009; Dubey, 2010).

Generalmente se considera que los primates del Nuevo Mundo y los marsupiales australianos son muy susceptibles a la toxoplasmosis debido a que

probablemente evolucionaron sin entrar en contacto con el parásito, lo que evitó que estas especies desarrollaran una respuesta inmune adaptativa contra *T. gondii* (Dardé *et al.*, 1998). Otras especies como los humanos y ovinos tienen una susceptibilidad intermedia a la toxoplasmosis, mientras que los primates del Viejo Mundo, ratas, bovinos, caballos, cerdos y cabras son altamente resistentes (Innes, 1997; Dubey, 2010). La mayoría de las especies de felinos infectados rara vez presentan signos clínicos, sin embargo, algunas coinfecciones (virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la panleucopenia felina) pueden agravar la infección por *T. gondii* (Dubey, 2010).

1.5. Respuesta inmune a la infección por *Toxoplasma gondii*

En las etapas tempranas de la infección por *T. gondii*, las células de la respuesta inmune innata como macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales (NKs) se encargan de la fagocitosis, citotoxicidad celular y junto con las células dendríticas producen interleucina 12 (IL-12). Esto sucede debido a que los receptores tipo Toll (TLRs) reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), específicamente en la infección por *T. gondii* en ratones, los TLR11 y TLR12 detectan la profilina del parásito; mientras que en humanos son TLR5 que reconocen a la profilina, los TLR2 y TLR4 detectan anclas de glicosilfosfatidilinositol y TLR4 a la proteína de choque térmico 70 (Aliberti, 2005; Mun *et al.*, 2005; Yarovinsky *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2007; Debierre-Grockiego *et al.*, 2007; Koblansky *et al.*, 2013; González *et al.*, 2014). La IL-12 es importante en la activación de las células NK para que produzcan interferón gamma (IFN- γ), que desencadena el desarrollo de la respuesta Th1 (Correa *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2009).

Los macrófagos y células dendríticas presentan los antígenos a las células por medio del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), a través del MHC clase I los antígenos son reconocidos por linfocitos T CD8+ (citotóxicos), encargados de eliminar las células infectadas por medio de apoptosis o lisis. Mientras que los linfocitos CD4+ interactúan con el MHC clase II, lo que estimula la

producción de IL-2 (Denkers y Gazzinelli, 1998; Galván-Ramírez y Mondragón-Flores, 2017). La producción de IFN- γ activa a los macrófagos para producir factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que tiene sinergia con el IFN- γ para comenzar la producción de óxido nítrico. El TNF- α y óxido nítrico contribuyen a la destrucción del parásito. El IFN- γ participa en otros mecanismos de control que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno, deprivación de hierro, inanición de triptófano por la expresión de la indolamina 2,3-dioxigenasa y activación de guanosina trifosfatasa (GTPasa) como GTPasas relacionadas con la inmunidad p47 (IRG) y proteínas de unión al guanilato p65 (GBP) (Miller *et al.*, 2009; Sasai *et al.*, 2018).

La respuesta inmune mediada por las células T y la resistencia al estadio de taquizoíto son un paso clave en el ciclo de vida de *T. gondii*, ya que determinan la sobrevivencia del hospedador intermediario y del parásito (Denkers y Gazzinelli, 1998). Si en una infección primaria ocurre una respuesta Th2, no se bloquea la replicación de *T. gondii* y se presentan problemas clínicos asociados a la destrucción tisular por el parásito. Una vez finalizado el control sobre el parásito, la respuesta celular Th3, células T reguladoras o células dendríticas producen la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) que modulan la respuesta Th1 proinflamatoria, ya que si no es regulada puede provocar daño tisular e incluso matar al hospedador (Gazzinelli *et al.*, 1996; Correa *et al.*, 2007).

Los anticuerpos IgM aparecen por lo general entre 3 a 10 días después de la infección. Los niveles de IgM aumentan hasta llegar a un pico después de 1-3 meses. A lo largo de los próximos 9 meses, existe una disminución progresiva de los niveles de IgM hasta la negativización (Villard *et al.*, 2016). Sin embargo, una parte de los pacientes (9-27%) ha demostrado una respuesta persistente del anticuerpo IgM que permanece por 2 años o más (Gras *et al.*, 2004). La producción de IgM es seguida por anticuerpos IgA, que pueden persistir por lo general durante 6 a 7 meses después de la infección; mientras que los anticuerpos IgE se detectan en la fase aguda de la infección y su persistencia en el organismo es más breve en

comparación con las clases IgM e IgA (Montoya, 2002; Wong *et al.*, 1993). Los anticuerpos IgG aparecen después de 1-3 semanas de la infección y alcanzan su pico a los 2 o 3 meses, permanecen en un nivel de meseta durante 6 meses y después de 1 año comienzan a disminuir lentamente a niveles residuales hasta el final de la vida del individuo infectado (Robert-Gangneux y Dardé, 2012; Villard *et al.*, 2016). En un hospedador inmunocompetente, se considera que la ruptura ocasional de quistes individuales es responsable de la estimulación continua de la respuesta inmune (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

1.6. Presentaciones clínico-patológicas de la infección por *Toxoplasma gondii*

1.6.1. En humanos

La infección puede inducir un amplio rango de manifestaciones clínicas de acuerdo con el estado inmunológico del paciente (Morisset *et al.*, 2008). La mayoría de las infecciones con *T. gondii* en humanos inmunocompetentes son asintomáticas o pueden presentar síntomas inespecíficos como fiebre, linfadenopatías o un síndrome similar a la mononucleosis, que se resuelven de manera espontánea (Jones *et al.*, 2001; Morisset *et al.*, 2008). El diagnóstico en pacientes inmunocompetentes se realiza principalmente mediante pruebas serológicas (Murat *et al.*, 2013).

1.6.1.1. *Toxoplasmosis congénita*

La transmisión transplacentaria de *T. gondii* puede generar anomalías neurológicas severas o lesiones oculares (Xiao *et al.*, 2009). La tasa de transmisión de la infección aumenta conforme avanza la gestación mientras que la severidad de la enfermedad disminuye a lo largo del embarazo (Dunn *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2002). Por lo tanto, la mayoría de los neonatos infectados congénitamente con cepas poco virulentas nacen sin problemas clínicos aparentes. En la toxoplasmosis congénita transmitida en los dos primeros trimestres se puede presentar muerte

fetal, prematuridad o enfermedad severa al nacimiento con daño ocular o cerebral que provocan secuelas de por vida, especialmente si los niños no reciben tratamiento (McLeod *et al.*, 2012). Existen casos con retinocoroiditis activa recurrente, pérdida de cognición y función motora y convulsiones en años posteriores en personas que son asintomáticas al nacimiento (McLeod *et al.*, 2012). Dependiendo de su localización en el cerebro, las calcificaciones pueden ser subclínicas o inducir hidrocefalia (Morisset *et al.*, 2008). Debido a que la infección es asintomática en mujeres embarazadas, se recomienda realizar un diagnóstico serológico preferentemente antes de la gestación o en las etapas tempranas de la misma. Esto se debe a que la mayoría de las madres seropositivas antes de la gestación no transmiten la infección al feto, aunque existen excepciones en casos de reinfección con una cepa más virulenta (Desmonts *et al.*, 1990). Cuando hay evidencia de seroconversión en una mujer embarazada seronegativa, se debe realizar un seguimiento prenatal para determinar si existen anomalías fetales mediante ultrasonido, esto le permite al clínico decidir la administración del tratamiento más adecuado (espiramicina o pirimetamina-sulfadiazina y ácido fólico) para prevenir la transmisión vertical del parásito o disminuir la severidad de la presentación clínica (Tenter *et al.*, 2000; Montoya y Remington, 2008).

1.6.1.2. *Toxoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos*

En pacientes inmunocomprometidos con enfermedades hematológicas, enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, pacientes con SIDA e individuos que reciben terapia inmunosupresora con drogas citotóxicas, corticoesteroides o pacientes con trasplante de órganos se puede presentar toxoplasmosis diseminada con falla multiorgánica (Tenter *et al.*, 2000; Khurana y Batra, 2016).

La toxoplasmosis en pacientes con SIDA se considera como una de las infecciones oportunistas más comunes y generalmente sucede por la reactivación de una infección latente (Dubey *et al.*, 1998). Los pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas están en riesgo de reactivación del parásito durante el tiempo de su condicionamiento para el trasplante, aún aquellos que han recibido

un trasplante de un donante seronegativo. De igual manera, los beneficiarios de un trasplante de órgano sólido están expuestos a la reactivación de los quistes en su organismo, así como a la reactivación de los quistes que se encuentran en el órgano trasplantado (Murat *et al.*, 2013).

El diagnóstico en este tipo de pacientes se puede realizar mediante ensayos serológicos, ya que en una infección adquirida existe la seroconversión con presencia de anticuerpos IgM e IgG, mientras que la presencia de anticuerpos IgG con un índice de avidéz alto en ausencia de IgM sugiere la reactivación de *T. gondii* (Khurana y Batra, 2016). Debido a que la producción de anticuerpos en pacientes inmunosuprimidos está afectada, se recomienda utilizar métodos moleculares para evidenciar el DNA del parásito en sangre o líquidos corporales, también se puede realizar el aislamiento del parásito o una evaluación histológica por inmunohistoquímica (Montoya, 2002; Murat *et al.*, 2013).

1.6.1.3. Toxoplasmosis ocular

Esta enfermedad es una secuela común de la infección congénita, aunque también puede ser una consecuencia de la infección adquirida en adultos. La infección ocular puede permanecer latente por años y emerger en la segunda o tercera década de vida del paciente provocando una retinocoroiditis severa (Boothroyd y Grigg, 2002). La toxoplasmosis ocular asociada con la infección congénita puede ser aparente al nacimiento, ya sea como una lesión activa en la retina o como cicatrices retinocoroidales. La recurrencia de las lesiones en la retina puede ocurrir tanto en la infección congénita como en la adquirida y se manifiesta como lesiones satélites en el borde de cicatrices retinocoroidales preexistentes, aunque en algunos pacientes se desarrollan nuevas lesiones retinales primarias que se ubican lejos de las cicatrices previas. La recurrencia generalmente se asume que se debe a la liberación de parásitos de los quistes tisulares en la retina. También se considera que puede ocurrir por la diseminación de parásitos desde lugares distintos al ojo o por la reinfección del paciente (Holland, 2003).

En la mayoría de los casos, la toxoplasmosis ocular es diagnosticada mediante una examinación oftalmológica; en los casos en que las lesiones no son diagnósticas o la respuesta al tratamiento no es óptima se puede detectar el DNA del parásito por PCR o por la producción local de anticuerpos IgG, IgA o ambos, usando muestras de humor acuoso; el suero se debe analizar simultáneamente (Montoya, 2002; Villard *et al.*, 2016). Si se confirma la presencia del DNA de *T. gondii* es posible determinar el genotipo mediante RFLP o secuenciación. También se puede evidenciar la presencia del parásito mediante aislamiento o histopatología (Montoya, 2002). La enfermedad ocular en pacientes inmunocompetentes se puede tratar efectivamente con drogas apropiadas y terapia de esteroides para controlar la inflamación. En los casos en que la enfermedad es más dramática y no responde al tratamiento, se opta por tomar una biopsia para ser analizada mediante PCR (Boothroyd y Grigg, 2002).

1.6.1.4. Otras presentaciones clínicas

Se han reportado casos de toxoplasmosis severa diseminada que afecta más de dos órganos no continuos en individuos inmunocompetentes relacionadas con cepas atípicas altamente virulentas en regiones de Sudamérica como Surinam y Guyana Francesa. Estos pacientes han experimentado fiebre elevada y prolongada, pérdida de peso, citólisis hepática, linfadenopatía, cefalea y neumonía. Otros signos menos frecuentes fueron prurito, retinocoroiditis, miocarditis, miositis y desórdenes neurológicos (Dardé *et al.*, 1998; Carne *et al.*, 2002; Carne *et al.*, 2009; Bastos da Silva *et al.*, 2016).

1.6.2. En animales

La infección de *T. gondii* se ha descrito en más de 350 especies de mamíferos y aves (Tenter *et al.*, 2000). La mayoría de los animales no desarrollan signos clínicos y eventualmente son ingeridos por humanos, constituyendo una fuente importante de infección (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

Los animales que se encuentran en pastoreo poseen una presión infectiva mayor que los animales en condiciones de producción intensiva debido a la contaminación ambiental con ooquistes, como las ovejas y las cabras (Tenter *et al.*, 2000). Los borregos son particularmente susceptibles a la toxoplasmosis, la ingesta de ooquistes al inicio de la gestación puede generar aborto mientras que la infección en la gestación avanzada favorece la transmisión vertical y el nacimiento de corderos débiles o incluso clínicamente normales, ocasionando importantes pérdidas económicas en la producción a nivel mundial (Buxton, 1990; Benavides *et al.*, 2017).

Los cerdos pueden adquirir la infección al ingerir ooquistes del ambiente o al consumir quistes tisulares de animales infectados como roedores (Burrells, 2014). Por lo general no presentan signos clínicos, aunque se han reportado brotes de la enfermedad, donde los animales desarrollaron anorexia y temperatura rectal mayor a 40 °C, con morbilidad del 57% y mortalidad aproximada de 2% (Li *et al.*, 2010).

Las gallinas son naturalmente resistentes a la toxoplasmosis, pero son consideradas hospedadores importantes en la epidemiología de la enfermedad, porque son uno de los mejores indicadores de la contaminación del suelo con ooquistes de *T. gondii* (Hill y Dubey, 2013).

Los bovinos son resistentes a la toxoplasmosis y no son considerados hospedadores importantes del parásito, por lo que la ingestión de carne de res no es considerada como un riesgo de infección importante dentro de la epidemiología del patógeno, debido a la resistencia innata de los bovinos al parásito. No se han confirmado casos de toxoplasmosis clínica en bovinos ni en caballos (Dubey y Jones, 2008; Dubey, 2010).

En mamíferos marinos, se ha reportado la infección por *T. gondii* en delfines, marsopa común, ballenas, focas, nutrias y leones marinos (Forman *et al.*, 2009; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012a; van de Velde *et al.*, 2016). Específicamente en nutrias marinas (*Enhydra lutris nereis*) la infección se ha relacionado con meningoencefalitis (Miller *et al.*, 2004), mientras que en una marsopa común (*Phocoena phocoena*) y delfines de cabeza blanca (*Cephalorhynchus hectori*) se

manifestó como una infección fatal diseminada (Roe *et al.*, 2013; Herder *et al.*, 2015).

1.7. Diagnóstico de *Toxoplasma gondii*

Debido a que los signos clínicos de la infección con *T. gondii* son inespecíficos, para el diagnóstico se opta por realizar diferentes técnicas de laboratorio como pruebas serológicas, microscopía, bioensayos en ratones y métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Su *et al.*, 2010; Ferra, Holec-Gaşior y Kur, 2015). Con los métodos indirectos se identifican anticuerpos contra el parásito, mientras que los métodos directos evidencian a *T. gondii* (Murat *et al.*, 2013).

1.7.1. Métodos serológicos

Estos permiten la identificación de la infección por *T. gondii* mediante la detección serológica de anticuerpos IgM, IgG, IgA e IgE. Se pueden separar en 2 grupos con el objetivo de optimizar su interpretación. En el primer grupo están los métodos de tamizaje y en el segundo las pruebas confirmatorias. Los métodos de tamizaje son de bajo costo y se requiere de una pequeña cantidad de suero, como la hemoaglutinación, aglutinación o ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Villard *et al.*, 2016). Entre los métodos confirmatorios se encuentran la prueba de Sabin-Feldman, Western blot o el ensayo de aglutinación inmunoabsorbente (ISAGA). La interpretación de los resultados servirá para decidir la profilaxis primaria, el tratamiento específico, el seguimiento serológico y la elaboración de otras pruebas usando otros fluidos corporales como líquido amniótico, lavado broncoalveolar o fluido espinal (Villard *et al.*, 2016).

1.7.1.1. Ensayos inmunoenzimáticos

Se han desarrollado varios tipos de ensayos inmunoenzimáticos, entre ellos, el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Éste se ha adaptado para la detección de anticuerpos IgM, IgG e IgA. Se fundamenta en la unión de los

anticuerpos del paciente a una fase sólida sensibilizada previamente con antígenos (método indirecto) o anticuerpos específicos (ELISA de captura). Para la detección de anticuerpos específicos de clase IgG anti-*T. gondii* usualmente se emplea como antígeno el lisado completo del parásito a partir de taquizoítos recuperados de ratones o cultivos celulares, pero los anticuerpos de clase IgM e IgA suelen determinarse por ensayos de captura de anticuerpos debido a que suelen tener menor afinidad o concentración que los de clase IgG (Olmedo-Hernández, 2009; Ferra, Holec-Gaşior y Kur, 2015). Debido a su alta sensibilidad, el ELISA es una prueba tamiz que se utiliza frecuentemente para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* (Caballero-Ortega *et al.*, 2014).

Para el diagnóstico de la infección por *T. gondii* en individuos inmunocompetentes (incluyendo mujeres embarazadas) se recomienda realizar pruebas para detectar anticuerpos IgG e IgM. El siguiente paso es establecer si la infección es reciente o crónica; un resultado negativo para IgM descarta la presencia de una infección reciente, mientras que un resultado positivo no necesariamente indica que el individuo cursa con una infección aguda, ya que estos anticuerpos pueden permanecer durante un año o más después de la infección, por lo que son necesarias pruebas complementarias, como el western blot, que apoyen el diagnóstico de una infección reciente (Dhakal *et al.*, 2015). Se recomienda realizar una prueba de avididad de anticuerpos IgG, ya que si los anticuerpos anti-*T. gondii* son de baja afinidad puede ser indicativo de una infección aguda; los resultados deben ser interpretados por un especialista experimentado (Olariu *et al.*, 2018). También el aumento de cuatro veces en el título de IgG en muestras de suero tomadas con 3-4 semanas de diferencia, corridas en paralelo, puede indicar una infección reciente con este parásito (Montoya, 2002; Dhakal *et al.*, 2015).

En casos donde se establece, o es altamente sugerente, una infección aguda en una mujer gestante o cuando se encuentra una anomalía en el feto que sugiere toxoplasmosis congénita, se recomienda hacer el diagnóstico prenatal mediante ultrasonido y PCR del líquido amniótico a partir de la semana 18 de gestación (Montoya, 2002). En el neonato, se usan pruebas para detectar

anticuerpos IgA e IgM, de preferencia empleando muestras de suero obtenidas de sangre periférica, ya que las muestras de cordón umbilical pueden contaminarse con la sangre materna (Montoya, 2002).

En los infantes de madres con infección crónica por *T. gondii* se pueden detectar anticuerpos IgG en sangre periférica. En estos pacientes, se debe realizar el seguimiento serológico de estos anticuerpos durante las primeras etapas de su vida, para descartar la transmisión vertical del parásito o si ésta ocurrió entonces administrarles tratamiento para controlar la parasitosis (Montoya, 2002).

1.7.1.2. Western blot

Es un método inmunoenzimático, que se emplea para identificar un patrón de reconocimiento antigénico por anticuerpos. Es una prueba útil para el diagnóstico postnatal temprano de toxoplasmosis congénita y es un ensayo confirmatorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM debido a que es una prueba con alta especificidad (Murat *et al.*, 2013; Caballero-Ortega *et al.*, 2014). En la toxoplasmosis congénita, esta prueba nos permite comparar los patrones de bandas para IgG e IgM entre las muestras de la madre y el neonato (Robert-Gangneux *et al.*, 1999). Con esto se puede determinar si hay producción de neoanticuerpos o mayor intensidad en las bandas para IgG en el suero del niño, lo que indica la existencia de infección congénita; mientras que, si ambos patrones de bandas del binomio son similares y no hay producción de IgM en el bebé, se consideran estos resultados una consecuencia de la transmisión pasiva de anticuerpos IgG al feto (Robert-Gangneux *et al.*, 1999). En casos de toxoplasmosis ocular, se pueden comparar muestras de humor acuoso y sangre, para determinar la síntesis local de inmunoglobulinas (Murat *et al.*, 2013).

1.7.2. Aislamiento del parásito

El diagnóstico de la infección aguda por *T. gondii* en casos congénitos, oculares y pacientes inmunosuprimidos se puede hacer mediante el aislamiento del parásito *in vivo* (bioensayo) o *in vitro* (cultivo celular). El primer método consiste en

inocular muestras sospechosas de líquidos o tejidos corporales en un modelo murino, con el objetivo de que el parásito se reproduzca en el hospedador y de esta manera confirmar la presencia del patógeno en la muestra clínica (Montoya, 2002; Galván-Ramírez y Mondragón-Flores, 2017). Se ha reportado que el bioensayo tiene una sensibilidad de 80-90% y una especificidad de 100% (Galván-Ramírez y Mondragón-Flores, 2017; Carral *et al.*, 2018). Se pueden emplear cepas de ratones susceptibles como C57BL/6 (deficientes en células B), knock outs para INF- γ o cepas resistentes a la enfermedad como BALB/c (Dubey *et al.*, 2012). Una de las desventajas de este método es el tiempo prolongado para la obtención del resultado (6 semanas), ya que se pueden requerir semanas hasta obtener el aislamiento, así como el sesgo de aislar solamente cepas de mediana virulencia, ya que generalmente las cepas virulentas exterminan al hospedador y no se consigue el aislamiento, mientras que las cepas avirulentas son eliminadas por el sistema inmune del huésped (Homan *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2002).

Por su parte, el cultivo celular *in vitro* evita las cuestiones éticas acerca del uso de animales de laboratorio, el resultado se obtiene en menor tiempo y se ha reportado que tiene igual sensibilidad que el bioensayo (Derouin *et al.*, 1987; Vismarra *et al.*, 2017). El aislamiento *in vitro* se puede realizar en líneas celulares susceptibles para ser invadidas y que permiten la proliferación de los parásitos como células Vero, fibroblastos humanos o una línea celular semi inmortal de microvasculatura (HMEC-1) (Calzada-Ruiz, 2012; Galván-Ramírez y Mondragón-Flores, 2017). Los aislamientos obtenidos por ambos métodos se pueden almacenar para posteriormente realizar la caracterización del parásito (Murat *et al.*, 2013).

1.7.3. Inmunohistoquímica

Es una prueba anatomopatológica, que se basa en la unión antígeno-anticuerpo que están presentes en secciones histológicas (Dagleish *et al.*, 2010). La técnica de inmunohistoquímica con el método de detección complejo peroxidasa permite la identificación específica y morfológica de taquizoítos o quistes tisulares

de *T. gondii* en tejidos (Cedillo, 2015). El diagnóstico de infección aguda se establece mediante la demostración de taquizoítos en cortes de tejido o frotis de líquidos corporales (ej.: líquido cefalorraquídeo, amniótico o lavado bronco alveolar), mientras que la presencia de varios quistes tisulares sin alteraciones por lo general es diagnóstica de una infección crónica (Cedillo, 2015).

Bajo ciertas circunstancias, como en condiciones de inmunosupresión, los quistes tisulares se pueden reactivar y generar lesiones necróticas con respuesta inflamatoria (Cedillo, 2015).

1.7.4. Biología molecular

Existen métodos moleculares que se enfocan en la detección específica del DNA del parásito en muestras biológicas, en este grupo se incluyen principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) convencional, la PCR anidada, la PCR múltiple y la PCR en tiempo real. Para la detección de una secuencia determinada, se recomienda realizar una PCR anidada a partir de una PCR convencional, con lo cual se incrementa la sensibilidad de la prueba; mientras que la PCR en tiempo real tiene una sensibilidad superior a la PCR anidada y convencional (Contini *et al.*, 2005).

Las tres secuencias repetidas de DNA que son más empleadas para la detección de *T. gondii* en muestras biológicas incluyen al gen *B1* de 35 copias, al elemento repetido de 529 pb con 200-300 copias y al espaciador interno transcrito (ITS-1) con 110 copias o secuencias del gen 18S DNAr (Su *et al.*, 2010). Se ha reportado que el fragmento no codificante de 529 pb es 10 veces más sensible que el gen *B1* (Homan *et al.*, 2000). EL marcador 18S DNAr es una herramienta excelente para detectar organismos apicomplexas que están estrechamente relacionados con *T. gondii* en muestras de animales (Su *et al.*, 2010). La PCR múltiple consiste en una primera reacción usando los oligonucleótidos externos de varios marcadores genéticos y los productos de esta amplificación se emplean como molde para la reacción individual de cada marcador usando los oligonucleótidos internos. La ventaja de esta técnica es que utiliza una cantidad pequeña de DNA, y

es útil en casos clínicos que tienen poca cantidad de material genético (Su *et al.*, 2010).

1.8. Genoma y diversidad genética de *Toxoplasma gondii*

El genoma nuclear del parásito es haploide, con un tamaño genético de ~592 cM, un tamaño físico de ~65 Mb, con un promedio de 104 kb/cM. Está constituido por 14 cromosomas (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI y XII), con un tamaño que varía de 1.8 (cromosoma Ia) a >7 Mb (cromosoma X), contiene entre 7860 a 8460 genes codificantes y su contenido de G+C es en promedio de 52% (Khan *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2016). En el genoma de la cepa RH se han reportado 111 genes únicos en comparación con el de las cepas GT1, ME49 y VEG. Aunque la mayoría de estos genes expresan proteínas con funciones desconocidas, 17 de ellos expresan proteínas relacionadas con funciones celulares vitales, asociadas con la regulación de la expresión génica (Lau *et al.*, 2016).

El genoma mitocondrial es lineal, tiene un tamaño entre 6-8 kb y contiene tres genes que codifican las proteínas del citocromo c oxidasa I (*cox1*) y III (*cox3*) y citocromo b (*cytb*), junto con genes de RNA ribosomal de la subunidad pequeña y grande (Gjerde, 2013). El genoma del apicoplasto es circular, de 35 kb, posee genes de RNA ribosomal de la subunidad grande y pequeña, repetidos en tándem invertidos, genes de RNA de transferencia y otros que codifican ciertas proteínas (Roos *et al.*, 1999).

La diversidad genética del parásito se comenzó a estudiar desde hace más de 20 años. En un estudio empleando polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en seis loci (*SAG1*, *SAG2*, *ROP1*, *850*, *L328*, *62*) de 106 aislamientos de humanos y animales, principalmente de Norte América y Europa, se estableció que la estructura genética de *T. gondii* estaba conformada por tres genotipos clásicos designados como I, II y III, ya que más del 95% de los aislamientos se clasificaron en uno de estos tres genotipos. Por lo que se consideró que la presencia de genotipos recombinantes y atípicos era muy poco frecuente (Howe y Sibley, 1995).

Sin embargo, varios estudios han demostrado que existe una mayor diversidad genética. Dubey y Su (2009) reportaron 58 genotipos a partir de 149 aislamientos de *T. gondii* de pollos de Brasil, mientras que en 253 aislamientos de cerdos, corderos y venados cola blanca de Estados Unidos, se identificaron 18 genotipos. En los aislamientos de Brasil no se encontró el genotipo II y la mayoría de los genotipos fueron atípicos y recombinantes; en cambio, en los aislamientos de Estados Unidos el genotipo II fue el que predominó (54%), seguido por el genotipo III (23%). Rajendran *et al.* (2012) analizaron 164 aislamientos de *T. gondii* a partir de muestras de gatos y gallinas de diversos países de Centroamérica y Sudamérica; usando 11 marcadores mediante PCR-RFLP, identificaron 42 genotipos, por lo que concluyeron que las poblaciones de América Central y del Sur tienen gran diversidad, con un dominio del genotipo III y un genotipo cercanamente relacionado, ToxoDB #7, con excepción de Chile donde el genotipo II fue el que dominó.

Shwab *et al.* (2014) analizaron 1457 aislamientos de *T. gondii* mediante PCR-RFLP utilizando 10 marcadores genéticos e identificaron 189 genotipos. Estos autores concuerdan con lo reportado en estudios previos, ya que encontraron pocos genotipos que predominan en el hemisferio norte en comparación con lo que sucede en el hemisferio sur donde existen cientos de genotipos que coexisten.

Actualmente se han reportado al menos 287 genotipos de *T. gondii* a nivel mundial, mediante PCR-RFLP (ToxoDB.org, 2018).

Su *et al.* (2012) establecieron un sistema de tipificación del parásito para determinar la estructura genética de la población de *T. gondii*. Para esto emplearon 12 marcadores PCR-RFLP, 15 microsatélites y secuenciación de 4 intrones de genes constitutivos para agrupar los genotipos en haplogrupos y éstos a la vez en clados, así como también identificar cepas representativas de cada haplogrupo. A través de la evaluación de 956 aislamientos recolectados de diferentes partes del mundo, se obtuvieron 138 genotipos, que se clasificaron en 15 haplogrupos divididos en 6 clados (Su *et al.*, 2012; Figura 4).

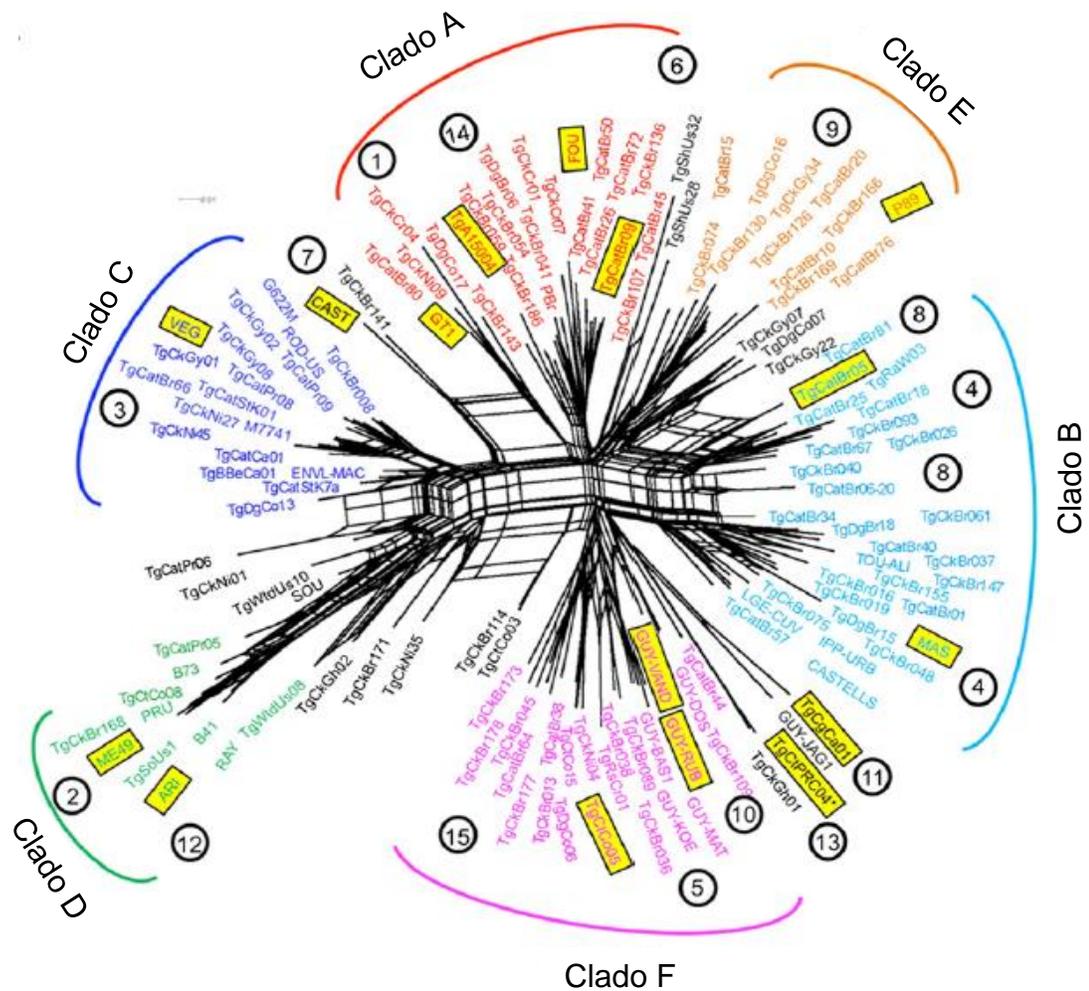


Figura 4. Estructura genética de 138 genotipos de *Toxoplasma gondii*. Se clasifica en 6 clados (A-F), los haplogrupos se muestran en números dentro de círculos, la cepa representativa de cada haplogrupo se encuentra en un rectángulo amarillo. Tomado y modificado de Su *et al.*, 2012.

El clado A está formado por los haplogrupos 1 (clásico I), 6 y 14 (cepas de Sudamérica y África), el clado B tiene los haplogrupos 4 y 8 (cepas dominantes de Sudamérica), el clado C está constituido solamente por el haplogrupo 3 (clásico III), el clado D contiene los haplogrupos 2 (clásico II) y 12 (dominantes en Norte América), en el clado E se encuentra el haplogrupo 9 y el clado F está compuesto por los haplogrupos 5, 10 (cepas de Guyana Francesa) y 15 (cepas de Brasil). Los haplogrupos 7, 11 y 13 se ubicaron en los límites de los clados, por lo que no fueron

agrupados dentro de alguno en específico. Recientemente, Lorenzi *et al.* (2016) determinaron la existencia de 16 haplogrupos mediante secuenciación masiva de 62 aislamientos de *T. gondii*. El haplogrupo 7 fue clasificado dentro del clado A, mientras que los haplogrupos 11 y 13 forman parte del clado D (Figura 5).

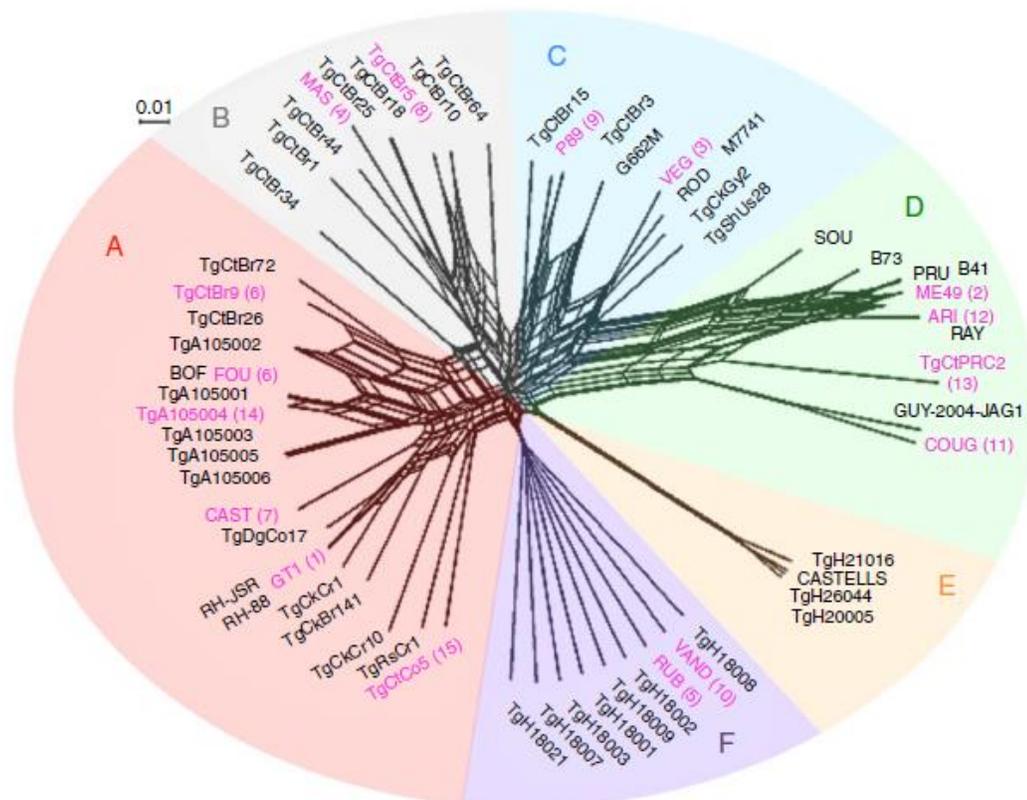


Figura 5. Estructura genética de la población de *Toxoplasma gondii*, de acuerdo con la secuenciación masiva de 62 aislamientos de *T. gondii*. Las figuras de colores representan los clados, los números de los haplogrupos se encuentran en paréntesis con base en su asignación previa. Los nombres en rosa denotan las cepas representativas. La barra de escala corresponde al número de SNPs por sitio. Tomado y modificado de Lorenzi *et al.*, 2016.

1.8.1. Genotipos de *Toxoplasma gondii* en México

Los estudios de la diversidad genética de *T. gondii* en México con muestras de humanos de casos congénitos, así como de animales domésticos y silvestres han determinado la existencia de los genotipos I, III, así como genotipos recombinantes y atípicos (Dubey, *et al.*, 2004, 2009, 2013; Chávez-Crisóstomo,

2010; Besné-Mérida, 2010; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011c; Cedillo-Peláez *et al.*, 2009, 2011b, 2015; Valenzuela-Moreno, 2014; Rico-Torres *et al.*, 2012, 2015, 2018).

En casos de toxoplasmosis congénita en humanos se ha identificado el genotipo I o aislamientos relacionado a éste en neonatos, con daño clínico moderado a severo, usando cuatro marcadores genéticos (Rico-Torres *et al.*, 2012). En otro estudio de genotipificación de toxoplasmosis congénita en humanos de la Ciudad de México se observó una predominancia de alelos I, seguidos de II y III, así como la presencia del genotipo ToxoDB #10 (clásico I), genotipos compatibles con ToxoDB #112 o 142, #10 o 27 y #225 y tres genotipos nuevos (Rico-Torres *et al.*, 2018). De relevancia es que en este grupo de pacientes se encontraron cinco binomios con infecciones mixtas, es decir con dos genotipos distintos de *T. gondii*.

En aislamientos provenientes de muestras de gallinas del Estado de México y Ciudad de México y perros y gatos de Durango, mediante PCR-RFLP usando 11 marcadores se identificaron 5 genotipos, que corresponden a ToxoDB #2 (clásico III), #9 (genotipo atípico), #73, #74 y #155 (genotipos recombinantes); todos fueron avirulentos en ratones (Dubey *et al.*, 2004, 2009). En Durango, el genotipo ToxoDB #9 también se encontró en un aislamiento de una paloma (*Columba livia*), y el genotipo atípico ToxoDB #222 se aisló de una muestra de puma (*Felis concolor*) y fue virulento en un modelo murino (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011c; Dubey *et al.*, 2013).

Toxoplasma gondii también ha sido genotipificado parcialmente (SAG2, SAG3, GRA6, β TUB) en gatos de la Ciudad de México, Estado de México y Colima, y se encontraron alelos I y III (Besné-Mérida, 2010). A partir de un aislamiento de un gato proveniente de Colima, se logró la identificación del genotipo ToxoDB #28, el cual en todos sus loci es I excepto para c22-8 (II), L358 y Apico (III) (Rico-Torres *et al.*, 2015). En muestras de borregos de Colima se identificaron 13 haplotipos, la mayoría relacionados con el genotipo I mediante secuenciación del locus B1 (Martínez-Flores *et al.*, 2017).

1.9. Asociación entre el genotipo de *Toxoplasma gondii* y la severidad de la presentación clínica

No existe una correlación definida entre el genotipo de *T. gondii* y la enfermedad en humanos y tampoco existe evidencia que la virulencia observada en ratones se correlacione con las infecciones en humanos u otras especies (Boothroyd y Grigg, 2002; Peyron *et al.*, 2006). De acuerdo con Grigg *et al.* (2001a) la virulencia parece ser resultado de la combinación de alelos en dos o más loci que cooperan para conferir un incremento en la patogenicidad.

A pesar de lo anterior, el genotipo I ha sido encontrado en casos de toxoplasmosis congénita humana con presentaciones clínicas severas (Howe y Sibley, 1995; Rico-Torres *et al.*, 2012), así como en pacientes con retinocoroiditis severa o atípica, junto con genotipos recombinantes (Grigg *et al.*, 2001b). Por su parte, Xiao *et al.* (2009) establecieron que la evidencia serológica de infección materna con el genotipo I conlleva un incremento estadísticamente significativo en el riesgo de psicosis en la descendencia y no encontraron una asociación entre la presencia de anticuerpos contra otros genotipos y el riesgo de psicosis en la edad adulta. El genotipo I también se han reportado en muestras de humanos con SIDA y toxoplasmosis cerebral (Ferreira *et al.*, 2008). Cabe resaltar que en una revisión sistemática se encontró una fuerte asociación entre un genotipo I o atípico y presencia de problemas clínicos en la toxoplasmosis congénita en humanos (razón de momios = 2.4, $p < 0.05$), independiente del efecto del trimestre del embarazo (Rico-Torres *et al.*, 2016).

El genotipo II es el que predomina (cerca del 80%) en casos de toxoplasmosis sintomática humana en pacientes con SIDA y en otros pacientes inmunocomprometidos, así como en la mayoría de los casos de toxoplasmosis congénita de Europa y Estados Unidos adquiridos en los primeros dos trimestres de gestación (Howe y Sibley, 1995; Howe *et al.*, 1997; Dardé, 2004; Rico-Torres *et al.*, 2016). Este genotipo se ha encontrado en diferentes presentaciones de la enfermedad congénita como infección letal, daño neuro-ocular, coriorretinitis aislada o toxoplasmosis latente (Dardé, 2004). Sin embargo, Fuentes *et al.* (2001)

determinaron que el genotipo I es el que predomina en casos de toxoplasmosis congénita en España, realizando PCR-RFLP del loci SAG2 directamente de muestras clínicas. En animales, el genotipo II es el que se aísla con mayor frecuencia del ganado destinado al consumo humano, en Europa y Estados Unidos (Owen y Trees, 1999; Dardé, 2004).

Por su parte, el genotipo III se ha encontrado en infecciones de animales (Howe y Sibley, 1995) y con menor frecuencia en casos de humanos con SIDA, toxoplasmosis cerebral y toxoplasmosis congénita (Ferreira *et al.*, 2008; Rico-Torres *et al.*, 2016).

Los genotipos atípicos se han sido identificado en casos de toxoplasmosis severa en pacientes inmunocompetentes con disfunción multiorgánica (Bossi *et al.*, 1998; Dardé *et al.*, 1998; Carme *et al.*, 2009), así como en casos de toxoplasmosis congénita principalmente en América y África (Dardé, 2004; Rico-Torres *et al.*, 2016).

1.10. Caracterización genética de *Toxoplasma gondii*

Para identificar el genotipo de *T. gondii*, se usan técnicas moleculares de alta resolución como son los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR-RFLP), los microsatélites, la tipificación multilocus de secuencias y la secuenciación (Su *et al.*, 2010). Dentro de los métodos serológicos, la serotipificación es la técnica que permite distinguir principalmente cepas tipo I/III de las II (Sousa *et al.*, 2008). Mediante la caracterización genética se puede inferir si existe una asociación entre el genotipo del parásito y la patogénesis de la toxoplasmosis en humanos y animales (Sousa *et al.*, 2009).

1.10.1. Técnicas de genotipificación

Estas técnicas (PCR-RFLP, microsatélites, secuenciación) nos permiten identificar la diversidad genética de *T. gondii* y entender su epidemiología molecular (Sousa *et al.*, 2009). Una desventaja de éstas es que frecuentemente es difícil obtener suficiente cantidad de DNA del parásito a partir de tejidos y fluidos de

hospedadores incluso en casos clínicos, y el DNA de *T. gondii* a partir de casos subclínicos por lo general no está disponible (Xiao *et al.*, 2009; Maksimov *et al.*, 2013).

1.10.1.1. PCR-RFLP

Es la técnica de genotipificación empleada con mayor frecuencia para *T. gondii* en el mundo. Su *et al.* (2006) desarrollaron un conjunto de nueve marcadores de genes unicopia (c22-8, c29-2, L358, *PK1*, *SAG2*, *GRA6*, *SAG3*, *BTUB* y *Apico*) mediante PCR-RFLP que tienen la capacidad de distinguir los tres genotipos clásicos, así como genotipos recombinantes, atípicos e infecciones mixtas. Posteriormente se desarrolló una PCR-RFLP múltiple anidada con 10 marcadores genéticos que incluye *SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* y *Apico* (Dubey *et al.*, 2007a).

Para alcanzar un nivel de resolución genético mayor, se requiere usar varios marcadores mediante PCR-RFLP, ya que en los genes de copia única la diversidad alélica es baja (2-3 alelos/locus) (Ajzenberg *et al.*, 2002). Mediante los marcadores para PCR-RFLP se revelan solo las mutaciones puntuales estables, por lo que no se identifican las mutaciones en otros sitios del gen (Khan *et al.*, 2011). Por esta razón son inadecuados para distinguir aislamientos genéticamente relacionados (Ajzenberg *et al.*, 2010); sin embargo, para conseguir esta diferenciación la PCR-RFLP se puede realizar en combinación con un análisis de microsatélites o secuenciación (Su *et al.*, 2006).

La genotipificación múltiple mediante PCR-RFLP es simple, costo-efectiva comparada con la secuenciación y es considerada como una herramienta rápida y práctica para la identificación y estimación de la diversidad genética de *T. gondii* (Su *et al.*, 2006).

1.10.1.2. Microsatélites

Los microsatélites son secuencias cortas, repetidas en tándem de 2 a 6 nucleótidos. Son altamente polimórficos debido a la variación en su longitud por lo

que exhiben múltiples alelos. Son especialmente útiles para identificar mutaciones recientes en aislamientos estrechamente relacionados dentro de un linaje (Dardé, 2004; Su *et al.*, 2006; Ajzenberg *et al.*, 2002, 2010).

Los polimorfismos pueden ser identificados por PCR lo que requiere una cantidad pequeña de DNA y el tamaño del alelo puede ser estudiado mediante el empleo de oligonucleótidos fluorescentes y un secuenciador automático que asegura confiabilidad en los resultados (Ajzenberg *et al.*, 2002; Dardé, 2004). Ajzenberg *et al.* (2010) desarrollaron un método para genotipificar que asegura la discriminación genética de los aislamientos de *T. gondii* mediante un ensayo de PCR múltiple usando 15 marcadores microsatélites localizados en 11 cromosomas diferentes del parásito. Debido a que *T. gondii* es haploide, se espera solamente un pico para un locus determinado que corresponde a un alelo. En infecciones mixtas se puede observar más de un pico, lo que indica la presencia de diferentes alelos en la muestra (Ajzenberg *et al.*, 2002).

Los ensayos con microsatélites brindan mayor resolución que el PCR-RFLP para revelar si dos aislamientos son genéticamente idénticos o diferentes, permiten identificar una fuente común de infección en un brote, contaminación de laboratorio e infecciones mixtas. Sin embargo, para este ensayo se requiere de un secuenciador automático y una sensibilidad de 50 a 100 equivalentes genómicos (número de parásitos/por reacción de PCR) de *T. gondii* por cada 5 µL de muestra de DNA (Ajzenberg *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010).

1.10.1.3. Secuenciación de DNA

Se basa en la detección de polimorfismos incluyendo SNP, inserciones y deleciones de nucleótidos en la secuencia de DNA. Es el método de elección para estudios filogenéticos debido a que brinda mayor resolución de la diversidad genética y evolución del genoma, aunque se necesita una cantidad mayor de DNA de *T. gondii* (Dardé *et al.*, 2014). Debido a que la PCR-RFLP y microsatélites son simples y costo-efectivas en comparación con esta prueba, se prefieren esas técnicas como herramientas para la caracterización del parásito en estudios de

epidemiología (Su *et al.*, 2010). Recientemente se ha realizado la secuenciación del genoma completo de 62 aislamientos del parásito (Lorenzi *et al.*, 2016).

1.10.2. Serotipificación

Otra manera de realizar la caracterización de *T. gondii* es mediante la serotipificación, que se basa en el reconocimiento de péptidos sintéticos provenientes de las secuencias de proteínas antigénicas y polimórficas de diferentes cepas de *T. gondii* por los anticuerpos séricos de hospedadores infectados (Kong *et al.*, 2003; Xicoténcatl-García, 2014). Entre los péptidos que se han empleado para la serotipificación se encuentran los antígenos de superficie SAG1, SAG2, SAG3, SAG4, BSR4 y SRS2, proteínas de las roptrias ROP1 y proteínas de gránulos densos GRA1, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6 y GRA7; siendo los últimos tres los péptidos usados con mayor frecuencia (Kong *et al.*, 2003; Nowakowska *et al.*, 2006; Peyron *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2008, 2009, 2010; Vaudaux *et al.*, 2010; McLeod *et al.*, 2012; Maksimov *et al.*, 2013, 2018). Por lo general, los péptidos se derivan de las secuencias de las cepas clásicas I, II y III, sin embargo, en varios estudios solamente permiten distinguir infecciones causadas por genotipos II de aquellas I/III, debido a que los genotipos I y III codifican proteínas de GRA6 y GRA7 casi idénticas (Kong *et al.*, 2003; Nowakowska *et al.*, 2006).

De acuerdo con Kong *et al.* (2003), esta técnica se fundamenta en que el parásito estimula una respuesta inmune humoral fuerte en el hospedador, por lo que los anticuerpos en contra de las proteínas de *T. gondii* permanecen con títulos altos y están presentes en pacientes con todas las manifestaciones clínicas de la infección, desde casos oculares, congénitos y hasta en casos asintomáticos.

En comparación con las técnicas moleculares o con la toma de una biopsia, el método serológico es menos invasivo y permite analizar muestras de pacientes sintomáticos y asintomáticos (Kong *et al.*, 2003; Peyron *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2008; Maksimov *et al.*, 2013).

Una de las limitaciones de esta prueba serológica es que se basa en el supuesto de que el hospedador es inmunocompetente. Además, no se ha logrado

distinguir correctamente a los genotipos atípicos de los clásicos, a pesar de que las secuencias de los péptidos provienen con mayor frecuencia de uno de los dos alelos predominantes de los genotipos clásicos y en menor grado a partir de los genotipos atípicos (Grigg *et al.*, 2001a; Kong *et al.*, 2003; Vaudaux *et al.*, 2010; Maksimov *et al.*, 2013).

1.10.2.1. Proteína 6 de gránulos densos (GRA6)

Los gránulos densos son microesferas de aproximadamente 200 nm de diámetro, rodeados de una membrana única (Mercier *et al.*, 2005). La proteína GRA6 se encuentra en los gránulos densos y es secretada durante el proceso de invasión a la célula hospedadora. Después de su secreción, la proteína se encuentra tanto en forma soluble como asociada a la membrana de la vacuola parasitófora. Dentro de ésta, se asocia con una red de túbulos membranosos elongados que se ensamblan en el extremo posterior del parásito junto con las proteínas GRA2 y GRA4 (Lecordier *et al.*, 1999; Adjogble *et al.*, 2004).

La proteína GRA6 es inmunogénica y está involucrada en la estabilización de la estructura tubular de la red intravacuolar, la cual tiene conexiones con la vacuola parasitófora, lo que sugiere que puede servir como una extensión de la superficie para mejorar la absorción de nutrientes a partir de la célula hospedadora o para exportar proteínas y lípidos desde el parásito hacia la membrana de la vacuola parasitófora o de la célula hospedadora (Adjogble *et al.*, 2004; Mercier *et al.*, 2002, 2005). A pesar de su posible función, la red intravacuolar membranosa no es esencial para la tasa de crecimiento *in vitro* de los parásitos ya que la disrupción exitosa de los genes *GRA2*, *GRA5* y *GRA6* en un mismo parásito, no altera el desarrollo de éste (Mercier *et al.*, 2005).

El gen *GRA6* es único en el genoma haploide del parásito, se encuentra en el cromosoma X (Mercier *et al.*, 2005). De acuerdo con Fazaeli *et al.* (2000), el alineamiento de secuencias de *GRA6* de 30 cepas de *T. gondii* demostró la existencia de 9 alelos, 24 polimorfismos y 22 substituciones de nucleótidos; de éstas, 21 resultaron en un cambio de aminoácido. En las cepas tipo II, se detectó la

delección de 15 pares de bases (pb) y 3 pb en las posiciones 635-649 y 658-660, respectivamente. Existen dos regiones variables en los extremos 5' y 3' del gen, pero la mayor variabilidad de nucleótidos se localizó en una región de 110 pb en el extremo 3'. Se asociaron polimorfismos específicos con las cepas I, II y III en tres, diez y seis posiciones, respectivamente (Fazaeli *et al.*, 2000). La proteína en las cepas I y III está formada por 230 aminoácidos, mientras que en las cepas II por 224 aminoácidos. La región más polimórfica de la proteína GRA6 se identificó en el extremo C-terminal (Sousa *et al.*, 2009).

1.11. Concordancia entre la serotipificación y genotipificación de *T. gondii*

Existen estudios de serotipificación que usan muestras previamente genotipificadas para validar a los péptidos; sin embargo, en la mayoría de las investigaciones en las que se han empleado los péptidos de GRA6, como es el caso de este trabajo, el genotipo ha sido determinado mediante otros marcadores genéticos, lo que puede provocar una determinación errónea de la concordancia entre estas técnicas (Cuadro 3).

Nowakowska *et al.* (2006) realizaron una PCR-RFLP de 4 marcadores (5'-SAG2-3', SAG3, GRA6 y BTUB) directamente de líquido amniótico y líquido ceforraquídeo de 19 casos de toxoplasmosis congénita humana de Polonia. En los nueve casos que lograron genotipificar, exclusivamente encontraron el genotipo II, ocho de los nueve casos provenían de casos de toxoplasmosis severa. Por otro lado, realizaron la serotipificación empleando péptidos de GRA6 y GRA7 e identificaron que en nueve casos el genotipo II era el causante de infecciones sintomáticas y asintomáticas. En total, 7/9 (77.8%) muestras presentaron concordancia entre la genotipificación y la serotipificación.

Sousa *et al.* (2008) emplearon péptidos polimórficos del extremo C-terminal de GRA6. Para validar el ensayo emplearon muestras de suero de infecciones humanas provocadas por genotipos clásicos (I, II y III) y genotipos atípicos, previamente genotipificadas usando 5 marcadores microsatélites (TUB2, TgM A, W35, B17, B18). Los resultados de la serotipificación tuvieron 87% de concordancia

(20/23) con la genotipificación en casos infectados con genotipos clásicos. Por otro lado, no se lograron serotipificar los genotipos atípicos usando solamente dos péptidos, ya que todos fueron mal clasificados como genotipos clásicos.

Cuadro 3. Serotipificación de *Toxoplasma gondii* en muestras previamente genotipificadas

Especie	Serotipificación	Genotipificación	Referencia
Humano (TC)	GRA6I/III, GRA6II, GRA7II, GRA7III	PCR-RFLP: 5'SAG2 3', SAG2, SAG3, GRA6, BTUB	Nowakowska <i>et al.</i> , 2006
Humano	GRA6II, GRA6I/III	Microsatélites: TUB2, TgM A, W35, B17, B18	Sousa <i>et al.</i> , 2008
Humano	GRA7I, GRA7III, Am6, Af6, Am7	Microsatélites: TUB2, TgM A, W35, B17, B18	Sousa <i>et al.</i> , 2009
Gallina	GRA6II, GRA6I/III, GRA7I, GRA7III	PCR-RFLP: SAG2	Sousa <i>et al.</i> , 2010
Cerdo	GRA6II, GRA6I/III, GRA7I, GRA7III	Microsatélites: TUB2, TgM A, W35, B17, B18	Sousa <i>et al.</i> , 2010
Humano (brote)	GRA6I/III, GRA6II, GRA7II	Secuenciación de B1, GRA6 y GRA7	Vaudaux <i>et al.</i> , 2010
Humano (TO)	GRA6 I/III, GRA6 II, GRA7II	Secuenciación de B1, NTS2	Shobab <i>et al.</i> , 2013

TC: toxoplasmosis congénita. TO: toxoplasmosis ocular.

En otro estudio usando péptidos de genotipos clásicos (I, III) y atípicos de GRA6 y GRA7, observaron que el péptido GRA7III fue un buen candidato para serotipificar infecciones causadas por el genotipo III, mientras que el péptido GRA7I presentó baja sensibilidad. Los péptidos para identificar genotipos atípicos (Am6 y Af6) tuvieron baja especificidad ya que reaccionaron con sueros de pacientes infectados con genotipos clásicos, genotipificadas mediante microsatélites (Sousa *et al.*, 2009).

Sousa *et al.* (2010) validaron su ensayo de serotipificación empleando muestras de suero de gallinas y cerdos que previamente habían sido genotipificadas mediante PCR-RFLP del locus *SAG2* y cinco marcadores microsatélites (*TUB2*, *TgM A*, *W35*, *B17*, *B18*), respectivamente. Cuatro gallinas de 11 (36.4%) tuvieron el mismo resultado mediante serotipificación y genotipificación, mientras que, en suero de cerdos infectados, solamente 2 de 15 (13.3%) el resultado fue concordante en ambas técnicas.

En el estudio de Vaudaux *et al.* (2010) compararon los resultados de los serotipos de humanos infectados en un brote de toxoplasmosis en Brasil con los de ratones infectados experimentalmente con el aislamiento del brote, que previamente había sido identificado como un genotipo atípico, clásico de Brasil denominado Brl. Mediante secuenciación de los loci *B1*, *GRA6* y *GRA7*, se identificaron el genotipo Brl y otros genotipos atípicos. Al utilizar los péptidos de *GRA6* y *GRA7*, se observó el mismo serotipo en la mayoría de las muestras de humanos, lo que coincidió con el serotipo determinado en el suero de los ratones.

Mediante secuenciación de los loci *B1* y *NTS2* de pacientes con toxoplasmosis ocular, se identificaron genotipos atípicos y la mayoría de las muestras no reaccionó con ninguno de los péptidos de *GRA6* y *GRA7* (Shobab *et al.*, 2013).

2. Planteamiento del problema

Aunque *T. gondii* es prevalente en México tanto en humanos como en animales, se sabe poco de los genotipos que circulan en todo el territorio nacional. En términos ecológicos o epidemiológicos, no es relevante la especie animal de donde se determine el DNA del parásito, ya que *T. gondii* no tiene preferencia por algún hospedador; lo trascendental es su localización geográfica, así como los hospedadores definitivos que habiten en la zona, debido a que las cepas del parásito pueden variar dependiendo del clima de una región a otra, y de los eventos de recombinación que puedan generarse al llevar a cabo su reproducción sexual en las células intestinales de los felinos. Además, las cepas que circulan en una región pueden determinar la severidad de los casos clínicos y más aún, la respuesta al tratamiento (Pena *et al.*, 2006, 2008; Rico-Torres *et al.*, 2016). La caracterización genética del parásito mediante PCR-RFLP/secuenciación, estrategia considerada de referencia, es dependiente de la cantidad de DNA del parásito que se pueda extraer a partir de tejidos de un individuo infectado, por lo que su utilidad tiene esta limitante. Por su parte, la serotipificación se basa en el reconocimiento de péptidos sintéticos polimórficos por los anticuerpos séricos del hospedador infectado (Kong *et al.*, 2003). Aunque hay información acerca de la relación entre el genotipo y el serotipo, ésta es escasa y en muchos estudios no se ha realizado la caracterización del mismo gen mediante genotipificación y serotipificación; por lo anterior, es importante determinar la concordancia entre ambas técnicas, para usarlas en el diagnóstico integral de casos de toxoplasmosis en humanos y animales.

3. Hipótesis de investigación

Si se lleva a cabo la serotipificación y la genotipificación del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* en muestras de borregos, la concordancia será igual o mayor al 70%.

4. Objetivo

Determinar la concordancia entre el serotipo y el genotipo del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre y tejido de borregos del estado de Colima.

5. Material y Métodos

5.1. Tipo de estudio

Prospectivo, observacional, transversal y comparativo.

5.2. Lugar de estudio

Para este estudio se seleccionó el Estado de Colima ya que cuenta con las condiciones climáticas apropiadas para la transmisión de *T. gondii*, al ser un lugar cálido-húmedo con un promedio anual de temperatura y humedad de 25.3°C y 67% respectivamente. Además, en humanos se reportó una prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* mayor al 70% y en esta región habitan felinos domésticos y seis especies de felinos silvestres (García-Márquez *et al.*, 2007; Caballero-Ortega *et al.*, 2012).

5.3. Muestras biológicas

Se empleó un banco de muestras de DNA, tejidos de corazón y diafragma y sueros de borregos semi estabulados destinados para el consumo humano, colectado entre los años 2013 y 2014 para un estudio de filogenia del parásito (Martínez-Flores *et al.*, 2017; Cuadro 7). El rango de edad de los borregos fue desde menores de 12 meses hasta mayores de 4 años, de ambos sexos, diferentes razas (Pelibuey, Dorper, Black belly y cruzas) y habitaban a una distancia de 2 a 14 km desde la línea costera.

5.4. Técnicas de laboratorio

Dentro de la estrategia general del estudio se realizaron técnicas moleculares y serológicas para identificar a los animales positivos a la infección parasitaria (Figura 6). Las muestras que resultaron positivas o dudosas por PCR tiempo real del gen *B1* fueron analizadas mediante una PCR semi anidada para el marcador genético *GRA6* y sus productos fueron secuenciados. Los sueros de los borregos positivos a la genotipificación, se probaron en ensayos serológicos empleando

extracto crudo de taquizoítos de la cepa RH y tres péptidos sintéticos de la proteína 6 de los gránulos densos (GRA6-I, GRA6-II, GRA6-III).

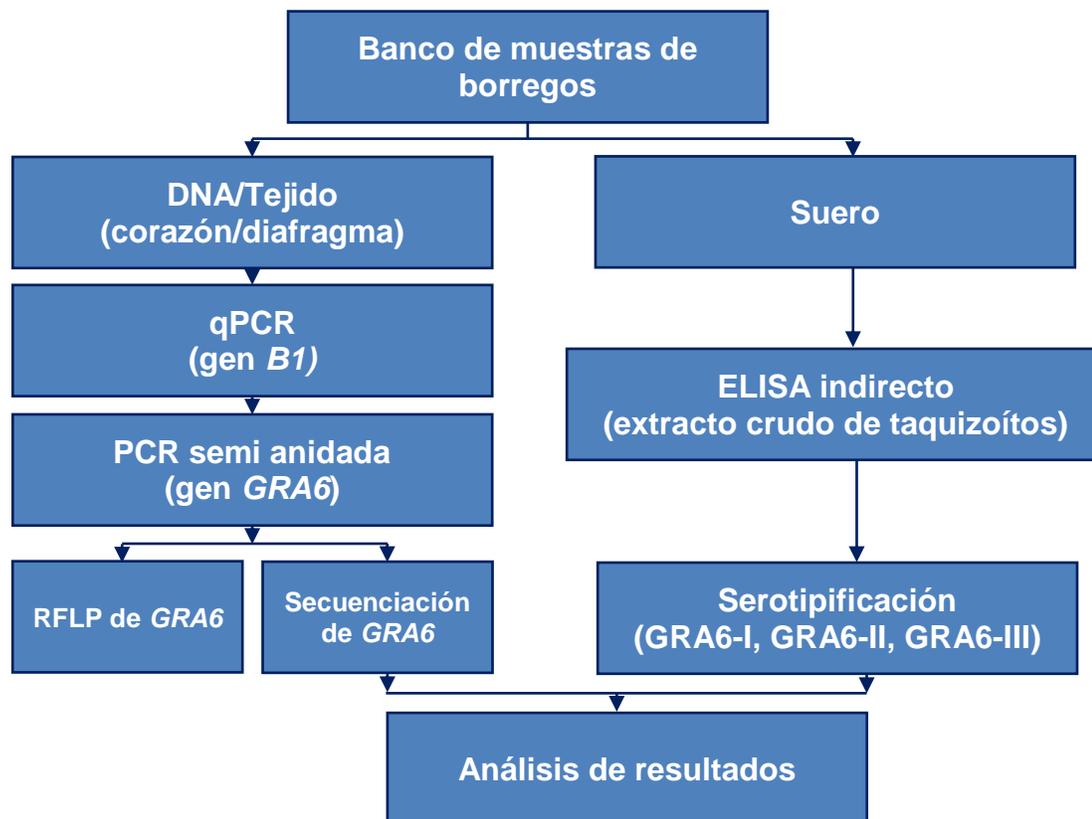


Figura 6. Estrategia general del estudio

5.4.1. Extracción de DNA

Se usaron once muestras de DNA de tejidos de borregos (muestras 1 a 11; Cuadro 7) extraídas previamente en el laboratorio mediante el estuche comercial Gentra Puregene Tissue Kit (QIAGEN, Cat. 158622, Anexo 1). Adicional a este estuche comercial se probaron los métodos de extracción de DNA: fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) (Green y Sambrook, 2012, Anexo 2) y precipitación salina (Anexo 3) en cuatro tejidos de borregos seleccionados al azar (muestras 12 a 15, Cuadro 7). Posteriormente, se realizó la extracción de DNA de 11 tejidos de borregos (muestras 16 a 26; Cuadro 7) mediante la técnica de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v), caracterizadas previamente para el gen

B1 por Martínez-Flores *et al.* (2017). Con la finalidad de incrementar la probabilidad de detección del DNA del parásito, en las muestras de tejido se empleó la técnica de concentración de quistes tisulares reportada previamente (Anexo 4; Martínez-Flores *et al.*, 2017). La concentración y pureza del DNA se determinaron mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) a 260 y 280 nm, depositando 1 µL de cada muestra sobre el pedestal del equipo (Cuadro 7). El DNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.4.2. PCR en tiempo real

Se realizaron ensayos semicuantitativos del gen *B1* de *T. gondii*, usando los oligonucleótidos descritos por Kompalic-Cristo *et al.* (2007) que amplifican una región de 62 pb (Cuadro 4, Anexo 5). En cada ensayo se incluyeron como controles positivos el DNA de la cepa RH de *T. gondii* y tejido de pulmón de ratones infectados experimentalmente con 5×10^5 y 5×10^3 taquizoítos/10 mg de tejido, el control negativo fue agua inyectable y adicionalmente en cada muestra se colocó el control interno de la PCR. Las muestras se consideraron positivas si la amplificación del gen de interés estaba por encima del umbral de detección; negativas cuando la amplificación del gen estaba por debajo del umbral de detección y dudosas cuando solo una de las repeticiones fue positiva o todas las repeticiones fueron positivas, pero estaban cerca del umbral de detección del ensayo (Applied Biosystems, 2010).

Cuadro 4. Oligonucleótidos y sonda para el gen *B1* de *Toxoplasma gondii*

	Nombre	Secuencia del oligonucleótido*
Sentido	GEN_B1_TG-TX2F	5'CTAGTATCGTGCGGCAATGTG 3'
Antisentido	GEN_B1_TG-TX2R	5'GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT 3'
Sonda	GEN_B1_TG-TX2M1	5'(6-FAM)-CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-MGB) 3'

*FAM: reportero 6-carboxifluoresceína; NFQ: apagador no fluorescente; MGB: Minor Groove Binder

5.4.3. PCR semianidada del gen *GRA6*

Se llevó a cabo una PCR punto final empleando los oligonucleótidos reportados por Su *et al.* (2010) y Fazaeli *et al.* (2000) que amplifican un producto de 854 pb (Cuadro 5, Anexo 5;). Como control positivo se empleó el DNA de la cepa RH y como control negativo se usó agua inyectable. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 mg/1 mL, Invitrogen) en amortiguador TBE 1X; se usaron 3 µL del marcador de peso molecular (GelPilot DNA Loading Dye, 5x, QIAGEN, Cat. 239901) y 20 µL del producto de PCR. Los resultados se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) usando un fotodocumentador.

Posteriormente, se realizó una PCR interna usando los oligonucleótidos reportados por Su *et al.* (2010), que amplifican una región de 344 pb (Cuadro 5). De ésta última PCR se hicieron dos ensayos utilizando 1.5 µL y 3.0 µL de la dilución 1:2 del producto de la primera PCR punto final (Anexo 5). Como controles positivo y negativo se emplearon la cepa RH y agua inyectable, respectivamente. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 mg/1 mL, Invitrogen) en amortiguador TBE 1X, como se mencionó previamente.

Cuadro 5. Oligonucleótidos para la PCR semianidada del gen *GRA6*

Oligonucleótido	*Tm	Producto	Referencia
Int-F: 5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT-3'	55 °C	854 pb	Su <i>et al.</i> , 2010
Seq2-R:5'-TACAAGACATAGAGTGCCCC-3'			Fazaeli <i>et al.</i> , 2000
Int-F: 5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT-3'	60 °C	344 pb	Su <i>et al.</i> , 2010
Int-R: 5'-TCGCCGAAGAGTTGACATAG-3'			

*Temperatura de alineamiento

5.4.4. PCR-RFLP del gen *GRA6*

El producto de la PCR interna en la que se utilizaron 1.5 µL de la dilución 1:2 de la PCR externa del gen *GRA6* fue digerido con la enzima de restricción *MseI*, que reconoce y corta la secuencia TTAA (Anexo 5). Las cepas de referencia de *T.*

gondii, RH (tipo I), ME49 (tipo II) y VEG (tipo III) se emplearon como controles positivos del ensayo. Los fragmentos de restricción fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL, Invitrogen) y visualizados con luz ultravioleta.

5.4.5. Secuenciación de GRA6 y análisis

Los productos de la PCR interna en la que se utilizaron 3.0 µL de la dilución 1:2 de la PCR externa del gen *GRA6* se enviaron al Instituto de Biología de la UNAM para su purificación y secuenciación en ambos sentidos. Brevemente, el procedimiento que utilizaron en dicho Instituto para purificar las muestras fue mediante un estuche comercial ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific Inc.). Para preparar las reacciones de secuencia se usó el estuche comercial BigDye™ Terminator. Los mismos oligonucleótidos que se emplearon en la amplificación de la PCR interna se usaron para las reacciones de secuenciación. Las condiciones de amplificación fueron: 30 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos y 60 °C por 4 minutos. Los productos se purificaron con placas CENTRI-SEP con Sephadex y se corrieron en un secuenciador 3730xl (Applied Biosystems, Cat. 3730XL) utilizando el método de Sanger.

Los electroferogramas fueron analizados usando el programa SnapGene® Viewer 4.1.1 y el alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó con el programa CLC Sequence Viewer 7.8.1. En la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) se obtuvieron las secuencias de nucleótidos del gen *GRA6* de las cepas de *T. gondii*: RH (AF239283.1), GT1 (JX044183.1), ME49 (AF239285.1), VEG (JX044209.1), TgCatPr09 (KU599025.1). La confirmación de cada una de las secuencias (sentido-antisentido) se realizó usando la herramienta “Nucleotide BLAST” de la página web PubMed y se corroboró que tuvieran entre 98 a 100% de identidad con secuencias de *GRA6* de *T. gondii*. Se seleccionó la parte de la secuencia que cumplía con un valor de calidad (Q) ≥ 30, que indica que la probabilidad de una base incorrecta es 1/1000 con una exactitud de la secuencia de 99.9% y usando las secuencias sentido y antisentido,

se acopló una sola secuencia que fue utilizada para el alineamiento con el resto de las secuencias de *T. gondii* obtenidas a partir de tejidos de borregos, así como de cepas de referencia.

5.4.6. Clonación del fragmento de GRA6 (344 pb) y purificación de plásmido

Las muestras que tenían un doble pico en los sitios polimórficos sugerente de infección múltiple, se analizaron nuevamente mediante una PCR interna de *GRA6*, se cortó la banda de 344 pb en el gel de agarosa y se purificó con el estuche comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research, Cat. D4008, Anexo 5). Ese producto se insertó en el plásmido de clonación pJET1.2/blunt usando el estuche comercial CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific, Cat. K1232, Anexo 5). Se usaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa TOP10 químicamente competentes para realizar la transformación química; se dejaron en recuperación en 1.0 mL de caldo Luria Bertani (LB) durante 1 hora a 37° C en agitación (600 rpm) y posteriormente se cultivaron en un agar LB con ampicilina durante toda la noche a 37° C. Se seleccionaron 20 colonias aisladas, las cuales fueron cultivadas en agar LB con ampicilina y las primeras diez colonias se sembraron en caldo LB con ampicilina, se dejaron a 37° C durante toda la noche en agitación leve. Se realizó una PCR de colonia usando los oligonucleótidos Int-F e Int-R para el marcador *GRA6* (344 pb) de *T. gondii* (Anexo 5); como controles positivos se usaron las cepas de referencia RH, ME49 y VEG y el control negativo fue agua inyectable. Las colonias en las que se observó una banda aproximada de 344 pb se sometieron a PCR-RFLP, empleando la enzima *MseI* para *GRA6* (Anexo 5). Con base en los resultados de la PCR-RFLP, se seleccionaron las colonias para realizar la purificación del plásmido, mediante el estuche comercial GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, Cat. K0503). Las muestras de plásmido fueron cuantificadas por espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) y se enviaron al Instituto de Biología de la UNAM para su secuenciación en ambos sentidos. Los electroferogramas fueron analizados usando el programa SnapGene®

Viewer 4.1.1 y el alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó con el programa CLC Sequence Viewer 7.8.1.

5.4.7. ELISA indirecto

Los sueros de los borregos genotificados del gen *GRA6* fueron evaluados mediante un ELISA indirecto previamente estandarizado (Caballero-Ortega *et al.*, 2008b). Las placas de ELISA (NUNC MaxiSorp™, Invitrogen) fueron incubadas con 2.0 µg/mL de antígeno de extracto crudo de taquizoítos de la cepa RH diluido en 15 mM de amortiguador de carbonatos, pH 9.6, durante toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con solución salina de fosfatos 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 (PBS) adicionado con 0.05% de Tween 20 (PBS-T) durante 5 minutos cada lavado. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con 200 µL/pozo de albúmina sérica bovina (Biowest, Francia) al 1.0% en PBS-T y se realizó una incubación a 37 °C durante 30 minutos. Se repitió el proceso de lavado. Se colocaron 100 µL/pozo de suero (dilución 1:500 en PBS-T) y se incubaron por 2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron como se mencionó y se incubaron con 100 µL/pozo de conjugado anti-IgG de borrego ligado a peroxidasa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU., producto A3415) a una dilución 1:4000 en PBS-T durante 2 horas a 37 °C. Se repitió el proceso de lavado (3 veces con PBS-T y 2 veces con PBS). La reacción se reveló al adicionar 100 µL/pozo de la solución de cromógeno/sustrato (5 mL de ácido cítrico 0.1 M, 5 mL de citrato de sodio 0.1 M, 5 mg de *o*-Fenilendiamina (Sigma-Aldrich) y 5 µL de peróxido de hidrógeno al 30%). Las placas se incubaron en la oscuridad y la reacción se detuvo con 50 µL/pozo de ácido sulfúrico 1N. La absorbancia se midió a 490 nm mediante el lector multimodo Modulus™ II Microplate (Turner BioSystems, Inc., Sunnyvale, CA, EE. UU.). El punto de corte se obtuvo calculando el promedio de 3 sueros negativos por duplicado más tres veces su desviación estándar. El índice de reactividad (IR) se estableció al dividir el promedio de la absorbancia de cada suero entre el punto de corte. Las muestras con un IR > 1.1 fueron consideradas positivas, entre 1.0 – 1.1 fueron indeterminadas y con un IR < 1.0, negativas.

5.4.8. Western blot

Con la finalidad de seleccionar controles negativos para los ensayos de serotipificación, se analizaron 14 sueros de borregos (sueros B1-B14) que previamente habían sido diagnosticados como negativos por ELISA indirecto (extracto crudo) y PCR tiempo real del gen *B1* de *T. gondii*. Se siguió el protocolo reportado por Caballero-Ortega *et al.* (2008b), con algunas modificaciones. Se realizó la electroforesis de 2×10^6 taquizoítos de la cepa RH en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que fue bloqueada con leche descremada al 2% en PBS durante 1 hora y lavada tres veces con PBS-T al 0.05%. Las tiras de nitrocelulosa fueron incubadas toda la noche a 4 °C con muestras de suero diluidas 1:50 en PBS-T. Después de tres lavados con PBS-T, se colocó el conjugado anti-IgG de borrego ligado a peroxidasa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU., producto A3415) a una dilución de 1:500 en PBS-T durante 2 horas a 37 °C. Los inmunocomplejos fueron detectados usando 30 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich) en 5 mL de metanol adicionado a 5 mL de PBS con 50 µL de peróxido de hidrógeno al 30%; la reacción se detuvo con agua destilada. Las muestras se consideraron positivas cuando se detectaron al menos tres bandas en la tira de nitrocelulosa.

5.4.9. Serotipificación con péptidos de GRA6

Para identificar las cepas clásicas del parásito se utilizaron tres péptidos diseñados *in silico* (GRA6-I, GRA6-II, GRA6-III); para esto se eliminó una secuencia conservada de 5 aminoácidos entre las cepas I y III (Cuadro 6; Figura 6; cortesía de Lizbeth Xicoténcatl-García, artículo sometido a revisión). Las placas de ELISA (Nunc Immobilizer Amino, Thermo Scientific Inc.) fueron incubadas con un péptido a una concentración de 10 µg/mL en amortiguador de carbonatos, pH 9.6, durante toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con solución salina de fosfatos 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 (PBS) adicionado con 0.05% de Tween 20 (PBS-T) durante 5 minutos cada lavado. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con 200 µL/pozo de albúmina sérica bovina (Biowest, Francia) al 3% en

PBS-T y se incubó 1 hora a 37 °C. Se repitió el proceso de lavado. Se colocaron 100 µL/pozo de suero (dilución 1:100 en PBS-T) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron como se mencionó y se incubaron con 100 µL/pozo de conjugado peroxidasa anti-IgG de borrego (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU., producto A3415) a una dilución 1:1000 en PBS-T durante 2 horas a 37 °C. Nuevamente, las placas se lavaron (3 lavados con PBS-T y 2 lavados con PBS) y la reacción se reveló al adicionar 100 µL/pozo de la solución de cromógeno/sustrato descrita previamente. Las placas se incubaron en la oscuridad y la reacción se detuvo con 50 µL/pozo de ácido sulfúrico 1N. La absorbancia se midió a 490 nm mediante el lector multimodo Modulus™ II Microplate (Turner BioSystems, Inc., Sunnyvale, CA, EE. UU.). El punto de corte se obtuvo calculando el promedio de 3 sueros negativos por duplicado más tres veces su desviación estándar. El índice de reactividad (IR) se estableció al dividir el promedio de la absorbancia de cada suero entre el punto de corte. Las muestras con un IR > 1.1 fueron consideradas positivas, entre 1.0 – 1.1 fueron indeterminadas y con un IR < 1.0, negativas.

Cuadro 6. Secuencias de péptidos de GRA6 de *Toxoplasma gondii**

Péptido	Secuencia del péptido y posición de aminoácidos		
	177-190	Linker	198-230
GRA6-I	CRSPQEPSGDGGND	<u>GGSGGGSGSG</u> NGNEGR - - - -	GEGGAEDDRRPLHPERVNVFDY
GRA6-III	CRSPPEPSGDGGND	<u>GGSGGGSGSG</u> NRGNEGR - - - -	GEGGEDDRRALHPERVNVFDY
	177-190		202-224
GRA6-II	CRSPQEPSGGGND	<u>GGSGGGSGSG</u> NGNEGR - - - -	GEGG -EDDRRPLHPGSVNEFDY

Los aminoácidos en color verde son polimórficos.

*Cortesía de Lizbeth Xicoténcatl-García, artículo sometido a revisión.



Figura 7. Modelos tridimensionales de péptidos de GRA6 I, II y III. Los extremos NH + y COO – se representan en azul y rojo, respectivamente. Las partes de color naranja corresponden a los péptidos de unión, las zonas verdes son aminoácidos polimórficos y el gris representa regiones conservadas entre los péptidos. Cortesía de Lizbeth Xicoténcatl-García, artículo sometido a revisión.

5.5. Análisis estadístico

Se estableció el porcentaje de concordancia entre los resultados de la serotipificación y la genotipificación del gen *GRA6* de *T. gondii*.

6. Resultados

6.1. PCR en tiempo real

Se probaron 26 muestras de DNA extraídas de tejidos de borregos (Cuadro 7) para la detección de *T. gondii* mediante ensayos semicuantitativos por PCR en tiempo real, usando el marcador *B1*; de éstas, nueve fueron positivas y tres dudosas (Figura 8). En el resto de las muestras se inhibió el control interno de la PCR.

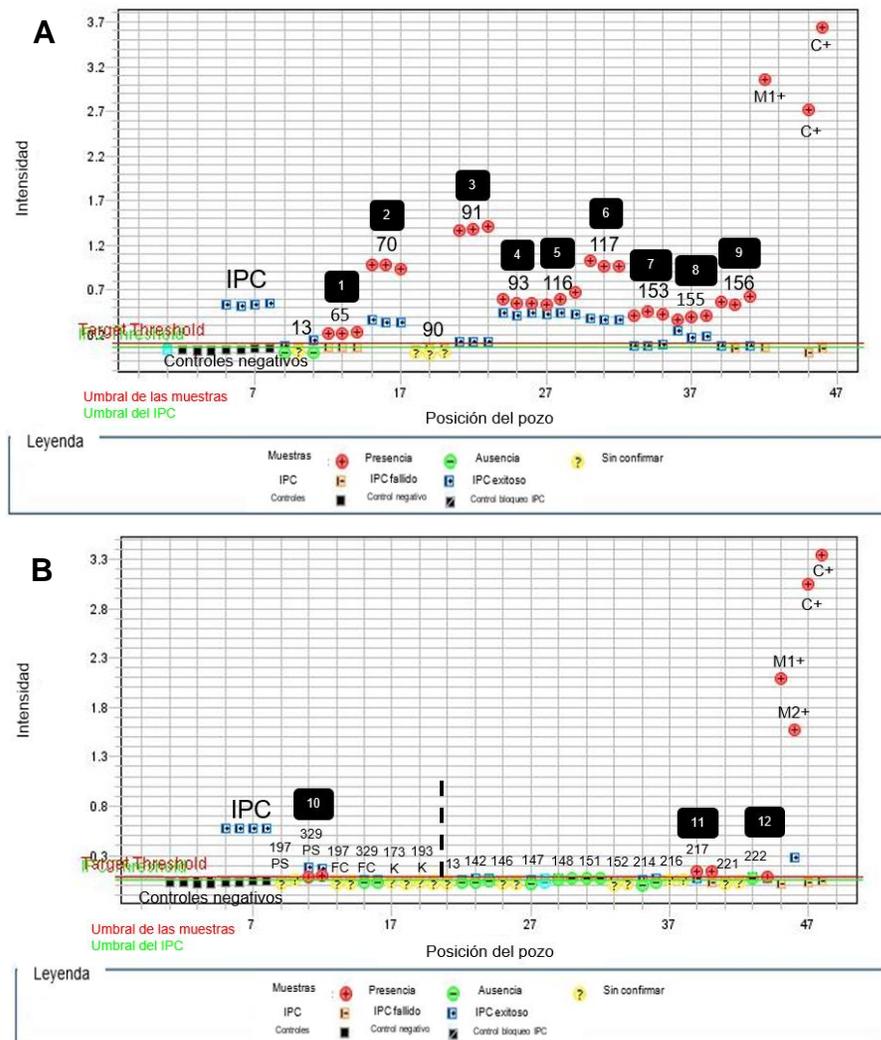


Figura 8. PCR en tiempo real para la detección del gen *B1* de *Toxoplasma gondii* en tejidos de borregos. Cuadros negros: muestras positivas 1 a 9 (A) y dudosas 10 a 12 (B). IPC: control interno de la PCR; M1+ y M2+: tejido de pulmón de ratón infectado con 5×10^5 y 5×10^3 taquizoítos/10 mg de tejido, respectivamente; C+: cepa RH. PS: precipitación salina; FC: fenol: cloroformo: alcohol isoamílico; K: estuche comercial Gentra Puregene.

Cuadro 7. Banco de muestras biológicas de borregos empleadas en el estudio

ID	*Método extracción	Concentración de quistes	260/280 (1.80-2.00)	260/230 (2.00-2.20)	ng/μL	**qPCR (gen B1)	ID GRA6
1	1	No	1.66	2.94	91.0	-	
	2	Sí	1.97	2.14	214.0	-	
2	1	No	1.74	1.59	1717.6	+	1
3	1	No	2.07	3.81	69.6	+	2
4	1	No	1.45	0.69	119.7	-	
5	1	No	1.68	1.05	23.7	+	3
6	1	No	2.08	2.07	108.1	+	4
7	1	No	2.09	2.31	153.0	+	5
8	1	No	1.95	1.99	51.0	+	6
9	1	No	2.01	3.16	90.1	+	7
10	1	No	2.08	2.24	144.0	+	8
11	1	No	2.13	4.02	40.4	+	9
12	1	Sí	1.89	2.18	66.4	-	
13	1	Sí	1.86	1.7	20.1	-	
14	2	Sí	1.93	2.44	113.7	-	
	3	Sí	1.93	2.31	38.8	-	
15	2	Sí	1.83	2.49	56.7	-	
	3	Sí	1.64	2.37	16.8	Dudoso	10
16	2	Sí	1.81	2.19	30.8	-	
17	2	Sí	1.78	2.12	25.4	-	
18	2	Sí	1.87	2.25	69.9	-	
19	2	Sí	1.89	2.06	97.7	-	
20	2	Sí	1.88	2.3	71.7	-	
21	2	Sí	1.67	2.14	19.3	-	
22	2	Sí	1.59	2.03	23.8	-	
23	2	Sí	1.77	2.24	30.9	-	
24	2	Sí	1.78	2.31	28.9	Dudoso	11
25	2	Sí	1.81	2.32	70.8	-	
26	2	Sí	1.74	2.21	33.3	Dudoso	12

*1. Estuche comercial Gentra Puregene Tissue Kit; 2. Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico; 3. Precipitación salina.

** Dudoso: cuando solo una de las repeticiones era positiva o todas las repeticiones fueron positivas, pero estaban cerca del umbral de detección del ensayo.

6.2. PCR semianidada del gen *GRA6*

Después de realizar la PCR externa de *GRA6* (854 pb), no se observó ningún producto del tamaño esperado (Figura 9). Sin embargo, a partir de los productos de amplificación de este ensayo, se realizó una PCR semianidada utilizando 1.5 µL de la dilución 1:2 del producto de la PCR externa, dando como resultado que en 10/12 muestras se visualizara una banda de aproximadamente 344 pb (Figura 10A; Cuadro 8). El ensayo se repitió usando el doble de volumen de la dilución 1:2, mejorando la intensidad de la banda de 344 pb (Figura 10B).

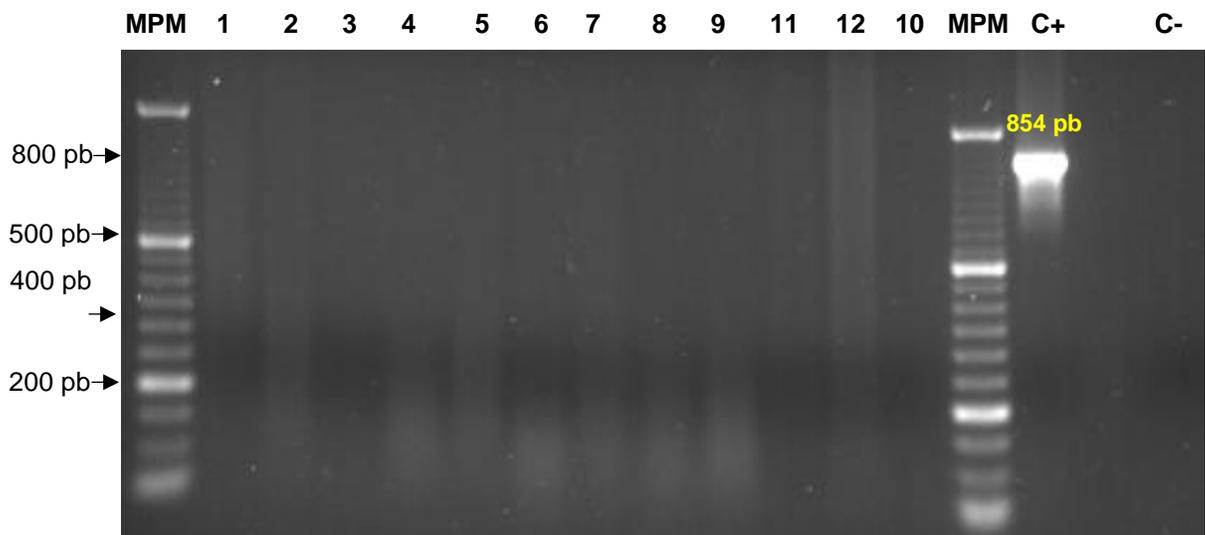


Figura 9. PCR externa (854 pb) del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii*. MPM: marcador de peso molecular 50 bp, Qiagen, Cat. 239901. 1-12: DNA de tejido de borregos (500 ng); C+: control positivo (cepa RH); C-: control negativo (agua inyectable). Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL).

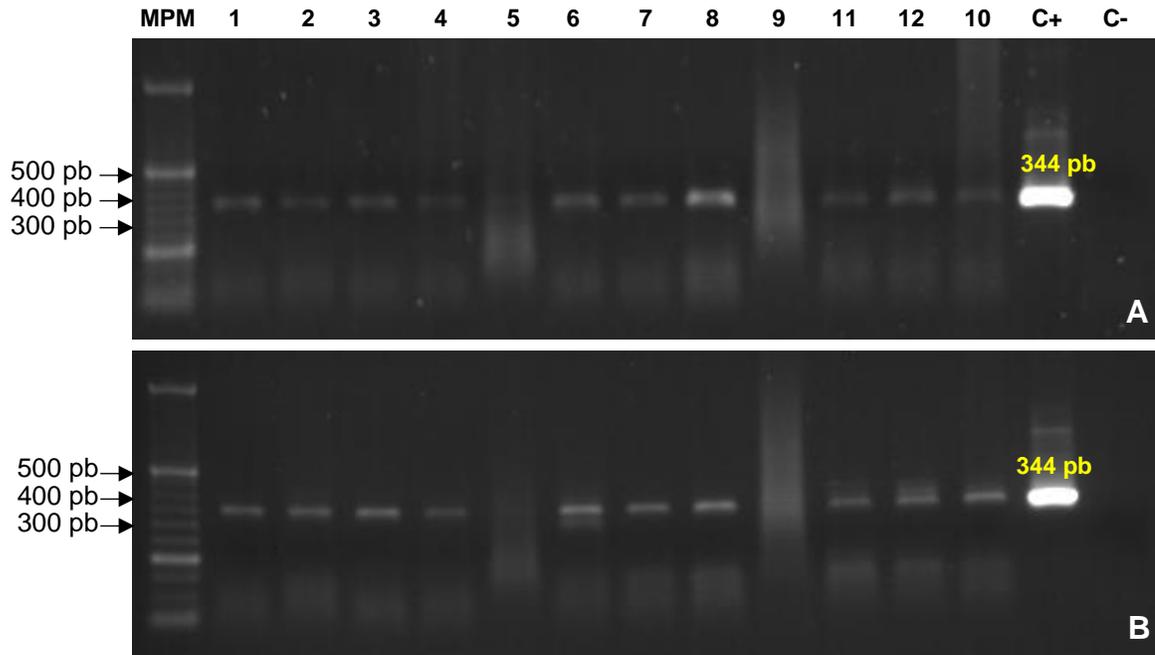


Figura 10. PCR semianidada interna para el gen *GRA6* (344 pb) de *Toxoplasma gondii* en músculo cardíaco y estriado de borregos; (A) y (B) 1.5 µl y 3.0 µl de la dilución 1:2 del producto de la PCR externa, respectivamente. MPM: marcador de peso molecular 50 bp, QIAGEN, Cat. 239901. 1-12: DNA de tejidos de borregos; C+: control positivo (reamplificación cepa RH); C-: control negativo (agua inyectable). Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL).

6.3. PCR-RFLP del gen *GRA6*

Las muestras 5 y 9 quedaron fuera de este ensayo al no haber producto de amplificación. Al llevar a cabo la digestión de la banda en las 10 muestras restantes, se observaron patrones sugerentes de los genotipos II y III, con algunas bandas adicionales (Figura 11). Debido a que no se logró determinar el genotipo mediante esta técnica, las bandas se enviaron a secuenciar.

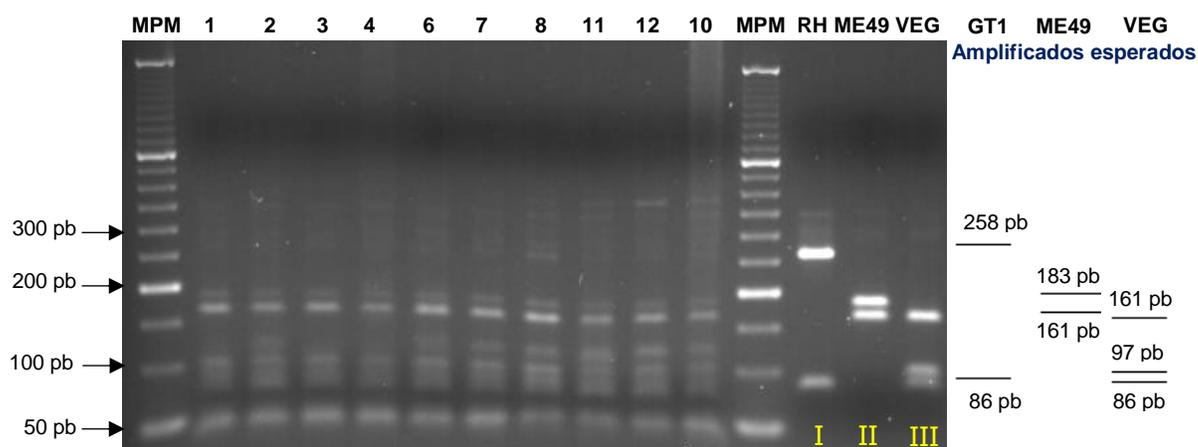


Figura 11. PCR-RFLP del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* en músculo cardiaco y estriado de borregos, con la enzima *MseI*. MPM: marcador de peso molecular 50 bp, QIAGEN, Cat. 239901. 1-12: DNA de tejidos de borregos; I: cepa RH; II: cepa ME49; III: cepa VEG. A la derecha del gel: patrón de referencia obtenido con el programa NEBcutter V2.0. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL).

Cuadro 8. DNA de borregos probados mediante qPCR y PCR punto final para la detección de *GRA6* de *Toxoplasma gondii*

ID	qPCR (gen <i>B1</i>)	PCR punto final (gen <i>GRA6</i>)
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	-
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	-
10	Dudoso	+
11	Dudoso	+
12	Dudoso	+

6.4. Análisis de las secuencias del gen *GRA6*

Mediante la secuenciación se observó que en el primer sitio de restricción de la enzima *MseI* se observó que las secuencias de *T. gondii* obtenidas de los tejidos de borregos tenían un patrón de corte igual al de las cepas II o III y en el segundo sitio de restricción, mostraban identidad con las cepas I o III, por lo que se consideraron iguales a la secuencia de la cepa III (VEG) con excepción de dos polimorfismos (Figura 12).

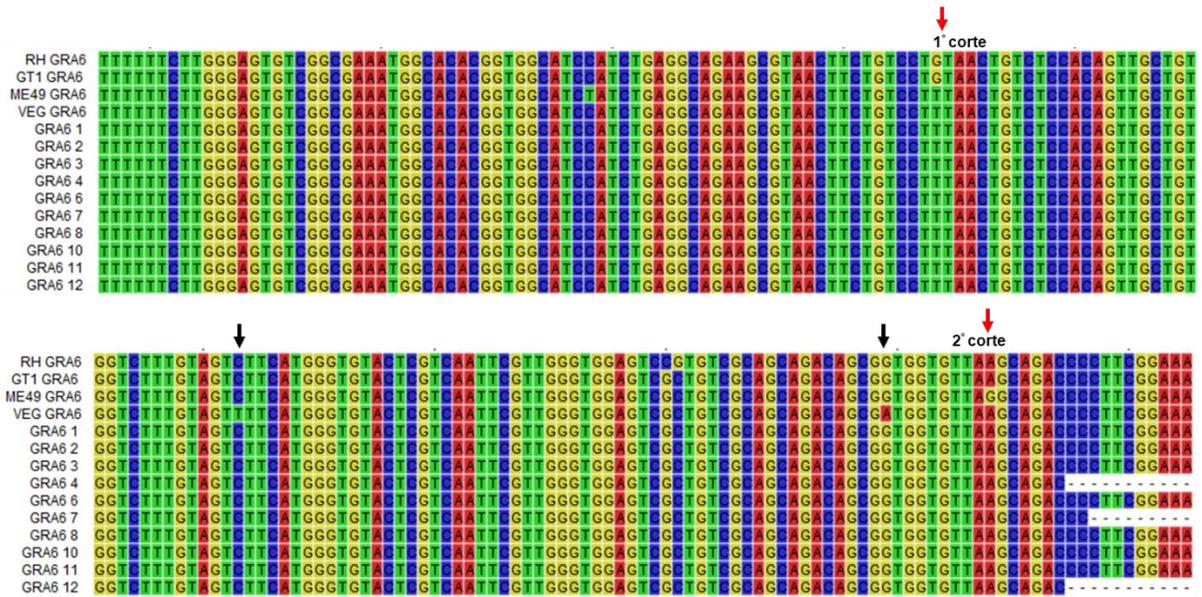


Figura 12. Alineamiento de las secuencias del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* (GRA6 1 a GRA6 12) con las cepas de referencia (RH, GT1, ME49, VEG). Se muestran los 2 sitios de restricción de la enzima *MseI* (flechas rojas). Los polimorfismos de la secuencia de la cepa VEG (tipo III) se señalan con flechas negras.

Para determinar a qué genotipo correspondían, se realizó un alineamiento con más secuencias de cepas III y se comprobó que las secuencias de los parásitos presentes en los tejidos de los borregos tienen semejanza con la secuencia de *GRA6* obtenida en un aislamiento a partir de un gato de la isla Mona de Puerto Rico (TgCatPr09; Figura 13) (Dubey *et al.*, 2007b).

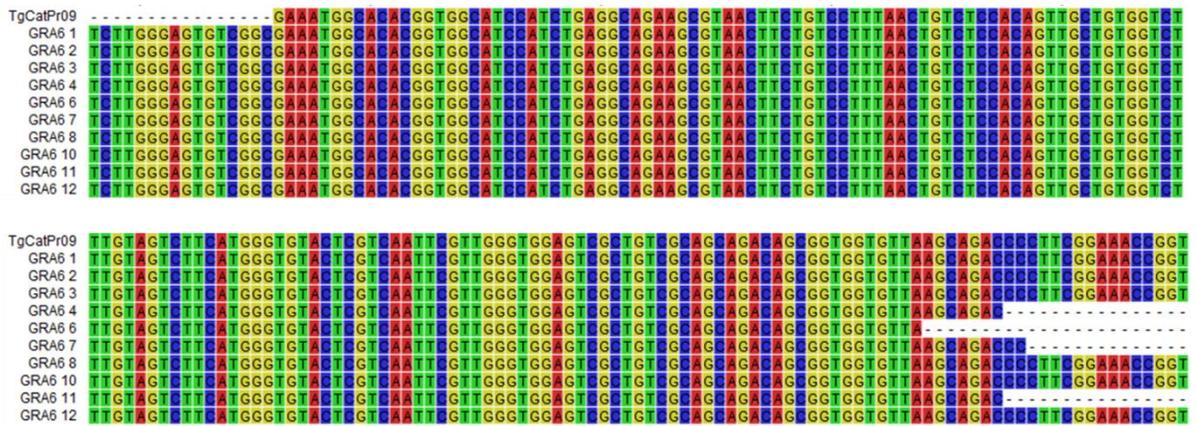


Figura 13. Alineamiento de las secuencias del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* (GRA6 1 a GRA6 12) con la cepa TgCatPr09 (*GRA6* tipo III).

Con el objetivo de identificar infecciones mixtas, los electroferogramas fueron analizados en los dos sitios polimórficos. La mayoría de las muestras presentaban un pico definido en ambos sitios tanto en las secuencias sentido como antisentido (Figura 14).

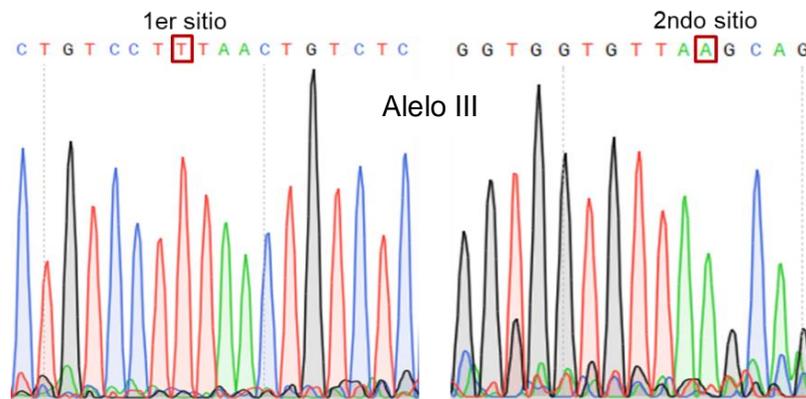


Figura 14. Sitios polimórficos del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii*. Secuencia de DNA igual a la del alelo III, tanto en la secuencia sentido como antisentido.

Solamente dos muestras (No. 2 y 11) presentaron dos picos en un mismo sitio sugerentes de infección doble con un alelo II en la secuencia sentido (Figura 15).

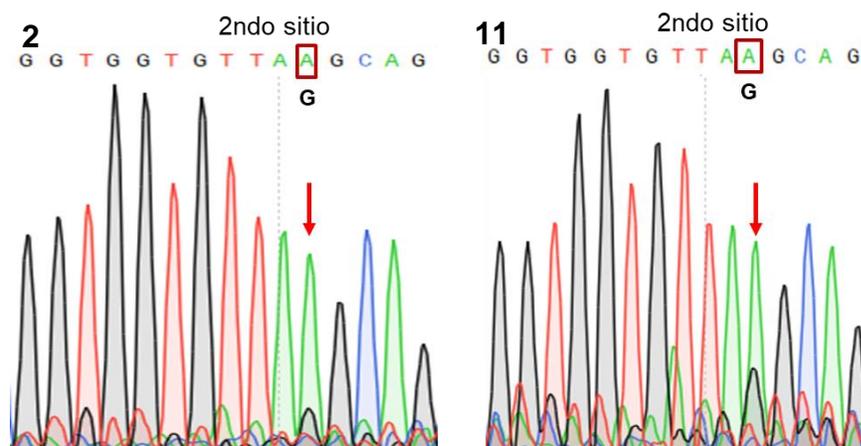


Figura 15. Secuencias del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* sugerentes de infección mixta. Se observa un doble pico en el sitio polimórfico (flecha roja) de los borregos 2 y 11.

6.5. Verificación de la infección doble por clonación y secuenciación

Mediante la PCR de colonia y PCR-RFLP del fragmento de *GRA6* de 344 pb se identificó la presencia de genotipos II y III de *T. gondii* (borregos 2 y 11, Figuras 16 y 17), los cuales se enviaron a secuenciar.

El análisis de los sitios de restricción de la enzima *MseI* en el alineamiento de las secuencias de *GRA6* evidenció el genotipo III (TgBo2.1 y TgBo2.2) y el genotipo II (TgBo2.3) en el borrego 2; mientras que en el borrego 11, las secuencias TgBo11.1 y TgBo11.3 fueron III, y la secuencia TgBo11.2 fue II (Figura 18).

Las cuatro secuencias III fueron semejantes a la cepa VEG (III clásica) con excepción de dos polimorfismos, los cuales coinciden con los de la cepa TgCatPr09 (Figura 19). Las secuencias TgBo2.3 y TgBo11.2 fueron similares a la cepa ME49 (II clásica) excepto por uno y dos polimorfismos, respectivamente (Figura 20).

En los electroferogramas se analizaron los sitios polimórficos de restricción de la enzima *MseI*. En el segundo sitio de restricción, las cepas II se distinguen de las cepas III por la substitución de una adenina por una guanina (Figura 21).

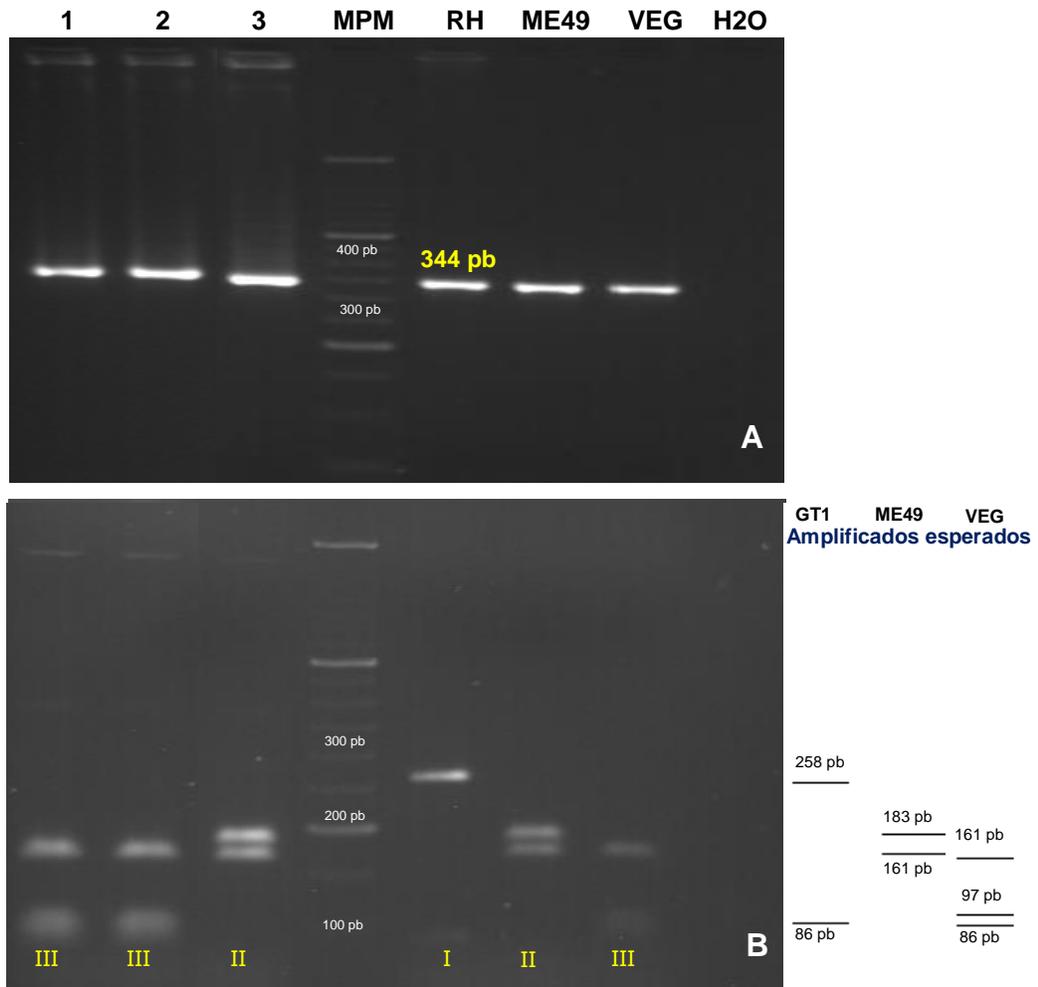


Figura 16. PCR (A) y RFLP (B) del gen *GRA6* (344pb) de *Toxoplasma gondii* del borrego 2. Carriles 1-3: plásmido purificado. MPM: marcador de peso molecular 50 bp. RH, ME49 y VEG: cepas de referencia de *T. gondii*, tipo I, II y III, respectivamente. (B) Digestión de los plásmidos respectivos de la imagen A con patrones de corte correspondientes a los genotipos II y III. A la derecha del gel se muestra el patrón de referencia obtenido con el programa NEBcutter V2.0. Gel de agarosa al 3.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL).

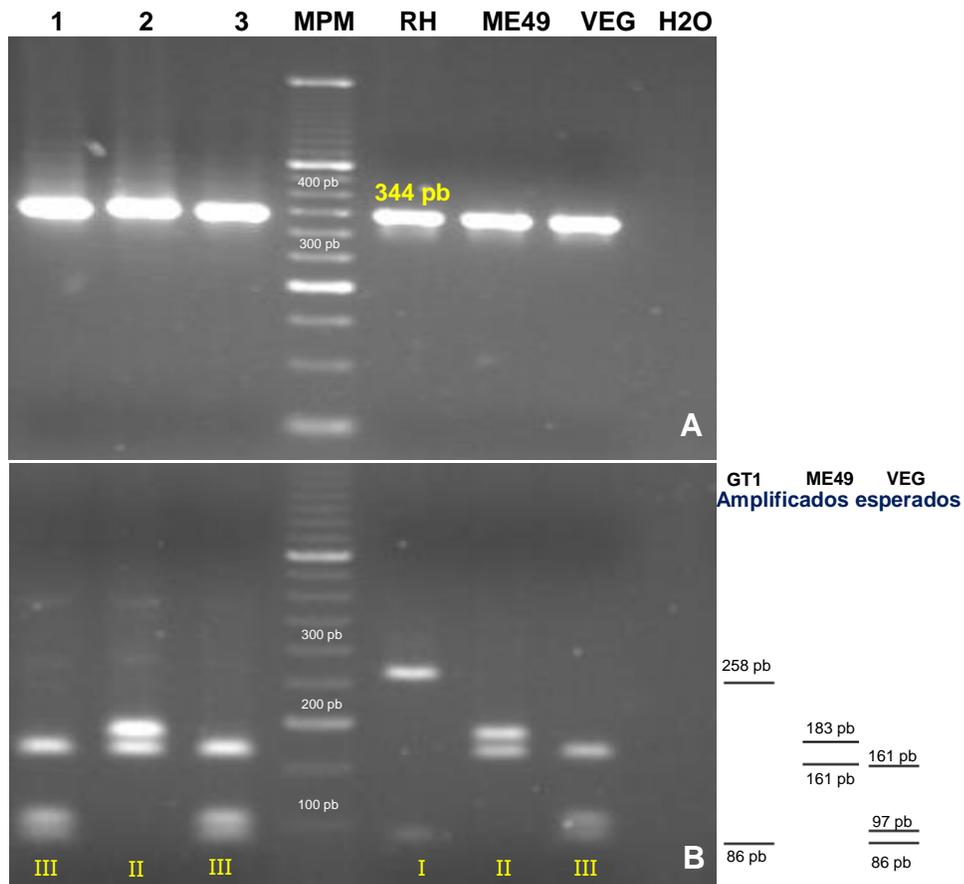


Figura 17. PCR (A) y RFLP (B) del gen *GRA6* (344pb) de *Toxoplasma gondii* del borrego 11. Carriles 1-3: plásmido purificado. MPM: marcador de peso molecular 50 bp. RH, ME49 y VEG: cepas de referencia de *T. gondii*, tipo I, II y III, respectivamente. (B) Digestión de los plásmidos respectivos de la imagen A con patrones de corte correspondientes a los genotipos II y III. A la derecha del gel se muestra el patrón de referencia obtenido con el programa NEBcutter V2.0. Gel de agarosa al 3.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL).

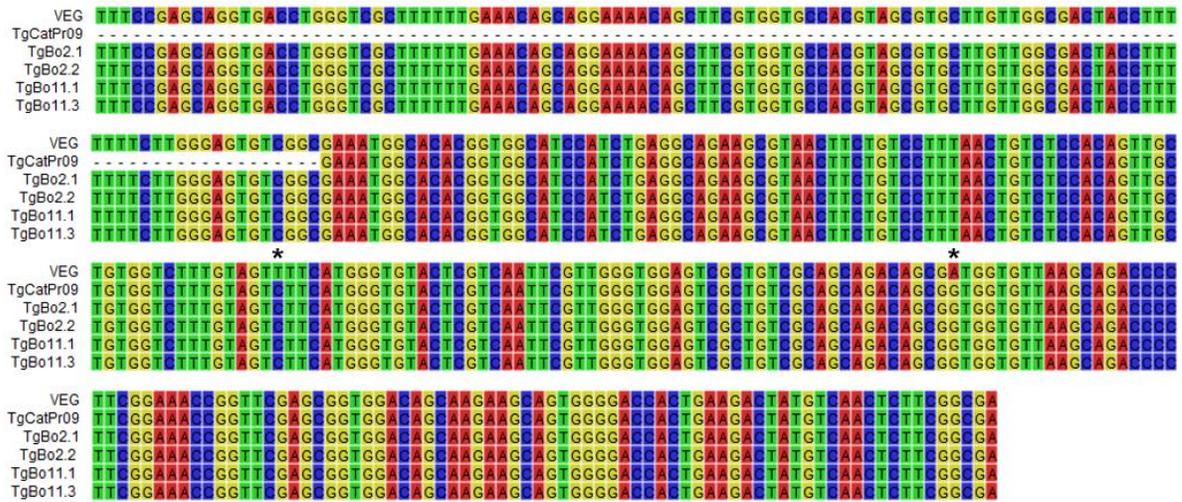


Figura 19. Alineamiento de las secuencias del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* de los borregos 2 y 11 con las cepas VEG y TgCatPr09 (*GRA6* tipo III). Los polimorfismos diferentes a los de la cepa VEG se encuentran señalados con asterisco (*).

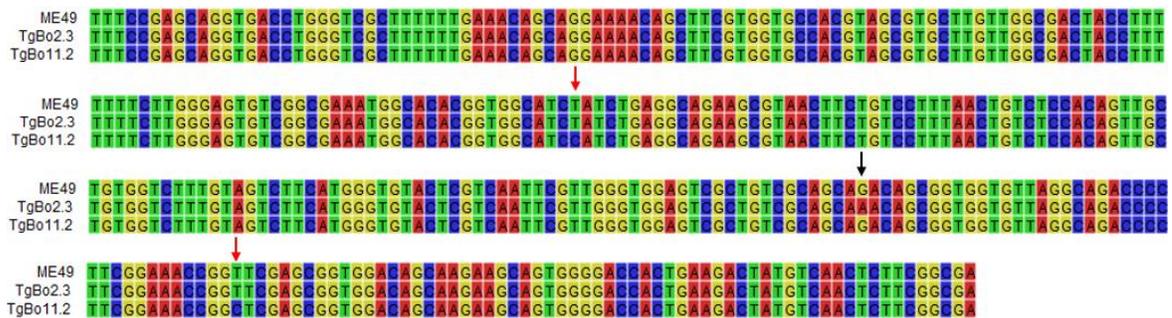


Figura 20. Alineamiento de las secuencias del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* de los borregos 2 y 11 con la cepa ME49 (*GRA6* tipo II). Los polimorfismos diferentes a los de la cepa ME49 se indican con flechas, en negro para el borrego 2 (TgBo2.3) y en rojo para el borrego 11 (TgBo11.2).

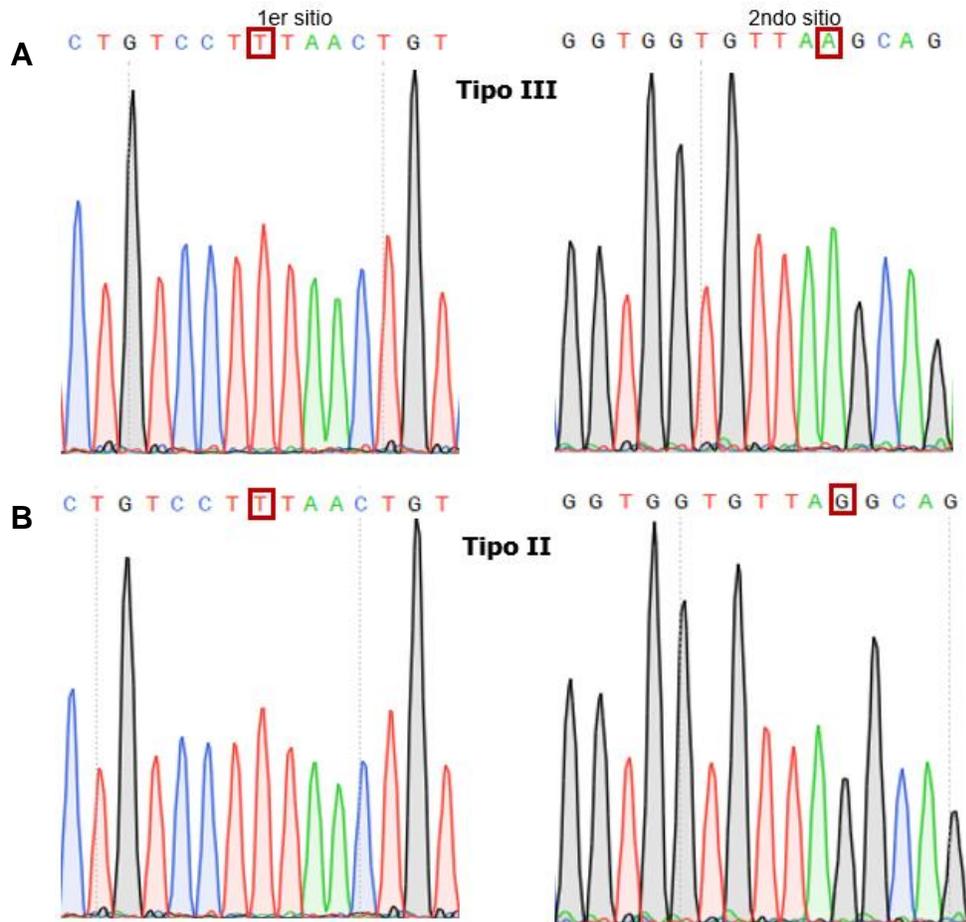


Figura 21. Polimorfismos en los sitios de restricción de la enzima *MseI* en la secuencia del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii*. A. Secuencia de DNA del alelo III; B. Secuencia de DNA del alelo II.

6.6. Western blot

Para obtener sueros negativos a la infección por *T. gondii* y emplearlos en los ensayos de serotipificación con los sueros de muestras previamente genotipificadas, se analizaron 14 sueros de borregos, de los cuales cinco resultaron negativos (B4, B6, B8, B13, B14; Figura 22). De éstos, se seleccionaron los sueros B4, B6 y B14 como controles negativos para los ensayos de serotipificación ya que fueron negativos a *T. gondii* por tres técnicas diagnósticas (ELISA indirecto, qPCR y western blot).

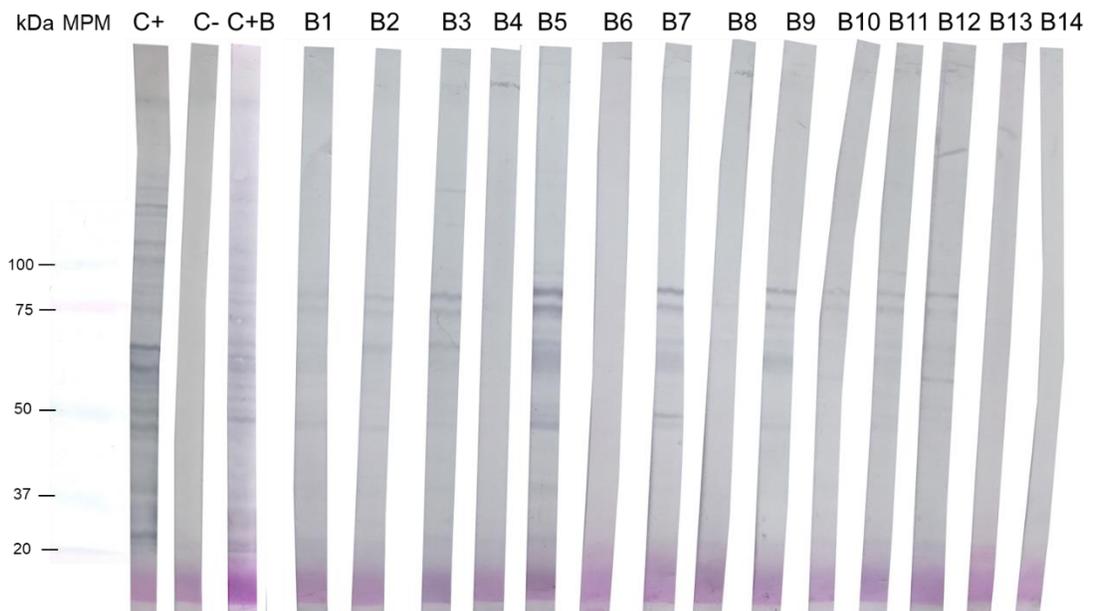


Figura 22. Detección de sueros de borregos negativos a *Toxoplasma gondii* por western blot. MPM: marcador de peso molecular 10-250 kDa, Bio-Rad, Cat. 1610375. Control positivo (C+) y negativo (C-) de humanos. C+B: control positivo de borrego. Sueros de borregos, dilución 1:50 (B1 a B14).

6.7. Serotipificación usando péptidos de GRA6

Siete sueros reaccionaron con más de un péptido, de los cuales seis presentaron un serotipo I/II/III y uno tuvo el serotipo I/II. El serotipo II se determinó en un suero, el cual reaccionó únicamente con el péptido GRA6-II, mientras que dos sueros no reaccionaron con ningún péptido y fueron categorizados dentro del serotipo no reactivo (Cuadro 9; Figura 23). Como ya se mencionó, en las 10 muestras caracterizadas se determinó el genotipo III y en dos de ellas se demostró infección mixta con los genotipos II+III (Cuadro 9).

6.8. Concordancia entre la genotipificación y serotipificación de GRA6

Seis de diez sueros (60%) presentaron concordancia parcial entre el genotipo y el serotipo III. Considerando solamente las muestras que reaccionaron (6/8), se obtendría una concordancia parcial del 75% (Cuadro 9).

Cuadro 9. Serotipo y genotipo de *GRA6* de *Toxoplasma gondii* encontrado en diez borregos del Estado de Colima

ID	ELISA Extracto crudo	Índice de reactividad			Serotipo	Genotipo
		GRA6-I	GRA6-II	GRA6-III		
1	4.64	1.52	1.25	1.10	I/II/III	III
2	1.74	3.32	1.76	2.76	I/II/III	II + III
3	0.80	0.65	0.54	0.55	No reactivo	III
4	1.19	1.50	1.17	1.15	I/II/III	III
6	1.43	1.28	1.41	1.32	I/II/III	III
7	1.09	0.81	0.61	0.73	No reactivo	III
8	0.95	0.80	1.42	0.72	II	III
10	4.48	2.38	3.30	3.16	I/II/III	III
11	1.89	2.11	3.04	1.54	I/II/III	II + III
12	0.72	1.62	1.89	0.86	I/II	III

Positivo = IR > 1.10; Dudoso = IR ≥ 1.00 – 1.10; Negativo = IR < 1.00

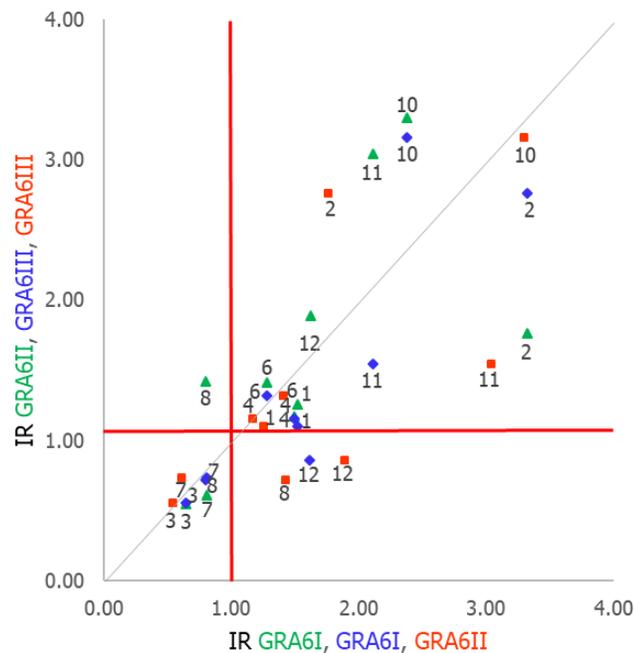


Figura 23. Correlación de los índices de reactividad (IR) entre los distintos péptidos de *GRA6* (*GRA6-I*, *GRA6-II*, *GRA6-III*). Las líneas rojas indican el punto de corte (IR mayor a 1.10).

7. Discusión

La caracterización genética de *T. gondii* es una línea de investigación que se lleva a cabo en muchas partes del mundo, debido a que el genotipo del parásito puede determinar la presentación clínica de la enfermedad en sus hospedadores. Actualmente se conocen varios genes que están íntimamente relacionados con su virulencia, lo que permite inferir el grado de daño que puede causar en los individuos que infecta (Silva *et al.*, 2014). La genotipificación de este protozooario en ocasiones es difícil de lograr, ya que se requieren cantidades suficientes de DNA del parásito, lo que eventualmente limita su alcance, principalmente en casos clínicos, ya que el material genético del hospedador generalmente se encuentra en mayor proporción que el del agente infeccioso. Por lo anterior, desde hace más de 15 años se comenzaron a probar otras técnicas que permitieran conocer las características genéticas de *T. gondii*. Este es el caso de la serotipificación, un método que permite el reconocimiento de péptidos sintéticos, antigénicos y polimórficos por anticuerpos séricos de hospedadores infectados con *T. gondii*. Sin embargo, existen pocos estudios que establezcan la concordancia entre estas dos técnicas empleando el mismo gen. Por lo anterior, nos propusimos determinar la concordancia entre el serotipo y el genotipo de *GRA6* de *T. gondii* en muestras de borregos del estado de Colima en México.

La detección del DNA del parásito se llevó a cabo mediante una PCR tiempo real, debido a que tiene mayor sensibilidad que la PCR punto final, ya que logra detectar ~1 parásito en la muestra (Costa *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2010). De las 26 muestras probadas por PCR en tiempo real, solo nueve fueron positivas y tres dudosas para la presencia de *T. gondii*. En algunos casos no amplificó el control interno de la PCR que se coloca en el mismo tubo de la muestra, lo que podría indicar la presencia de inhibidores de la reacción. Las muestras de DNA se obtuvieron de corazón y diafragma, tejidos que contienen mioglobina, una molécula que tiene un grupo hemo, considerada como un inhibidor de la DNA polimerasa (Bélec *et al.*, 1998). Durante el proceso de extracción, el DNA también se puede contaminar con sustancias como fenol, cloroformo, isopropanol, etanol, o EDTA,

inhibidores que afectan la sensibilidad de la reacción (Schrader *et al.*, 2012). A pesar de que se empleó una mayor cantidad de tejido (5 g) para la técnica de concentración de quistes tisulares en comparación con el método común de extracción de DNA (200 a 300 mg), no se incrementó la detección del parásito, esto pudo suceder debido a que los tejidos de los borregos llevaban aproximadamente tres años en congelación (- 80°C) y se ha reportado que mantener la carne a -12°C o menos grados por al menos tres días es eficaz para eliminar los quistes tisulares (Dubey, 1988).

En México, se han reportado tres alelos (I, II, III) del gen *GRA6* mediante PCR-RFLP (Dubey *et al.*, 2009; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011c; Dubey *et al.*, 2013; Rico-Torres *et al.*, 2015, 2018). En este estudio, las 12 muestras de DNA (nueve positivas y tres dudosas) fueron sometidas a una PCR semi anidada para la detección de una región del gen *GRA6* (344 pb), resultando 10 positivas. Cabe resaltar que las tres muestras dudosas por PCR en tiempo real fueron positivas para la amplificación de *GRA6*. Los productos de la PCR semi anidada fueron sometidos a una PCR-RFLP de *GRA6* y presentaron una combinación del patrón de genotipos II y III, con algunas bandas extra que pueden deberse a una amplificación inespecífica, existencia de infección mixta (la cual se comprobó en dos muestras) o presencia de alelos atípicos, como se ha reportado con otros marcadores como *SAG1*, alt. *SAG2*, *C22-8*, *C29-2*, *PK1*, *CS3* y *SAG3* (Pena *et al.*, 2013).

En todas las secuencias de *GRA6* de borregos de Colima, se determinó la existencia de dos polimorfismos, que los diferencian de la cepa VEG (tipo III). Las secuencias de este estudio fueron compatibles con la de *GRA6* de la cepa TgCatPr9 reportada previamente por Dubey *et al.* (2007b) y clasificada como III. Esta cepa fue aislada de músculo esquelético de un felino hembra joven de la isla Mona de Puerto Rico. Este aislamiento no fue patogénico para los ratones, su genotipo fue reportado como atípico mediante seis marcadores microsatélites (*TUB2*, *W35*, *TgM-A*, *B18*, *B17*, *M33*) y utilizando 10 marcadores por PCR-RFLP fue determinado como el genotipo ToxoDB #115, que es recombinante con alelos I y III (Dubey *et al.*, 2007b). En México, el alelo III de *GRA6* ya había sido identificado en aislamientos a partir

de tejidos de gato (ToxoDB #155), gallinas (ToxoDB #2) y humanos (genotipo nuevo) (Dubey *et al.*, 2009; Rico-Torres *et al.*, 2018). Por su parte, las secuencias del alelo II de *GRA6* identificadas en dos muestras (TgBo2.3 y TgBo11.2) fueron diferentes entre sí y poseen uno y dos polimorfismos, respectivamente, en comparación con la secuencia de la cepa clásica ME49 (tipo II). Este alelo ha sido reportado en muestras de perro (ToxoDB #74), gato, paloma (ToxoDB #9), puma (ToxoDB #222) y humano (genotipo nuevo) (Dubey *et al.*, 2009; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011c; Dubey *et al.*, 2013; Rico-Torres *et al.*, 2018). En Colima ya se había reportado el alelo I de *GRA6* (ToxoDB #28) a partir de un aislamiento proveniente de tejido de un felino doméstico (Rico-Torres *et al.*, 2015).

De las nueve muestras positivas y tres dudosas por PCR tiempo real, solamente la mitad fueron positivas para anticuerpos IgG anti-*T. gondii* por ELISA indirecto. Kompalic-Cristo *et al.* (2007) establecieron que en las muestras positivas por PCR tiempo real con infección crónica (positivas a IgG), los animales presentaban parasitemia intermitente con baja carga parasitaria. Mientras que un resultado positivo por PCR tiempo real en individuos negativos a IgG e IgM indica que el parásito podría estar circulando en ausencia de anticuerpos, es decir, que los individuos no sean capaces de producir inmunoglobulinas específicas debido a una inmunodeficiencia, esta aparente paradoja también podría estar relacionada con el momento de la infección; en una infección reciente o crónica, la producción de anticuerpos puede ser insuficiente y por lo tanto no se detectan al momento de realizar la prueba serológica (Kompalic-Cristo *et al.*, 2007). Este fenómeno se reportó en borregos, en los cuales se determinó la seroconversión positiva o negativa en sueros obtenidos con meses de diferencia (Caballero-Ortega *et al.*, 2008b).

Los péptidos empleados en este estudio son distintos a los usados en otras investigaciones de serotipificación de *T. gondii*. Con el objetivo de disminuir reacciones cruzadas entre los péptidos GRA6-I y GRA6-III, éstos se rediseñaron, eliminando cinco aminoácidos antigénicos conservados. La modificación causó la pérdida de dos bucles de alfa hélice en la estructura tridimensional del péptido

GRA6-I, lo que podría exponer aminoácidos polimórficos lineales; sin embargo, este cambio no alteró su reactividad global. En el péptido GRA6-III no se alteró el único bucle del carboxilo terminal, pero se obtuvieron índices de reactividad más bajos que con el péptido que contiene la secuencia conservada. Esto generó una mayor diferencia entre los serotipos I y II, pero disminuyó la discriminación entre los péptidos II y III, a pesar de que entre éstos existe el mayor número de residuos polimórficos (Lizbeth Xicoténcatl-García, comunicación personal). Aún con estas modificaciones en los péptidos, se obtuvieron sueros que reaccionaron con más de un péptido en los ensayos de serotipificación. Esto puede deberse a la presencia de infecciones mixtas, como lo sugieren Nowakowska *et al.* (2006); ya que algunos de los sueros de ese estudio reaccionaron con los péptidos de GRA6-II y I/III. Así mismo Sousa *et al.* (2010) observaron que los individuos infectados con una cepa II reaccionaron con el péptido GRA6-II, pero también con los péptidos I y III, lo que indicaría la presencia de una infección mixta que no se detectó mediante bioensayo. En nuestro trabajo se corroboró infección mixta en dos muestras, con alelos II y III de *GRA6*. Incluso en los sueros donde solo se obtuvo la presencia del alelo III, no se puede descartar la probabilidad de infección mixta. Para la extracción de DNA se utiliza solo una fracción muy pequeña del tejido (200 mg) y se ha reportado que en los músculos de animales infectados naturalmente existe un número reducido de quistes tisulares de *T. gondii*, con distribución no homogénea (Robert-Gangneux y Dardé, 2012; Hill y Dubey, 2013), por lo que en diferentes áreas del cuerpo podrían existir genotipos distintos. Las infecciones mixtas con *T. gondii* ya se han reportado en diversas especies, incluyendo a los humanos (Valenzuela-Moreno, 2014; Verma *et al.*, 2017; Rico-Torres *et al.*, 2018).

Por otro lado, un suero puede reaccionar con más de un péptido si el individuo ha sido infectado con cepas atípicas. Sousa *et al.* (2008) encontraron que las secuencias de GRA6 de algunas cepas atípicas difieren en el extremo C-terminal con las cepas clásicas por 1 o 2 aminoácidos y esto puede inducir la producción de anticuerpos que reaccionan con los péptidos II, I/III o una respuesta a ambos. Vaudaux *et al.* (2010) mediante la secuenciación del gen *GRA6* comprobaron la

existencia de un alelo atípico que determinó la combinación de aminoácidos polimórficos de los alelos I y II; el suero de ese individuo reaccionó con ambos péptidos de GRA6 (GRA6-I/III y GRA6-II).

Por otra parte, algunos sueros no reaccionaron con ninguno de los péptidos, lo que puede estar relacionado con la cinética de la IgG y el tiempo transcurrido desde la infección. Como ya se mencionó, al inicio de la infección aguda existe una producción baja de anticuerpos, mientras que en una infección crónica avanzada los títulos de anticuerpos disminuyen hasta un nivel que no es detectado por la técnica serológica (Sousa *et al.*, 2008; Geuthner *et al.*, 2014). Este efecto de la cinética de anticuerpos en la serotipificación de *T. gondii* se ha observado en binomios humanos madre/hijo, ya que en algunos casos solo se logró serotipificar a un miembro del binomio (Lizbeth Xicoténcatl-García, comunicación personal).

La respuesta inmune contra GRA6 es heterogénea y se pueden presentar diferentes perfiles de reactividad contra los péptidos incluso en pacientes infectados con la misma cepa (Sousa *et al.*, 2009). Esto concuerda con lo reportado por Shobab *et al.* (2013), quienes secuenciaron los loci *B1* y *NTS2* de *T. gondii* a partir de humor acuoso de 7 pacientes con toxoplasmosis ocular, determinando la presencia de alelos I, cuyos sueros fueron analizados con péptidos de GRA6 y GRA7. De éstos, 4 pacientes tuvieron el serotipo no reactivo, dos se clasificaron como serotipos atípicos (reacción con más de un péptido) y uno con serotipo II. Sin embargo, es posible que esta discrepancia se deba a que la genotipificación y la serotipificación se hicieron con genes distintos.

En nuestro estudio la concordancia parcial obtenida entre el genotipo y el serotipo de *GRA6* fue del 60% (6/10). Esto pudo ocurrir por los fenómenos discutidos previamente o a que el número de muestras que pudimos analizar por ambas técnicas fue reducido. Es importante agregar que la región secuenciada de *GRA6* se encuentra hacia el extremo 5', mientras que los péptidos fueron diseñados a partir de la secuencia del extremo 3', región que es más polimórfica entre las cepas del parásito. No se logró amplificar la región de *GRA6* que contiene la secuencia con la cual fueron diseñados los péptidos, debido a que uno de los oligonucleótidos,

previamente empleado en muestras de humano, reaccionó con el DNA de los ovinos, generando bandas inespecíficas, de las cuales ninguna correspondía a la esperada para *T. gondii* (Fazaeli *et al.*, 2000).

Cabe destacar que, aunque el tamaño de la muestra fue limitado, se logró la caracterización molecular y serológica del mismo marcador genético, *GRA6*, que es el más empleado para el diseño de péptidos. Nowakowska *et al.* (2006) usaron una PCR-RFLP de 4 marcadores (incluyendo *GRA6*) de muestras de líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo de 19 casos de toxoplasmosis congénitos en humanos de Polonia. De éstos, obtuvieron en 9 casos el genotipo II. En los ensayos de serotipificación emplearon péptidos de *GRA6* y *GRA7*, obteniendo 9 serotipos II, de los cuales 7 coincidían con el genotipo, lo que establece una concordancia entre el genotipo y el serotipo de 77.8% (7/9). En otro estudio se usaron péptidos de *GRA6* y *GRA7* para determinar el serotipo de sueros de cerdos y gallinas, que habían sido genotipificadas mediante cinco marcadores microsatélites y PCR-RFLP del gen *SAG2*, respectivamente. La concordancia entre la genotipificación y la serotipificación fue de 13.3% para los cerdos y 36.4% para las gallinas (Sousa *et al.*, 2010). Nuevamente, los blancos tipificados fueron distintos para las dos técnicas.

Debido a que los animales pueden ser fuentes potenciales de la infección humana por el consumo de quistes tisulares, la detección y caracterización genética de *T. gondii* en carne de animales de producción es importante y se requieren métodos rápidos y eficientes para tal fin (Sousa *et al.*, 2010). La serotipificación tiene sus bondades; entre ellas, que es menos invasiva pues no se requiere la toma de una biopsia y se puede usar en investigaciones a gran escala, con muestras de pacientes o animales sintomáticos y asintomáticos, que generalmente no se logran tipificar mediante los métodos de biología molecular (Peyron *et al.*, 2006). No obstante, esta técnica debe ser refinada para alcanzar un mayor grado de discriminación entre los genotipos de *T. gondii*. Un nuevo análisis bioinformático permitiría diseñar péptidos que contengan un mayor número de aminoácidos polimórficos con menos regiones conservadas y más zonas inmunogénicas.

8. Conclusiones

- El porcentaje de concordancia parcial obtenido entre el serotipo y genotipo del gen *GRA6* de *T. gondii* en muestras de borregos de Colima fue de 60%.
- La secuenciación del gen *GRA6* evidenció la presencia de alelos II y III diferentes a los de las cepas clásicas del parásito y constituye el primer dato de infección mixta en ovinos del estado de Colima.
- La serotipificación es un técnica no invasiva que tiene el potencial de identificar infecciones mixtas por *T. gondii*.

Referencias

- Adjogble KDZ, Mercier C, Dubremetz JF, Hucke C, MacKenzie CR, Cesbron-Delauw MF, Daubener W. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34: 1255-1264.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Tibayrenc M, Dardé ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*. 2002; 32: 27-38.
- Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48: 4641-4645.
- Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews Immunology*. 2005; 5: 162-170.
- Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Herrera-Flores RG, Ramírez-Sánchez BE, González-Herrera A, Martínez-García SA *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2007; 93: 1214-1216.
- Alvarado-Esquivel C, García-Machado C, Alvarado-Esquivel D, González Salazar AM, Briones-Fraire C, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2011a; 97: 616-619.
- Alvarado-Esquivel C, García-Machado C, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Durango State, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2011b;183: 43-46.
- Alvarado-Esquivel C, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OC, Choudhary S, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Villena I, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2011c; 97: 809-812.
- Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Okrucky R, Dubey JP. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2012a; 184: 321-324.
- Alvarado-Esquivel C, Rodríguez-Peña S, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2012b; 98: 944-945.

- Alvarado-Esquivel C, García-Machado C, Alvarado-Esquivel D, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2012c; 98: 271–273.
- Alvarado-Esquivel C, González-Salazar AM, Alvarado-Esquivel D, Ontiveros-Vázquez F, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2012d; 98: 431-432.
- Alvarado-Esquivel C, Estrada-Malacón MA, Reyes-Hernández SO, Pérez-Ramírez JA, Trujillo-López JI, Villena I, Dubey JP. High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2012e; 98: 1248-1250.
- Alvarado-Esquivel C, Estrada-Malacón MA, Reyes-Hernández SO, Pérez-Ramírez JA, Trujillo-López JI, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic sheep in Oaxaca State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2013a; 99: 151-152.
- Alvarado-Esquivel C, Silva-Aguilar D, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Michoacán State, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013b; 112: 433-437.
- Alvarado-Esquivel C, Silva-Aguilar D, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy goats in Michoacán State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2013c; 99: 540-542.
- Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic donkeys (*Equus asinus*) in Durango, Mexico slaughtered for human consumption. *BMC Veterinary Research*. 2015; 11: 1-4.
- Applied Biosystems. About presence/absence experiments. Applied Biosystems StepONE™ and StepOnePlus™ real-time PCR systems getting started guide. 2010; 1:6-9.
- Bastos da Silva I, de Andrade Batista P, Martines R, Takami C, Ribeiro Ferreira I, Vidal J, Pereira-Chiocola V. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*. 2016; 165: 16-21.
- Bélec L, Authier J, Eliezer-Vanerot MC, Piédouillet C, Mohamed AS, Gherardi R. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve*. 1998; 21: 1064-1067.

- Benavides J, Fernández M, Castaño P, Ferreras MC, Ortega-Mora L, Pérez V. Ovine toxoplasmosis : a new-look at its pathogenesis. *Journal of Comparative Pathology*. 2017; 157: 34-38.
- Besn -Mérida A, Figueroa-Castillo JA, Martínez-Maya JJ, Luna-Pastén H, Calderón-Segura E, Correa D. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Veterinary Parasitology*. 2008; 157: 310-313.
- Besn -Mérida A. Caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) de distintas regiones de México. Tesis de Maestr a. Ciudad de México. México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
- Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current Opinion in Microbiology*. 2002; 5: 438-442.
- Bossi P, Caumes E, Paris L, Dard  ML, Bricaire F. *Toxoplasma gondii* associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 3724-3725.
- Burrells A. *Toxoplasma gondii* in animal and human hosts. Tesis de Doctorado. Edimburgo. Escocia. Universidad de Edimburgo, 2014.
- Buxton D. Ovine toxoplasmosis: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1990; 83: 509-511.
- Caballero-Ortega H, Palma JM, García-Márquez LJ, Gildo-Cárdenas A, Correa D. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology*. 2008a; 135: 1385-1389.
- Caballero-Ortega H, Quiroz-Romero H, Olazar n-Jenkins S, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from tropical zone of Mexico and analysis of the humoral response changes. *Parasitology*. 2008b; 135: 897-902.
- Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Correa D. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012; 106: 653-659.
- Caballero-Ortega H, Castillo-Cruz R, Murrieta S, Ortíz-Alegría LB, Calderón-Segura E, Conde-Glez CJ, Cañedo-Solares I, Correa D. Diagnostic-test evaluation of immunoassays for anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in a random sample of Mexican population. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2014; 8: 642-647.

- Calzada-Ruiz M. Cinética de invasión de las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii* en células endoteliales humanas. Tesis de licenciatura. Ciudad de México. México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- Carral L, Kaufer F, Pardini L, Durlach R, Moré G, Venturini MC, Freuler C. Toxoplasmosis congénita: diagnóstico serológico, RPC, aislamiento y caracterización molecular de *Toxoplasma gondii*. Revista Chilena de Infectología. 2018; 35: 36-40.
- Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Boouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40: 4037-4044.
- Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. Emerging Infectious Diseases. 2009; 15: 656-658.
- Castillo-Morales VJ, Acosta Viana KY, Guzmán-Marín ES, Jiménez-Coello M, Segura-Correa JC, Aguilar-Caballero AJ, Ortega-Pacheco A. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from the Tropics of Mexico using serological and molecular tests. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2012; 2012: 1-6.
- Cedillo-Peláez C. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México. Tesis de maestría. Ciudad de México. México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
- Cedillo-Peláez C, Gutiérrez-Chávez AJ, Besné-Mérida A, Xicotencatl-García L, Badajoz-Martínez J, Luna-Pastén H, López-Reboseño R, Correa D. Frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en perros de diferentes municipios de Guanajuato, México. Biomédica. 2011a; 31: 317.
- Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Salas-Garrido CG, Correa D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. Veterinary Parasitology. 2011b; 180:368-371.
- Cedillo-Peláez C, Díaz-Figueroa ID, Jiménez-Seres MI, Sánchez-Hernández G, Correa D. Frequency of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stray dogs of Oaxaca, Mexico. Journal of Parasitology. 2012; 98: 871-872.
- Cedillo-Peláez C. Diversidad genética de *Toxoplasma gondii* en animales domésticos y fauna silvestre en México y correlación de su patogenicidad en casos clínicos.

Tesis de doctorado. Ciudad de México. México. Universidad Autónoma Nacional de México, 2015.

- Chávez-Crisóstomo DO. Aislamiento de *Toxoplasma gondii* de tejido cerebral de un becerro infectado naturalmente en México. Tesis de Maestría. Ciudad de México. 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 lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35: 275–283.
- Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunology*. 2007; 29:651-660.
- Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38:2929-2932.
- Cruz-Vázquez C, García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Solorzano-Salgado M. Ovine toxoplasmosis in Huitzilac, Morelos, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*. 1992; 12: 27-33.
- Dagleish MP, Benavides J, Chianini F. Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Research*. 2010; 92:19-35.
- Dhakal R, Gajurel K, Pomares C, Talucod J, Press CJ, Montoya JG. Significance of a positive toxoplasma immunoglobulin M test result in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015; 53: 3601-3605.
- Dardé ML, Villena I, Pinon JM, Beguinot I. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36:324.
- Dardé ML. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2004; 40: 57-63.
- Dardé ML, Ajzenberg D, Su C. Molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*. En LM Weiss, K Kim. (Eds.), *Toxoplasma gondii* the model apicomplexan: perspectives and methods (pp. 62-93). Elsevier, Oxford, Reino Unido. 2014

- Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Garcia M, Santos D, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Schwarz RT. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. 2007; 179: 1129-1137.
- Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni river: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45: e88-95.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11: 569-588.
- Derouin F, Mazon MC, Garin IJF. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987; 25: 1597-1600.
- Desmonts G, Couvreur J, Thulliez P. Congenital toxoplasmosis. 5 cases of mother-to-child transmission of pre-pregnancy infection. *Presse Med*. 1990; 19:1445–1449.
- Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *American Journal of Veterinary Research*. 1988; 49: 910-913.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11: 267-299.
- Dubey JP, Morales ES, Lehmann T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2004; 90: 411-413.
- Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AHH, Farias NA, Ruas JL, dos Santos TRB, Cavalcante GT, Kwok OC, Su C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Veterinary Parasitology*. 2007a; 143: 182-188.
- Dubey JP, López-Torres HY, Sundar N, Velmurugan GV, Ajzenberg D, Kwok OC, Hill R, Dardé ML, Su C. Mouse-virulent *Toxoplasma gondii* isolated from feral cats on Mona Island, Puerto Rico. *Journal of Parasitology*. 2007b; 93: 1365-1369.
- Dubey JP, Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Herrera-Flores RG, Ramírez-Sánchez BE, González-Herrera A, Martínez-García SA, Bandini LA, Kwok OCH. *Neospora*

- caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango City, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2007c; 93: 1033-1035.
- Dubey JP, Jones J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38: 1257-1278.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, *et al.* Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2008; 157: 299-305.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Martínez-García S *et al.* Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2009; 95: 319-322.
- Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. *Veterinary Parasitology*. 2009; 163: 1-14.
- Dubey JP, Su C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 190-195.
- Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans, 2nda ed. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, EE. UU. 2010.
- Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, McLeod R. Oral oocysts-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, doses, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology*. 2012; 139: 1-13.
- Dubey JP, Alvarado-Esquivel C, Herrera-Valenzuela VH, Ortiz-Diaz JJ, Oliveira S, Verma SK, Choudhary S, Kwok OCH, Su C. A new atypical genotype mouse virulent strain of *Toxoplasma gondii* isolated from the heart of a wild caught puma (*Felis concolor*) from Durango, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2013; 197: 674-677.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999; 353:1829-1833.
- Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by *GRA6* gene sequence analysis. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30:637-642.
- Ferra B, Holec-Gąsior L, Kur J. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. *Parasitology International*. 2015; 64: 288-294.

- Ferreira I, Vidal J, Costa-Silva T, Meira C, Hiramoto R, Penalva A, Pereira V. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental Parasitology*. 2008; 118: 221-227.
- Figueroa-Castillo JA, Duarte-Rosas V, Juárez-Acevedo M, Luna-Pastén H, Correa D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *Journal of Parasitology*. 2006; 92: 394-395.
- Forman D, West N, Francis J, Guy E. The sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in British marine mammals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 296-298.
- Fuentes I, Rubio J, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39: 1566-1570.
- Galván-Ramírez ML, Sánchez-Vargas G, Vielma-Sandoval M, Soto-Mancilla JL. Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999; 32: 483-488.
- Galván-Ramírez ML, Madriz-Elisondo AL, Rico-Torres CP, Luna-Pastén H, Rodríguez-Pérez LR, Rincón-Sánchez AR, Franco R, Salazar-Montes A, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* in pork meat in Ocotlán, Jalisco, Mexico. *Journal of Food Protection*. 2010; 73: 1121-1123.
- Galván-Ramírez ML, Mondragón-Flores R. *Toxoplasmosis humana*, 1era ed. ECORFAN, Guadalajara, México. 2017.
- García-Márquez LG, Gutiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, Palma JM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2007; 93: 1527-1528.
- García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Solorzano-Salgado M. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in three states of Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*. 1990; 10: 25-29.
- García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Diaz-García G. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. *Preventive Veterinary Medicine*. 1993; 17: 127-132.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on

- CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of Immunology*. 1996; 157:798-805.
- Geuthner AC, Koethe M, Ludewig M, Pott S, Schares G, Dauschies A, Bangoura B. Persistence of *Toxoplasma gondii* tissue stages in poultry over a conventional fattening cycle. *Parasitology*. 2014; 141:1359-1364.
- Gjerde B. Characterisation of full-length mitochondrial copies and partial nuclear copies (numts) of the cytochrome b and cytochrome c oxidase subunit I genes of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni* and *Hammondia triffittae* (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitology Research*. 2013; 112: 1493-1511.
- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*. 2001a; 294:161–165.
- Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001b; 184: 633-639.
- González RM, Shehata H, O'Connell MJ, Yang Y, Moreno-Fernandez ME, Chougnet CA, Aliberti J. *Toxoplasma gondii*-derived profilin triggers human TLR5-dependent cytokine production. *Journal of Innate Immunology*. 2014; 6:685-694.
- Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiology & Infection*. 2004; 132: 541-548.
- Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE. UU. 2012.
- Herder V, van de Velde N, Hojer Kristensen J, van Elk C, Peters M, Kilwinski J, Schares G, Siebert U, Wohlsein P. Fatal disseminated *Toxoplasma gondii* infection in a captive harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Comparative Pathology*. 2015; 153: 357-362.
- Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *International Journal for Parasitology*. 2013; 43:107-113.
- Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. *American Journal of Ophthalmology*. 2003; 136: 973-988.

- Homan WL, Vercammen M, Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 69-75.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995; 172: 1561-1566.
- Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35: 1411-1414.
- Innes E. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 1997; 20: 131-138.
- Jones J, Kruszon-Moran D, Wilson M, McQuillan G, Navin T, McAuley J. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *American Journal of Epidemiology*. 2001; 154: 357-365.
- Kaplan J, Benson C, Holmes K, Brooks J, Pau A, Masur H, *et al.* Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Morbidity and Mortality Weekly Reports (MMWR) Recommendations and Reports*. 2009; 58: 1-207.
- Khan A, Taylor S, Su C, Mackey A, Boyle J, Cole R, Glover D, Tang K, Paulsen IT, Berriman M, Boothroyd JC, Pfefferkorn ER, Dubey JP, Ajioka JW, Roos DS, Wootton JC, Sibley LD. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33: 2980-2992.
- Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology*. 2011; 41: 645-655.
- Khurana S, y Batra N. Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication, and prevention. *Tropical Parasitology*. 2016; 6:123-128.
- Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S. Recognition of profilin by toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2013; 38:119-130.

- Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitology Research*. 2007; 101: 619-625.
- Kong J, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd J. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003; 187:1484-1495.
- Lau YL, Lee WC, Gudimella R, Zhang G, Ching XT, Razali R, Aziz F, Anwar A, Fong MY. Deciphering the draft genome of *Toxoplasma gondii* RH strain. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0157901.
- Lecordier, L, Mercier C, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Molecular Biology of the Cell*. 1999; 10: 1277–1287.
- Li X, Wang Y, Yu F, Li T, Zhang D. An outbreak of lethal toxoplasmosis in pigs in the Gansu province of China. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2010; 22: 442-444.
- Lorenzi H, Khan A, Behnke, MS, Namasivayam S, Swapna LS, *et al.* Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nature Communications*. 2016; 7: 10147.
- Maksimov P, Zerweck J, Dubey JP, Pantchev N, Frey C, Maksimov A, Reimer U, Schutkowski M, Hosseini M, Ziller M, Conraths F, Schares G. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis domesticus*) reveals predominance of type II infections in Germany. *PLoS ONE*. 2013; 8: e80213.
- Maksimov P, Basso W, Zerweck J, Schutkowski M, Reimer U, Maksimov A, Conraths FJ, Schares G. Analysis of *Toxoplasma gondii* clonal type-specific antibody reactions in experimentally infected turkeys and chickens. *International Journal for Parasitology*. 2018; 48: 845-856.
- Martínez-Flores WA, Palma-García JM, Caballero-Ortega H, Del Viento-Camacho A, López-Escamilla E, Martínez-Hernández F, Vinuesa P, Correa D, Maravilla P. Genotyping *Toxoplasma gondii* with the B1 gene in naturally infected sheep from an endemic region in the Pacific Coast of Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2017; 17: 495-502.
- McLeod R, Boyer K, Lee D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Noble AG, Withers S, Swisher CN, Heydemann PT, Sautter M, Babiarz J, Rabiah P, Meier P, Grigg M, Toxoplasmosis Study Group. Prematurity and severity are associated with

- Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clinical Infectious Diseases*. 2012; 54: 1595-1605.
- Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Molecular Biology of the Cell*. 2002; 13: 2397-2409.
- Mercier C, Adjogble KDZ, Däubener W, Cesbron Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexan parasites? *International Journal for Parasitology*. 2005; 35: 829-849.
- Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR, Jessup DA, Boothroyd JC, Brownstein D, Conrad PA. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is associated with mortality. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34:275–284.
- Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2009; 39: 23-39.
- Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002; 185: S73-82.
- Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 47: 554-566.
- Morisset S, Peyron F, Lobry J, Garweg J, Ferrandiz J, Musset K, Gomez-Marin J, de la Torre A, Demar M, Carme B, Mercier C, Garin J, Cesbron-Delauw M. Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes and Infection*. 2008; 10: 742-747.
- Mun HS, Aosai F, Norose K, Piao LX, Fang H, Akira S, Yano A. Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. *Infection and Immunity*. 2005; 73: 4634-4642.
- Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic test are best suited to which clinical situations? *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2013; 9: 943-956.
- Nowakowska D, Colón I, Remington J, Grigg M, Golab E, Wilczynski J, Sibley D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44: 1382-1389.

- Olariu TR, Blackburn BG, Press C, Talucod J, Remington JS, Montoya JG. Role of *Toxoplasma* IgA as part of a reference panel for the diagnosis of acute toxoplasmosis during pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018. doi: 10.1128/JCM.01357-18
- Olmedo-Hernández M. Estandarización y validación de un ELISA de captura de anticuerpos tipo IgA e IgM contra *Toxoplasma gondii* en muestras humanas de suero. Tesis de licenciatura. Ciudad de México. México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
- Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *Journal of Parasitology*. 1999; 85: 382-384.
- Pena HFJ, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Research in Veterinary Science*. 2006; 81: 58–67.
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38: 561-569.
- Pena HFJ, Vitaliano SN, Beltrame MAV, Pereira FEL, Gennari SM, Soares RM. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: new genotypes and a new SAG3 marker allele. *Veterinary Parasitology*. 2013; 192: 111-117.
- Peyron F, Lobry J, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin J, Petersen E, Meroni V, Rausher B, Mercier C, Picot S, Cesbron-Dealuw M. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes and Infection*. 2006; 8: 2333-2340.
- Rajendran C, Su C, Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12: 359-368.
- Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, Cedillo-Peláez C, Cañedo-Solares I, Luna-Pastén H, Tecuatl-Herrada BL, Correa D. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2012; 31: 411-412.
- Rico-Torres CP, Del Viento-Camacho A, Caballero-Ortega H, Besné-Mérida A, Luna-Pastén H, Correa D, Palma-García JM. First isolation of *Toxoplasma gondii* from

- cats of Colima Mexico: tissue distribution and genetic characterization. *Veterinary Parasitology*. 2015; 209: 125-128.
- Rico-Torres CP, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016; 35: 1079-1088.
- Rico-Torres CP, Valenzuela-Moreno LF, Luna-Pastén H, Figueroa-Damián R, Gómez-Toscano V, Hernández-Delgado L, Escobedo-Torres MP, Correa D. High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the mega-metropolis of Central Mexico. *Acta Trópica*. 2018; 178: 124-129.
- Robert-Gangneux F, Commere V, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1999; 18: 648-654.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25: 264-296.
- Roe WD, Howe L, Baker EJ, Burrows L, Hunter SA. An atypical genotype of *Toxoplasma gondii* as a cause of mortality in Hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*). *Veterinary Parasitology*. 2013; 192: 67-74.
- Roiko MS, Svezhova N, Carruthers VB. Acidification activates *Toxoplasma gondii* motility and egress by enhancing protein secretion and cytolytic activity. *PLoS Pathog*. 2014; 10: e1004488.
- Roos DS, Crawford MJ, Donald RGK, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Current Opinion in Microbiology*. 1999; 2: 426-432.
- Rougier S, Montoya J, Peyron F. Lifelong persistence of *Toxoplasma* cysts: a questionable dogma? *Trends in Parasitology*. 2017; 33: 93-101.
- Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *International Immunology*. 2018; 30:113-119.
- Schrader C, Schielke a, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitor – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 113: 1014-1026.

- Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, Metzner S, James E, Torun N, Fay M, Liesenfeld O, Grigg M. *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013; 208: 1520-1528.
- Shwab EK, Zhu X, Majumdar D, Pena H, Gennari S, Dubey JP, Su C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014; 1: 1-9.
- Silva LA, Andrade RO, Carneiro ACAV, Vitor RWA. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS ONE*. 2014; 9: e90237.
- Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Correia da Costa JM, Dardé ML. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008; 15: 1380-1386.
- Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, Correia da Costa JM, Dardé ML. Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009; 16: 1158-1169.
- Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Dardé ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Veterinary Parasitology*. 2010; 169: 24-28.
- 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. *International Journal for Parasitology*. 2006; 36: 841-848.
- Su C, Schwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2010; 137: 1-11.
- Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé M, Zhu X, Ajioka J, Rosenthal B, Dubey JP, Sibley D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; 109: 5844-5849.
- Teixeira PV, Vasconcelos DV, Castro FC, Faria JC, Almeida RW, Brasileiro G. Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35: 1-6.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 1217-1258.

- ToxoDB.org. Identify RFLP Genotype Isolates based on RFLP Genotype Number. 2018. Recuperado de <http://toxodb.org/toxo/>
- Valenzuela-Moreno LF. Frecuencia y genotipificación de *Toxoplasma gondii* en carnívoros y herbívoros silvestres de una colección privada. Tesis de maestría. Ciudad de México. México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- Van de Velde N, Devleeschauwer B, Leopold M, Begeman L, Ijseldijk L, Hiemstra S, Ijzer J, Brownlow A, Davison N, Haelters J, Jauniaux T, Siebert U, Dorny P, De Craeye S. *Toxoplasma gondii* in stranded marine mammals from the North Sea and Eastern Atlantic Ocean: findings and diagnostic difficulties. *Veterinary Parasitology*. 2016; 230: 25-32.
- Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, Dubey JP, Jones JL, Doymaz MZ, Bruckner DA, Belfort R, Holland G, Grigg M. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010; 202: 1226-1233.
- Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez ML, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, *et al.* Short report : neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005; 72: 142-144.
- Verma SK, Sweeny AR, Lovallo MJ, Calero-Bernal R, Kwok OC, Jiang T, Su C, Grigg ME, Dubey JP. Seroprevalence, isolation and co-infection of multiple *Toxoplasma gondii* strains in individual bobcats (*Lynx rufus*) from Mississippi, USA. *International Journal for Parasitology*. 2017; 47: 297-303.
- Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, Paris L, Pelloux H, Villena I, Candolfi E. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016; 84: 22-33.
- Vismarra A, Barilli E, Miceli M, Mangia C, Genchi M, Brindani F, Kramer L, Bacci C. *Toxoplasma gondii* in the Cornigliese sheep breed in Italy: meat juice serology, in vitro isolation and genotyping. *Veterinary Parasitology*. 2017; 243: 125-129.
- Wong SY, Hadju MP, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R, Remington JS. The role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31: 2952–2959.

- Xiao J, Buka S, Cannon T, Suzuki Y, Viscidi R, Torrey E, Yolken R. Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes and Infection*. 2009; 11: 1011-1018.
- Xicoténcatl-García L. Serotipificación de infección por *Toxoplasma gondii* en humanos, animales domésticos y silvestres. Tesis de maestría. Ciudad de México. México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005; 308: 1626-1629.
- Zhang YW, Halonene SK, Ma YF, Wittner M, Weiss LM. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infection and Immunity*. 2001; 69: 501-507.

Anexo 1: Estuche comercial Gentra Puregene Tissue kit

1. Pesar entre 200 – 300 mg de tejido congelado de diafragma o corazón.
2. Cortar el tejido en pedazos pequeños y macerar en un mortero con 1 mL de la solución de lisis celular (QIAGEN, Cat.158908), después transferir a un microtubo de 1.5 mL.
3. Adicionar 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL; Sigma, Cat. 39450-01-6) e incubar a 56 °C en termoblock toda la noche.
4. Transferir el contenido a un tubo tipo Corning de 15 mL, agregar 1 mL de solución de precipitación de proteínas (QIAGEN, Cat.158912).
5. Agitar en vortex y centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo al que previamente se le debe adicionar 2 mL de isopropanol (Sigma, Cat. I9516-500ML) para precipitar el DNA, mezclar por inversión 20 veces.
7. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.
8. Decantar el sobrenadante y adicionar 2 mL de etanol al 70% (Sigma-Aldrich, Cat. E7023-500ML).
9. Agitar en vortex y centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.
10. Decantar el etanol, invertir el tubo y dejar secar sobre papel absorbente durante toda la noche para que el etanol se evapore.
11. Adicionar 100 µL de la solución de hidratación comercial (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl pH 7.5) (QIAGEN, Cat. 158916), mezclar y transferir a un microtubo de 1.5 mL para su cuantificación.
12. Almacenar el DNA a -20 °C hasta su uso.

Anexo 2: Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v)

1. Después de realizar la técnica de concentración de quistes tisulares (Anexo 4), a la pastilla obtenida se agregan 500 μ L de amortiguador de lisis SNET (Tris-Cl 20 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, SDS 1%, NaCl 400 Mm, esterilizado por filtración) y RNAsa a una concentración final de 100 μ g/mL e incubar a 37 °C por 1 hora.
2. Adicionar proteinasa K a una concentración final de 400 μ g/mL e incubar a 55 °C toda la noche en posición horizontal en una placa de vaivén o incubadora con agitación.
3. Adicionar un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, sellar el tubo e incubar en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos a 4 °C.
5. Transferir la fase acuosa a un microtubo nuevo y descartar la fase orgánica.
6. Precipitar el DNA adicionando un volumen igual de isopropanol. Mezclar por inversión suave y colocar en hielo durante 5 minutos.
7. Centrifugar a máxima velocidad por 15 minutos a 4 °C.
8. Descartar con cuidado el isopropanol y adicionar 600 μ L de etanol al 70%, mezclar por inversión y repetir el paso 7.
9. Decantar el etanol e invertir el tubo sobre papel absorbente durante 15 a 20 minutos.
10. Disolver el DNA con una dilución 1:10 de la solución de hidratación (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl pH 7.5) e incubar a 95 °C durante 1 hora.
11. Cuantificar el DNA y almacenar la muestra a -20 °C.

Anexo 3: Precipitación salina

1. Después de realizar la técnica de concentración de quistes tisulares (Anexo 4), a la pastilla obtenida se agregan 500 μ L de amortiguador de lisis SNET (Tris-Cl 20 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, SDS 1%, NaCl 400 Mm, esterilizado por filtración) y proteinasa K a una concentración final de 400 μ g/mL.
2. Incubar a 55 °C toda la noche en posición horizontal en una placa de vaivén o incubadora con agitación.
3. Agregar 300 μ L de solución de precipitación de proteínas, agitar durante 40 segundos e incubar a -20 °C durante 20 minutos.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.
5. Transferir el sobrenadante a un microtubo de 1.5 mL.
6. Adicionar 1200 μ L de isopropanol y agitar suavemente para precipitar el DNA.
7. Centrifugar a 4000 rpm durante 1 minuto.
8. Decantar el isopropanol y agregar 500 μ L de etanol al 70%.
9. Colocar en agitación continua durante 10 minutos y repetir el paso 7.
10. Desechar el sobrenadante y realizar dos lavados más con 1 mL de etanol al 70%, centrifugando a 6000 y 14000 rpm en cada paso durante 1 minuto.
11. Decantar el etanol e invertir el tubo sobre papel absorbente durante 8-10 minutos.
12. Adicionar 200 μ L de la solución de hidratación (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl pH 7.5).
13. Cuantificar el DNA y almacenar la muestra a -20 °C.

Anexo 4: Técnica de concentración de quistes tisulares

1. Pesar 5 gramos de tejido y en un recipiente de boca ancha agregar 25 mL de agua bidestilada.
2. Mezclar con una licuadora manual hasta homogeneizar bien el tejido.
3. Filtrar la mezcla con un tamiz metálico con apertura de 100 micras, usar un embudo para transferir directamente a un tubo tipo Corning de 50 mL.
4. Aforar con agua bidestilada hasta 50 mL y agitar manualmente.
5. Centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad y descartar el sobrenadante evitando no perder la pastilla.
6. Repetir los pasos 4 y 5.
7. Adicionar la solución de sacarosa (gravedad específica 1.2) hasta llegar a 20 mL y agitar en vortex hasta disolver completamente la pastilla.
8. Colocar la campana de Ferreira y agregar más solución de sacarosa hasta que la rondana metálica se cubra totalmente. Cerrar el tubo con cuidado de no derramar la solución.
9. Centrifugar a 1500 rpm durante 3 minutos.
10. Transferir 500 μ L del líquido de la punta de la campana (de preferencia usar una pipeta de 200 μ L) a un microtubo de 1.5 mL.
11. Aforar con agua bidestilada hasta 1.5 mL y centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos.
12. Decantar el sobrenadante y repetir el paso 11.
13. Descartar el sobrenadante y realizar el método de extracción de DNA de su preferencia.

Anexo 5: Biología molecular

PCR en tiempo real

Cada reacción se realizó con 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Cat. 4304437), 0.5 µL de los oligonucleótidos del gen *B1* y sonda marcada con fluoresceína, 2.5 µL de DNA de los tejidos de diafragma o corazón (50 ng/µL), 0.8 µL de agua estéril, 1 µL de oligonucleótidos del control interno de la PCR (IPC) y 0.2 µL de DNA del IPC. La mezcla de la reacción se incubó por 2 minutos a 50 °C para permitir que la enzima uracil-N-glicosilasa actúe; enseguida se incubó por 10 minutos a 95 °C para inactivarla y activar la enzima AmpliTaq Gold. La amplificación se realizó durante 35 ciclos, en dos pasos: desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y alineamiento a 60 °C durante 1 minuto, en un termociclador Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Cat. 4376357), la fluorescencia se analizó con el software Step One 2.0.

PCR semianidada del marcador *GRA6*

PCR externa (Int-F/Seq2-R; 854 pb)

Cada reacción se ajustó a un volumen final de 50 µL, se usaron 5 µL de amortiguador de PCR (10x PCR Gold Buffer, Roche), 4 µL de cloruro de magnesio (MgCl₂ 25 mM, Roche), 1 µL de PCR Nucleotide Mix (10 mM, Roche), 1 µL de cada oligonucleótido (Int-F / Seq2) (400 pmol), 1 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido, 5% Sigma) y 0.3 µL de Taq polimerasa (5 U/µL AmpliTaq Gold, Roche). Se usaron 500 ng de DNA y el resto del volumen se aforó con agua inyectable. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Cat. 4388444), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 4 minutos, 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento 55 °C por 40 segundos, extensión a 72 °C por 2 minutos y extensión final a 72 °C por 2 minutos. Al terminar los ciclos, las muestras se mantuvieron a 4 °C.

PCR interna (Int-F/Int-R; 344 pb)

Se usaron las mismas cantidades de los reactivos mencionadas en la PCR externa, empleando diferentes oligonucleótidos (Int-F/Int-R). Se colocaron 1.5 μ L y 3 μ L de una dilución 1:2 del producto de la PCR externa y lo demás se aforó con agua inyectable, para tener un volumen final de 50 μ L. Se utilizó el mismo termociclador y las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 4 minutos, 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento 60 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1:45 minutos. Al terminar los ciclos, las muestras se mantuvieron a 4 °C.

PCR-RFLP de *GRA6*

Para la reacción de digestión se emplearon 0.35 μ L de la enzima de restricción *MseI* (10 U/ μ L, New England), 5 μ L de amortiguador de digestión (NEB2 10x, New England) y 30 μ L de DNA amplificado por PCR. De las muestras de clonación, se colocaron 20 μ L de cada colonia o plásmido y 15 μ L de los controles. La reacción se incubó toda la noche a 37 °C.

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit

1. Cortar el fragmento de DNA del gel de agarosa usando una hoja de bisturí y transferirlo a un microtubo de 1.5 mL.
2. Adicionar 3 volúmenes de la solución ADB por cada volumen de agarosa cortado del gel (ej. para 100 μ L (mg) de la porción del gel de agarosa adicionar 300 μ L de ADB).
3. Incubar a 55 °C por 10 minutos hasta que la porción del gel se disuelva completamente.
4. Transferir la solución de agarosa derretida a una columna Zymo-Spin™ en un tubo colector.
5. Centrifugar por 1 minuto a 12000 rpm. Descartar el contenido del tubo colector.
6. Adicionar 200 μ L de solución de lavado a la columna y centrifugar por 1 minuto a 12000 rpm. Descartar el contenido del tubo colector. Repetir el paso de lavado.

7. Centrifugar la columna vacía por 1 minuto a 12000 rpm.
8. Dejar la columna cubierta con Parafilm® con agujeros hasta el siguiente día para permitir que el etanol se evapore totalmente.
9. Adicionar 7 µL de agua inyectable (previamente calentada a 60 °C) directamente en la matriz de la columna. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 mL.
10. Dejar por 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 12000 rpm.
11. Cuantificar y almacenar a -20 °C hasta su uso.

CloneJET PCR Cloning Kit

1. Realizar la reacción de despunte (blunting) en hielo.
2. Colocar 1.5 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de amortiguador de reacción 2X, 1 µL de la enzima DNA blunting y 50 ng del producto de PCR.
3. Mezclar en vórtex brevemente e incubar por 5 minutos a 70 °C. Enfriar en hielo por varios segundos.
4. Colocar la reacción de ligación en hielo. Adicionar 0.5 µL del vector de clonación pJET1.2/blunt y 1 µL de la DNA ligasa T4 a la mezcla de la reacción de despunte.
5. Mezclar en vórtex levemente e incubar a temperatura ambiente (16-22 °C) por 1 hora.
6. Usar la mezcla de ligación directamente para la transformación o mantenerla a -20 °C hasta su uso.

PCR de colonia

Por cada reacción se usaron 5 µL de amortiguador de PCR (10x PCR Gold Buffer, Roche), 4 µL de cloruro de magnesio (MgCl₂ 25 mM, Roche), 1 µL de PCR Nucleotide Mix (10 mM, Roche), 1 µL de cada oligonucleótido de *GRA6* (Int-F / Int-R) (400 pmol), y 0.3 µL de Taq polimerasa (5 U/µL AmpliTaq Gold, Roche). Se usó 1 µL de cada colonia (caldo LB + ampicilina). El resto del volumen se aforó con agua inyectable hasta llegar a un volumen de 50 µL. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Cat. 4388444),

con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento 60 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1:45 minutos. Al terminar los ciclos, las muestras se mantuvieron a 4 °C.

GeneJET Plasmid Miniprep Kit

1. Usar 1-5 mL de cultivo de *E. coli* en medio LB para la purificación del plásmido.
2. Transferir 1.5 mL del cultivo a un microtubo de 1.5 mL y centrifugar por 1 minuto a 10000 rpm. Decantar el sobrenadante. Repetir este paso a terminar todo el medio LB.
3. Adicionar al botón de células, 250 µL de la solución de resuspensión. Las bacterias deben ser resuspendidas completamente mediante pipeteo suave.
4. Adicionar 250 µL la solución de lisis y mezclar por inversión gentilmente entre 4 a 6 veces hasta que la solución se haga viscosa y ligeramente clara.
5. Adicionar 350 µL de la solución de neutralización y mezclar inmediatamente por inversión gentilmente entre 4 a 6 veces.
6. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm.
7. Transferir con pipeta el sobrenadante a una columna GeneJET spin. Evitar transferir el precipitado blanco.
8. Centrifugar por 1 minuto a 13000 rpm. Descartar el contenido del tubo colector.
9. Adicionar 500 µL de solución de lavado a la columna. Centrifugar por 1 minuto a 13000 rpm. Descartar el contenido del tubo colector.
10. Repetir el paso 9.
11. Centrifugar la columna vacía por 1 minuto a 13000 rpm para remover los residuos de la solución de lavado.
12. Transferir la columna a un microtubo de 1.5 mL. Adicionar 50 µL de agua Milli-Q esterilizada al centro de la membrana de la columna para eludir el DNA. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm.
13. Descartar la columna y almacenar el DNA plasmídico purificado a -20 °C.