



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“Frecuencia y genotipificación de *Toxoplasma gondii* en carnívoros y herbívoros silvestres de una colección privada”

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Luis Fernando Valenzuela Moreno

Tutor principal:

M. en C. Heriberto Caballero Ortega

**Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud
Animal**

Comité tutorial:

Dra. María Dolores Correa Beltrán

**Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud
Animal**

Dr. Gerardo Suzán Azpiri

**Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio,
FMVZ-UNAM**

México, D. F.

Junio 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Experimental (LIE) de la Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección del M. en C. Heriberto Caballero Ortega.

El proyecto se realizó con el apoyo de la M.V.Z. María Alejandra Hernández Rodríguez, M.V.Z. Marco Antonio Benítez García y de la M.V.Z. Esp. María del Carmen Carmona Muciño de donde se obtuvieron las muestras evaluadas durante el estudio así como del M. en C. Francisco Javier García Vázquez y el H.T. José Eduardo Farfán Morales del Departamento de Anatomía Patológica 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.

Alumno becario del CONACyT, de agosto de 2011 a julio de 2013 con número de registro 421186.

Dedicatoria

A mis padres por que sin su apoyo, paciencia, esfuerzo, tiempo, dinero estaría a punto de lograr un objetivo más en mi vida.

A mi tía Tere Mendoza por que siempre ha estado ahí cuando la he y la hemos necesitado como familia apoyando de múltiples maneras.

A mi tío Raúl y Tía Ana María por que también nos han ayudado y apoyado infinitamente.

A mi tía Tere Leal que siempre ha estado para mi mamá y le ha ayudado mucho.

A mi hermana Gaby por que a pesar de las diferencias que hemos tenido actualmente hemos logrado superarlas y estamos en una nueva etapa familiar.

Al bodoque (Dany) que me ha tenido paciencia y a pesar de todo siempre esta ahí para sacarme una sonrisa.

A mis amigos que son mas que eso, mis hermanos de otra madre (Poyo, Memo, Wiki, Ivis, Octavio) que han estado en las buenas, las malas y las peores.

Y muy especialmente a Lolo y Chelo, que sin importar si había tenido un pésimo día, ahí han estado para hacerme compañía y demostrarme que no estoy solo.

Agradecimientos

A la UNAM y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que sin su infraestructura, recursos e ideología no estaría apunto de conseguir de este objetivo.

A mi tutor el M. en C. Heriberto Caballero que me ayudó, enseñó y orientó para poder llevar a cabo este proyecto, que sin su punto de vista objetivo no hubiera podido terminar este trabajo, del que estoy muy orgulloso.

A la Dra. Correa por darme la oportunidad de entrar al Laboratorio de Inmunología Experimental; me dio libertad y me exigió para que pudiera aprender y crecer profesional y personalmente.

Al Dr. Gerardo Suzán por el tiempo que me brindó así como sus puntos de vista durante el curso de ecología de enfermedades infecciosas.

A la MVZ Alejandra Hernández que desde que terminé la licenciatura me sembró la idea de continuar con un posgrado y por todo el apoyo brindado durante la realización del mismo y espero en un futuro podamos seguir colaborando. De la misma manera a la MVZ Esp. María del Carmen Carmona por permitirme participar, colectar muestras y difundir los resultados en algunos foros de los cuales ya hemos cosechado algunos frutos.

A Carlos y Alejandro que más que compañeros de laboratorio fueron y son maestros, asesores y amigos, muchas gracias por todo y finalmente... ¡tenían razón!

A mis amigas y compañeras del lab. Liz, Anita, Montse y Mónica gracias por su ayuda, apoyo y ánimos.

Y a todos los compañeros del LIE (Belinda, Irma, Héctor, Rafa, Claudia, Yevel, Lulú, Tte. Murrieta, Esther, José Luis, José Antonio, por que cada uno de ustedes me enseñó y ayudó en varias cosas para poder terminar mi tesis.

A Mariela por las idas a comer al café de chinos que siempre me sirvieron para levantar el ánimo y seguir para conseguir el objetivo.

A todos los integrantes de la familia Lacy y adjuntos (Mom, Bubi, Pili, Ra, Leopos) por siempre tener las puertas de sus casas abiertas y con una sonrisa en la cara.

A Miguel y Paco por las horas de distracción en el Nintendo y Xbox

Por último pero no menos importante al jurado de mi examen por la revisión y comentarios que ayudaron a enriquecer mas este trabajo de investigación: Dra. Bertha Josefina Espinoza, M. en C. Fernando Gual, M. en C. Ignacio Rangel y Dra. Guadalupe Prado.

Resumen

La prevalencia de la infección por *Toxoplasma gondii* varía considerablemente en distintas partes del mundo, dependiendo principalmente de las condiciones climáticas y culturales de cada región. La susceptibilidad a la presentación clínica de la enfermedad varía dependiendo de la especie, ya que algunas raramente desarrollan la toxoplasmosis, mientras que otras son particularmente susceptibles y en muchas ocasiones con consecuencias fatales, como los gatos de Pallas, marsupiales australianos, canarios, suricatas, monos del Nuevo Mundo y los lémures, que pueden morir de toxoplasmosis aguda. Hasta hace algunos años, se consideraba que *T. gondii* tenía poca variabilidad genética (menor al 1%), agrupando los aislamientos en tres clonas principales (tipos I, II y III). Sin embargo, los estudios recientes han demostrado que existen al menos 15 haplogrupos que varían entre distintas zonas geográficas. Las infecciones por *T. gondii* en animales de zoológico son de particular interés porque varias especies de animales en cautiverio mueren de toxoplasmosis aguda. El objetivo del presente estudio, fue determinar la frecuencia y genotipos de *T. gondii* en animales herbívoros y carnívoros silvestres de una colección privada. Se obtuvieron sueros de 55 muflones europeos (*Ovis musimon*) y 15 felinos silvestres (*Panthera leo* y *Panthera tigris*), resultando 4 (7.3%) y 12 (80%) muestras positivas por ELISA, respectivamente. Se eutanasiaron los dos muflones con el índice de reactividad más elevado, así como dos leones gerontes para coleccionar muestras de órganos blanco (corazón, pulmón, hígado, bazo, músculo y encéfalo), extraer DNA a partir de éstos diagnosticar y caracterizar molecularmente a *Toxoplasma*, por medio de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real; las que resultaron positivas se procesaron para PCR punto final (fragmento 529 pb, *B1*, *GRA6*, *GRA7*, *SAG2* alternativo, *SAG3*, *BTUB*) y RFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción) para hacer la genotipificación. En la mayoría de los *loci* se obtuvieron amplicones de peso molecular esperado y productos adicionales; se realizó RFLP para los genes *SAG3* y *SAG2* Alternativo obteniendo un patrón diferente al de las cepas clonales por lo que se sugiere que los genotipos de los leones y muflones pudieran ser un genotipo atípico. Cabe hacer notar que éste es el primer trabajo en México en el que se reporta la caracterización genética directa de *T. gondii* a partir de tejidos de muflones y leones.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, frecuencia, genotipos, fauna silvestre, muflón, león

Abstract

Toxoplasma gondii infection prevalence varies considerably worldwide, depending on the weather and cultural conditions in a given geographical region. The susceptibility to the clinical disease varies depending on the host species. Some of them rarely develop toxoplasmosis, while others are particularly susceptible and in most cases, with fatal consequences like Pallas cat, Australian marsupials, canaries, meerkats, New World primates and lemurs. Until a few years ago, the genetic variability of *T. gondii* was considered low (less than 1%), grouping the isolates in three major lineages (types I, II and III). However, recent studies have demonstrated that there are at least 15 haplotypes, which vary depending on climate and geographical region. *Toxoplasma gondii* infections in captive animals are of particular importance because several species die of acute toxoplasmosis. The objective of this study was to determine the frequency and genotypes of *T. gondii* in wild herbivores and carnivores from a private collection. We sampled 55 European mouflons (*Ovis musimon*) and 15 wild felids (*Panthera leo* & *Panthera tigris*) to obtain serum samples which were tested by indirect ELISA; four herbivores (7.27%) and 12 carnivores (80)% were positive to *T. gondii*. Two mouflons with the highest reactivity index, as well as two senile lions were euthanized to collect target organs (heart, lung, liver, spleen, muscle and brain) and extract DNA. PCR (polymerase chain reaction) and RFLP (Restriction fragment length polymorphism) assays were performed using 7 genetic markers (non-coding 529 pb fragment, *B1*, *GRA6*, *GRA7*, *SAG2* alternative, *SAG3* and *BTUB*). For most markers the expected products, as well as additional amplicons, were observed. When RFLP was performed for *SAG2* Alternative and *SAG3* markers, completely different patterns to those for the clonal lineages were observed. The results suggest that the strains found in mouflons and lions tissues may be atypical. This is the first report of direct tissue genotyping from mouflons and lions in Mexico.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, frequency, genotypes, wildlife, mouflons, lions, tigers

Índice

	Página
1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Antecedentes históricos	2
1.3 Biología	2
1.4 Ciclo de vida	5
1.5 Transmisión	9
1.6 Diagnóstico	10
1.7 Toxoplasmosis en animales de México	11
1.8 Toxoplasmosis en fauna silvestre de México	15
1.9 Toxoplasmosis en muflones	17
1.10 Toxoplasmosis en felinos silvestres	19
1.11 Genotipificación de <i>T. gondii</i> en México	25
2. Planteamiento del problema	26
3. Objetivo General	28
3.1 Objetivo particular	28
4. Hipótesis	28
5. Material y Métodos	29
5.1 Tipo de estudio	29
5.2 Lugar de estudio	29
5.3 Estrategia general	29
5.4 Técnicas de laboratorio	30
5.4.1 ELISA indirecto	30
5.4.2 Western Blot	31
5.4.3 Necropsia	31
5.4.4 Histopatología	32
5.4.5 Inmunohistoquímica	33
5.4.6 PCR	33
5.4.7 PCR-RFLP	35
5.4.8 Aislamiento en ratones Balb/c	35

6. Resultados	39
6.1 Serología	39
6.2 Western Blot	43
6.3 Necropsia y hallazgos macroscópicos	44
6.4 Histopatología	45
6.5 Inmunohistoquímica	50
6.6 Bioensayo en ratones Balb/c	52
6.7 Biología molecular	52
6.7.1 PCR en tiempo real	52
6.7.2 PCR punto final	52
6.7.3 PCR-RFLP	57
7. Discusión	63
8. Conclusiones	72
Referencias	73
Anexo 1: ELISA Indirecto	93
Anexo 2: Técnica de estandarización de Western Blot para anticuerpos Clase IgG de muflón europeo	94
Anexo 3: Histopatología	95
Anexo 4: Protocolo de inmunohistoquímica para detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	96
Anexo 5: Extracción de DNA	98
Anexo 6: Biología molecular	99
Anexo 7: Soluciones	101

Lista de cuadros

	Página
Cuadro 1. Frecuencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en animales domésticos de México.	13
Cuadro 2. Frecuencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en fauna silvestre de México.	16
Cuadro 3. Frecuencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>).	19
Cuadro 4. Eliminación de ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> en felinos silvestres neotropicales.	20
Cuadro 5. Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en felinos silvestres.	21
Cuadro 6. Frecuencia de infección por <i>Toxoplasma gondii</i> en felinos silvestres de zoológicos de la Ciudad de México.	23
Cuadro 7. Aislamientos y genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> identificados en felinos silvestres en cautiverio y en vida libre a nivel mundial.	24
Cuadro 8. Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> en animales de México a partir de muestras clínicas y aislamientos.	25
Cuadro 9. Iniciadores y sonda para el gen <i>B1</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> .	34
Cuadro 10. Iniciadores empleados para la amplificación de DNA (PCR) de <i>Toxoplasma gondii</i> y enzimas de restricción utilizadas para genotipificación (RFLP).	37
Cuadro 11. Inmunohistoquímica de tejidos de herbívoros y carnívoros.	50
Cuadro 12. Resultados de PCR tiempo real para <i>Toxoplasma gondii</i> .	52
Cuadro 13. Resultados consolidados de PCR para los diferentes marcadores empleados.	62

Listado de Figuras

	Página
Figura 1. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	1
Figura 2. Estructura genética de los aislamientos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	5
Figura 3. Ciclo sexual de <i>Toxoplasma gondii</i> .	7
Figura 4. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .	9
Figura 5. Muflón europeo macho (<i>Ovis musimon</i>)	18
Figura 6. Comparación de absorbancias de los diferentes conjugados a peroxidasa (Dilución 1:10,000) probados con sueros de muflón y especies homólogas al conjugado.	39
Figura 7. Comparación de absorbancias de las diferentes diluciones del conjugado anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa.	40
Figura 8. Absorbancias de los sueros de las 3 cabras positivas (líneas rojas), las 3 negativas (líneas azules) y algunas muestras séricas de los muflones .	40
Figura 9. Distribución de frecuencias para los IR de los herbívoros del primer muestreo.	41
Figura 10. Distribución de frecuencias de los IR de los muflones del segundo muestreo.	42
Figura 11. Correlación de los IR de los muflones del primero y segundo muestreo.	42
Figura 12. Tiras de nitrocelulosa con bandas inespecíficas en muestras de muflones.	43
Figura 13. Cambios macroscópicos en encéfalo y riñones de los felinos silvestres.	45
Figura 14. Principales cambios patológicos en los herbívoros.	47
Figura 15. Hallazgos microscópicos relacionados con enfermedad neurodegenerativa, encefalopatía espongiiforme renal y enfermedad por acumulación lisosomal.	49
Figura 16. Inmunohistoquímica para la detección de <i>T. gondii</i> en tejidos de herbívoros y carnívoros silvestres.	51

Figura 17. Amplicones de la secuencia repetitiva de 529 pb de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>) y león africano (<i>Panthera leo</i>).	53
Figura 18. Amplicones de la secuencia repetitiva de 529 pb de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de tejido de león africano (<i>Panthera leo</i>).	54
Figura 19. Amplicones del gen <i>B1</i> (362 pb) de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>) y león africano (<i>Panthera leo</i>).	54
Figura 20. Amplicones del gen <i>GRA6</i> de 344 pb de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>).	55
Figura 21. Amplicones del gen <i>GRA6</i> de 512 pb de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de león africano (<i>Panthera leo</i>).	55
Figura 22. Amplicones del gen <i>SAG3</i> de 311 pb de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>) y león africano (<i>Panthera leo</i>).	56
Figura 23. Amplicones del gen <i>SAG2</i> alternativo de 311 pb de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>) y león africano (<i>Panthera leo</i>).	56
Figura 24. Amplicones del gen <i>GRA7</i> de 843 pb de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>) y león africano (<i>Panthera leo</i>).	57
Figura 25. PCR-RFLP para el gen <i>SAG2</i> alternativo a partir de tejidos positivos de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>).	58
Figura 26. PCR-RFLP para el gen <i>SAG2</i> alternativo a partir de tejidos positivos de león africano (<i>Panthera leo</i>).	58
Figura 27. PCR-RFLP para el gen <i>SAG3</i> de 311 pb a partir de tejidos positivos de muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>).	59
Figura 28. PCR-RFLP para el gen <i>SAG3</i> (311 pb) a partir de tejidos positivos de león africano (<i>Panthera leo</i>).	59
Figura 29. PCR-RFLP para el gen <i>SAG3</i> (225 pb) a partir de tejidos	60

positivos de muflón europeo (*Ovis musimon*).

Figura 30. PCR-RFLP para el gen *SAG3* (225 pb) a partir de tejidos positivos de león africano (*Panthera leo*). 60

Figura 31. PCR-RFLP para el gen *GRA6* (512 pb) a partir de bazo de león africano (*Panthera leo*). 61

1. Introducción

1.1 Generalidades

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado del Phylum Apicomplexa, capaz de invadir cualquier célula nucleada de mamíferos y aves (Montoya y Liesenfeld, 2004).

Su nombre deriva de las palabras griegas *toxon*, que significa “arco” y *plasma*, que significa “forma”, refiriéndose a la forma arqueada del citoesqueleto que presenta la fase de taquizoíto (**Figura 1**) (Nicolle y Manceaux, 1909).

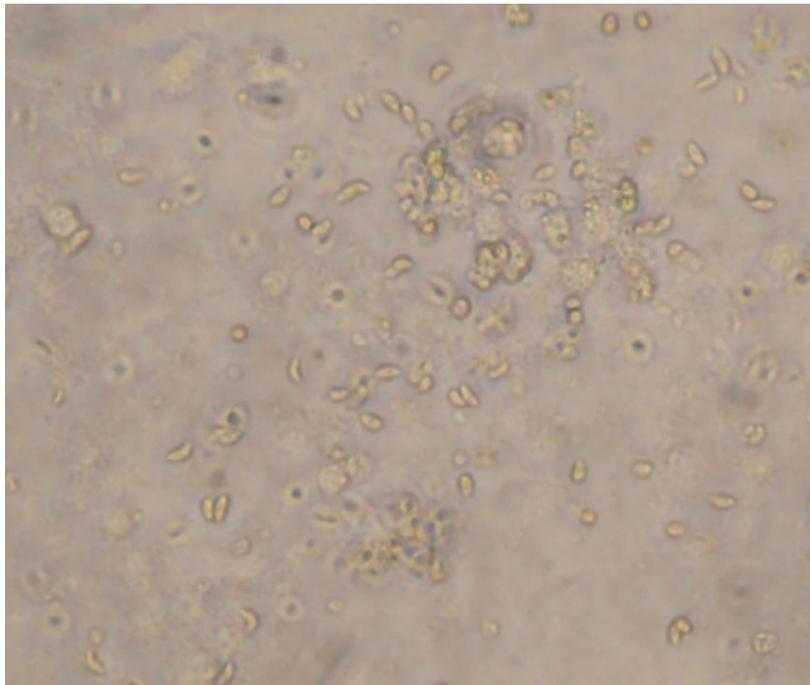


Figura 1. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Cultivo de células VERO donde se pueden observar estructuras libres de aspecto “arqueado”. Foto: Luis Fernando Valenzuela Moreno. Suspensión de taquizoítos en PBS, 400x

La prevalencia de la infección por *T. gondii* varía considerablemente en distintas partes del mundo, dependiendo principalmente de las condiciones climáticas y culturales de una región (Tenter et al., 2000). La dispersión de este protozooario se debe en parte a las múltiples posibilidades de transmisión, pues los hospederos intermediarios herbívoros pueden infectarse por contacto con forrajes, agua o tierra contaminados con ooquistes y los carnívoros por el consumo de carne

infectada con quistes tisulares o por agua contaminada con ooquistes. Los omnívoros, como el ser humano y el cerdo, tienen muchas posibilidades de contagio, ya que presentan los riesgos de los herbívoros y los carnívoros (Tenter et al., 2000). La susceptibilidad a la presentación clínica de la enfermedad varía dependiendo de la especie, ya que algunas raramente desarrollan la toxoplasmosis, mientras que otras son particularmente susceptibles, en muchas ocasiones con consecuencias fatales. Las infecciones por *T. gondii* en animales de zoológico son de particular interés, porque varias especies de animales en cautiverio mueren de toxoplasmosis aguda, como los gatos de Pallas (*Felis manul*), los marsupiales australianos, los canarios (*Serinus canaria*), las suricatas (*Suricata suricatta*), los monos del Nuevo Mundo y los lémures (Bermúdez et al., 2009; Tenter et al., 2000). Los signos clínicos pueden variar entre especies, pero principalmente son diarrea, dificultad respiratoria, emaciación, ceguera, problemas neurológicos y muerte súbita (Miller et al., 2003).

1.2 Antecedentes históricos

Toxoplasma gondii fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux, en bazo, hígado y sangre de gundis (*Ctenodactylus gundi*), roedores del norte de África. En el mismo año, Splendore descubrió al protozooario en tejidos de conejos de laboratorio en Brasil y Darling en Panamá, identificó quistes tisulares en humanos, denominándolos *Sarcosporidis* en ese tiempo. Nicolle y Manceaux denominaron al género *Toxoplasma* debido a la morfología que presentan los protozoarios y *gondii* por el animal en el que lo encontraron (Black y Boothroyd, 2000; Kim y Weiss, 2009; Nicolle y Manceaux, 1909; Sukthana, 2006; Tenter et al., 2000).

1.3 Biología

Toxoplasma gondii pertenece al Phylum Apicomplexa (protozoarios que presentan complejo apical), Clase Aporozoasida, Subclase Coccidiasina, Orden Eucoccidiorida y Familia Sarcocystidae; describiéndose solamente una especie para el género (Montoya y Liesenfeld, 2004). Este Phylum de protozoarios abarca

más de 5000 especies de parásitos intracelulares obligados, donde se encuentran otros protozoarios responsables de desarrollar enfermedad en animales y humanos, como son *Plasmodium*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cyclospora*, *Theileria* y *Eimeria* entre otros (Gardiner, 1988; Khan et al., 2005; Nishi et al., 2008; Saeij et al., 2005; Sibley, 2003).

La patogenicidad de *T. gondii* varía como consecuencia de su virulencia y del estadio y dosis infectiva, así como del estado de salud y el fondo genético del hospedero (Dubey et al., 2004; Pena et al., 2008). La virulencia se debe a su capacidad de invadir células, dividirse y causar lisis tisular. Ciertos alelos de genes relacionados con estos fenómenos (*β-TUB*, *GRA6*, *SAG2*, *SAG3*) tradicionalmente han sido marcadores genéticos de virulencia. Con base en estudios realizados a partir de aislamientos en Europa y Norteamérica, *T. gondii* había sido clasificado como una sola especie con diversas variantes, denominadas como genotipos I, II, III, atípicos y recombinantes (Howe y Sibley, 1995; Khan et al., 2005; Saeij et al., 2006). La clasificación de los diferentes tipos de *T. gondii* se basó en un principio en sus características biológicas *in vivo* en ratones e *in vitro* en cultivo celular. Los de tipo I son los más virulentos en ratones y tienden a generar casos clínicos de toxoplasmosis humana con infecciones oculares severas (Barragán y Sibley, 2003; Boothroyd y Grigg, 2002; Dardé et al., 1992; Dardé, 2004; Saeij et al., 2005; Zenner et al., 1999). Los parásitos tipo II se aislan frecuentemente de humanos, borregos y gatos y son poco virulentos en ratones; establecen infecciones crónicas pronto después de la infección (Dardé et al., 1992; Dardé, 2004; Zenner et al., 1999). Las variantes con genotipo III principalmente se habían obtenido de animales silvestres y en casos raros de humanos (Dardé, 2004); su virulencia es variable en animales y humanos y pueden ocasionar enfermedad en los casos congénitos (Dubey et al., 2004; Howe, Honoré et al., 1997). Los genotipos recombinantes y atípicos se consideraban raros y representan el 5-10% de las líneas clonales del mundo (Boothroyd y Grigg, 2002). Khan et al. (2007) al analizar 46 cepas de referencia principalmente de América y Europa, propusieron 11

marcadores genéticos nucleares, los cuales permiten agrupar a la mayoría de los aislamientos en 11 haplogrupos. Posteriormente, se describió un cuarto linaje clonal prevalente en fauna silvestre de Norteamérica, el haplogrupo 12 (Khan, et al., 2011a). Más recientemente, el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de 8 intrones en 5 genes, de varios aislamientos (incluyendo atípicas y de Sudamérica) permitió agrupar a todas las cepas en 15 haplogrupos, con los linajes clásicos designados como haplotipos I, II y III y las cepas atípicas distribuidas entre los haplogrupos 4–15 (Dubey et al., 2011; Khan et al., 2007; Khan et al., 2011a; Khan et al., 2011b; Mercier et al., 2010; Minot et al., 2012; Rajendran et al., 2012; Wendte et al., 2011). Los análisis posteriores indicaron que los haplogrupos pudieron haberse derivado de la combinación de 6 cepas ancestrales. Estos 15 haplogrupos tienen distinta distribución geográfica: 1-3, 7, 11 y 12 están confinados principalmente en Norteamérica y Europa; los grupos 4, 5, 8-10 en Sudamérica; el 13 en Asia y el 14 y el 15 en África (Gabón). El haplogrupo 6 se encuentra distribuido mundialmente (Minot et al., 2012). Recientemente (Su et al., 2012) usaron los 3 métodos principales de genotipificación de *T. gondii* (PCR-RFLP, microsatélites y secuenciación de marcadores de intrones de genes altamente conservados) y analizaron 956 aislamientos de todo el mundo equivalentes a 138 genotipos diferentes, los cuales fueron agrupados en 6 clados. El clado “A” es el grupo con la distribución más amplia y descrito previamente en África (haplogrupos 6 y 14), Sudamérica (haplogrupo 6) y Norteamérica (haplogrupo 1); aparentemente estos haplogrupos comparten un ancestro en común. El clado “B” está compuesto por los haplogrupos 4 y 8 y está casi exclusivamente confinado a Sudamérica; estos haplogrupos han sido asociados previamente a enfermedad ocular en los seres humanos (Khan et al., 2006). El clado “C” contiene al haplogrupo 3, mientras que el clado “D” comprende dos grupos clonales relacionados, el 2 y el 12 y muestra el nivel más alto de divergencia. El clado “E” contiene al haplogrupo 9 y el clado “F” es el más diverso genéticamente, compuesto por cepas aisladas previamente de la región del amazonas de la Guyana Francesa (haplogrupos 5 y 10) y un grupo único de

1.4 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* es indirecto, esto significa que necesita dos huéspedes para completar su desarrollo, uno definitivo que puede ser cualquier miembro de la familia Felidae (felinos domésticos y silvestres) y uno intermediario que puede ser cualquier animal de sangre caliente, incluido el ser humano (Dubey, 2009; Tenter et al., 2000).

En el intestino de los huéspedes definitivos se desarrolla la fase sexual, típica de todas las coccidias, que culmina con la producción de millones de esporozoitos contenidos en ooquistes que se liberan al medio. En los huéspedes intermediarios se efectúa la fase de reproducción extra-intestinal o asexual que culmina con la producción de quistes tisulares, repletos de bradizoitos; ambas formas son infectantes (Bowman, 2008; Dubey, 2009; Levine, 1988).

La reproducción sexual (**Figura 3**) tiene básicamente tres fases, dos que se desarrollan en el intestino delgado de los felinos, que reciben el nombre de esquizogonia y gametogonia y una fase que sucede en el ambiente conocida como esporogonia (Bowman, 2008; Dubey, 1998; Smith et al., 2002). De estas tres fases, la más patógena para el gato es la esquizogonia debido a que es una fase de reproducción asexual muy activa que destruye células intestinales del hospedero (Greene, 2011); la gametogonia es una forma de reproducción sexual en la que se forman los gametos femeninos (macrogametocitos) y masculinos (microgametocitos) que al fusionarse, forman el gamonte, una estructura que dará origen al ooquiste no esporulado (no infectante) que se libera al ambiente con las heces. Si las condiciones de humedad y temperatura son apropiadas, el ooquiste comienza una fase de esporulación (esporogonia), volviéndose infectante entre 24 y 48 horas después (Bowman, 2008; Smith et al., 2002).

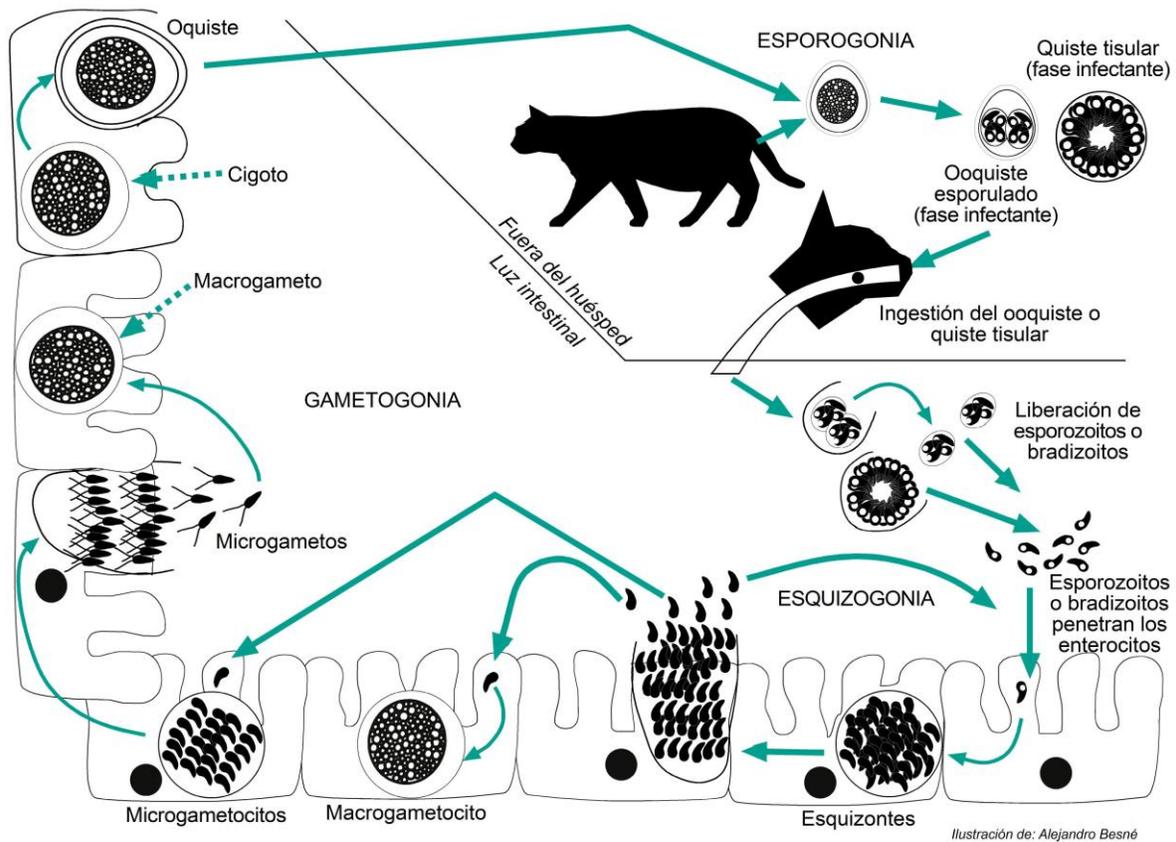


Figura 3. Ciclo sexual de *Toxoplasma gondii*. La esquizogonia se repite hasta 5 veces, antes de que los esquizontes se vuelvan microgametocitos (masculinos) o macrogametocitos (femeninos). La esporogonia se realiza en 24 a 48 horas dependiendo de la temperatura y la humedad ambiental. Ilustración original de Besné, 2004.

Una vez que el ooquiste esporula, puede ser ingerido por otro huésped; si éste es intermediario, los esporozoitos contenidos en los ooquistes atravesarán la pared intestinal y se diferenciarán a un estadio denominado taquizoíto, el cual se divide de manera rápida dentro de una vacuola parasitófora de cualquier célula nucleada por un mecanismo llamado endodiogenia, proceso en el que se forman dos células hijas en el interior de la célula madre usando los organelos y el citoesqueleto de ésta, para después separarse (Black y Boothroyd, 2000; Hu et al., 2006). Los taquizoítos se reproducen dentro de la célula huésped hasta destruirla y una vez liberados invaden otras células y repiten el proceso, el cual continúa hasta que el sistema inmune detiene la invasión (Black y Boothroyd, 2000; Dubey, 1998). En este punto, el parásito cambia nuevamente de forma, esta vez a un estadio denominado bradizoíto, que es una estructura similar al taquizoíto pero de

reproducción lenta. Los bradizoítos forman quistes principalmente en músculo estriado esquelético y cardiaco, sistema nervioso central, linfonodos, bazo, hígado y ojos, pero pueden hacerlo en cualquier otro tejido, permaneciendo ahí por el resto de la vida del huésped infectado (Dubey, 1998; Tenter et al., 2000). Estos fenómenos también ocurren en los felinos simultáneamente al proceso de reproducción sexual en el intestino (Dubey, 2009).

Es en esta fase del ciclo cuando el estado inmunitario del huésped infectado cobra importancia, ya que si éste es inmunocompetente la reproducción de los taquizoítos se detendrá y éstos se diferenciarán en bradizoítos para formar los quistes (fase crónica de la infección). Pero si el sistema inmune está deprimido, la reproducción rápida de los taquizoítos (fase aguda de la infección), llevará a un estado crítico de destrucción tisular que puede, incluso, causarle la muerte al huésped (Greene, 2011; Tenter et al., 2000).

El ciclo se completa cuando algún huésped potencial ingiere cualquiera de las fases mencionadas (**Figura 4**):

- Ooquistes: fase resistente al ambiente resultante de la reproducción sexual en el intestino delgado de los felinos, típica de las coccidias (gametogonia).
- Taquizoítos: Fase de reproducción asexual rápida que se encuentra en la etapa aguda de la enfermedad.
- Bradizoítos: Fase de reproducción asexual lenta que se encuentra en la etapa crónica de la enfermedad.

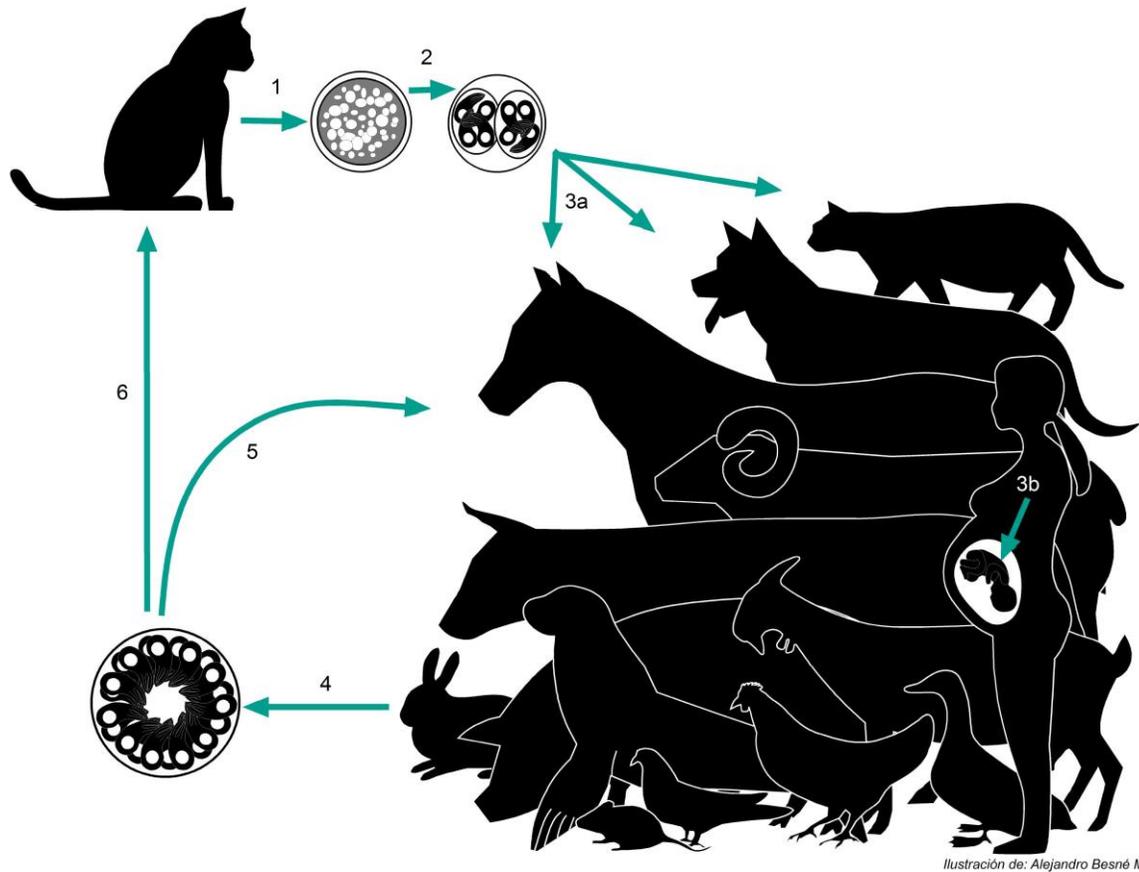


Figura 4. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. (1) Eliminación del oociste no esporulado, (2) Esporulación del oociste, (3a) Ingestión del oociste esporulado y comienzo de la reproducción sexual y asexual, (3b) transmisión placentaria, (4) Formación de los quistes tisulares, (5 y 6) ingestión del quiste tisular. Ilustración original de Besné, 2004.

1.5 Transmisión

Existen tres formas principales de transmisión de *T. gondii*, dos horizontales, por ingestión de tejidos con quistes y consumo de alimento o agua contaminada con oocistes y una vertical transplacentaria (Dubey, 2009; Montoya y Liesenfeld, 2004; Tenter et al., 2000). También hay informes de infección ocasionada por trasplante de órganos y por consumo de leche sin pasteurizar (Tenter et al., 2000). Los felinos tanto domésticos como silvestres son muy importantes dentro de la cadena epidemiológica de *T. gondii*, debido a que son los únicos que eliminan oocistes en las heces. Sin embargo, el periodo de eliminación de éstos, que en general es de 3 a 18 días, varía según la fase ingerida y el estado inmunológico del felino, siendo más largo cuando la infección se origina por quistes tisulares y

más corto cuando fueron ingeridos ooquistes esporulados (Dubey y Carpenter, 1993; Dubey, 1998; Greene, 2011).

1.6 Diagnóstico

La infección por *T. gondii* puede ser diagnosticada mediante métodos biológicos, serológicos, histopatológicos y moleculares o por combinación de éstos. Los signos clínicos ocasionados por la toxoplasmosis no son específicos de especie y no pueden ser usados para el diagnóstico definitivo de la enfermedad.

Pruebas directas

El diagnóstico rápido puede ser realizado mediante examinación microscópica de improntas de tejido teñidas con Giemsa. *Toxoplasma gondii* tiene forma de “coma” o de “plátano” en tejidos bien preservados y se tiñen bien con cualquier tinción tipo Romanowsky. Los quistes tisulares son encontrados ocasionalmente en áreas con lesiones. La inmunohistoquímica (IHQ) puede ayudar a confirmar el diagnóstico en tan solo unas cuantas horas. Encontrar taquizoítos en el tejido es indicador de una infección activa, sin embargo encontrar quistes tisulares es indicador de una infección crónica latente y no necesariamente es diagnóstica de infección en curso. En el caso de la IHQ es mejor usar anticuerpos policlonales que monoclonales, ya que los primeros tienen la ventaja de identificar múltiples antígenos o epitopos de los antígenos (Ramos-Vara, 2005).

En algunas ocasiones se puede intentar el aislamiento de este protozooario a partir de secreciones, excreciones, fluidos corporales o tejidos colectados en biopsias de pacientes con diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis, inoculando dicho material biológico en animales de laboratorio y/o cultivos celulares (Dubey, 2009).

Detección del DNA de *T. gondii*. Dada la alta sensibilidad de la PCR en tiempo real comparada con la PCR en punto final, se emplea de manera rutinaria para el diagnóstico molecular de *T. gondii*. La ventaja de la PCR en tiempo real es que además de detectar el DNA de un solo taquizoíto, también puede cuantificar el DNA del parásito por mg de tejido (Dubey, 2009). Hay diferentes marcadores genéticos para la detección de DNA de *T. gondii*, pero el gen *B1* y un fragmento

de 529 pb, con 35 copias y 300 copias respectivamente en el genoma del parásito, son los usados más frecuentemente. Este último fragmento es 10-100 veces más sensible que el primero (Dubey, 2009).

Pruebas indirectas

Se han utilizado varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos de clase IgG e IgM contra *T. gondii*: Sabin-Feldman (DT), hemoaglutinación indirecta (IHA), inmunofluorescencia indirecta (IFAT), aglutinación modificada (MAT), aglutinación en látex (LA), inmunoensayo enzimático (ELISA) y fijación de complemento (CF). De todas éstas, IFAT, ELISA y MAT han sido modificadas para la detección de inmunoglobulinas clase IgM. El western blot es otra prueba serológica usada para confirmación de casos sospechados por alguna otra.

1.7 Toxoplasmosis en animales de México

Se han realizado varios estudios en diversos estados del país (Colima, Puebla, Durango, Oaxaca, Yucatán) para la detección de anticuerpos contra *T. gondii* en animales domésticos (conejos, gallinas, gatos, perros, borregos, cabras, caballos, cerdos; **Cuadro 1**), silvestres (zarigüeyas, cacomixtles, zorrillos, comadreja, ardillas, venados cola blanca, ocelotes, delfines, lobos marinos, manatíes, pumas, aves silvestres, monos ardillas, ratones) y especies en cautiverio pertenecientes a tres zoológicos de la ciudad de México (**Cuadro 2**), usando diversas técnicas (ELISA, IFAT, LAT, MAT).

Dubey et al., (2004b) evaluaron la presencia de *T. gondii* en 208 gallinas (*Gallus domesticus*) de la ciudad de México, siendo positivas 13 (6.2%). Figueroa-Castillo et al., (2006) determinaron anticuerpos contra *T. gondii* en sueros de conejos provenientes de tres granjas con diferentes niveles de tecnificación (Ciudad de México, Estado de México y Puebla). De 286 animales evaluados se detectaron anticuerpos en 77 de ellos (26.9%). La seroprevalencia en gatos domésticos se ha determinado en diferentes estados de la República Mexicana. En la capital de Jalisco, 59 gatos y sus propietarios fueron evaluados por ELISA; 24 felinos (40.6%) y 38 propietarios (64%) presentaron anticuerpos IgG anti-*T. gondii*

(Ramírez, 1999). En Colima, se evaluaron 80 sueros de gatos domésticos de diferentes zonas de la ciudad, encontrando 28.8% de prevalencia mediante ELISA (García-Márquez et al., 2007). En Durango, la detección de *T. gondii* en sueros de 105 gatos domésticos, por aglutinación modificada, evidenció una seroprevalencia del 21% (Alvarado-Esquivel et al., 2007). Dos años más tarde Dubey et al., (2009) muestrearon perros (*Canis familiaris*), gatos (*Felis catus*), zarigüeyas (*Didelphis virginiana*), ratas (*Rattus spp.*), ratones (*Mus musculus*) y ardillas (*Spermophilus variegatus*) del mismo estado. De 150 perros muestreados, 68 (45.3%) presentaron anticuerpos contra *T. gondii*, 14/150 (9.3%) gatos, 11/66 (16.6%) zarigüeyas, 2/249 (0.8%) ratas, 4/127 (3.1%) ratones y 0/69 ardillas determinados mediante aglutinación modificada en placa. Por su parte Besné-Mérida et al., (2008) determinaron la frecuencia de anticuerpos IgG en 169 gatos de la Ciudad de México por ELISA, encontrando 37 (21.8%) seropositivos.

Caballero-Ortega et al., (2008a) encontraron 29.1% de borregos infectados con *T. gondii* del estado de Colima, mientras que en una granja experimental en la frontera del estado de Puebla con Veracruz encontraron una frecuencia del 77% en esta misma especie (Caballero-Ortega et al., 2008b).

Suzán y Ceballos (2005) determinaron la prevalencia de algunos agentes infecciosos, incluyendo *T. gondii*, en animales silvestres y ferales de dos áreas naturales protegidas dentro de los límites de la Ciudad de México. De 68 individuos capturados incluyendo zarigüeyas (*Didelphis virginiana*), cacomixtles (*Bassariscus astutus*), zorrillos moteados (*Spilogale gracilis*), comadrejas (*Mustela frenata*), ardillas (*Spermophilus variegatus* y *Sciurus aureogaster*), gatos (*Felis catus*) y perros (*Canis familiaris*) ferales, la seroprevalencia de *T. gondii* global fue de 23.9%. Los perros y los gatos ferales fueron los que presentaron mayor frecuencia de infección (67%).

En Durango la prevalencia de anticuerpos anti-*T.gondii* en 562 cabras de dos zonas geográficas (montaña y semidesierto) fue de 31% (Alvarado-Esquivel et al., 2011a). En cerdos del mismo estado, 136 de 1074 suinos fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra *T. gondii* resultando una frecuencia del 12.7% (Alvarado-Esquivel et al., 2011b). Finalmente, en 3 instalaciones con mamíferos

marinos en cautiverio que se localizan en Quintana Roo y en la Ciudad de México, se muestrearon 75 especies incluidos el delfín nariz de botella del Atlántico (*Tursiops truncatus truncatus*), delfín nariz de botella del Pacífico (*Tursiops truncatus gillii*), lobo marino de California (*Zalophus californianus*), manatíes (*Trichechus manatus*) y lobos marinos de la Patagonia (*Otaria flavescens*); de ellos, 60 (80%) resultaron positivos por MAT, encontrando animales positivos en los tres sitios; esta es la primera publicación sobre toxoplasmosis en mamíferos marinos de México (Alvarado-Esquivel et al., 2012c). El resto de los trabajos realizados en México se encuentran resumidos en los cuadros 1 y 2.

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

Estado	Especie	Frecuencia	Técnica	Referencia
Morelos		55%		
San Luis Potosí	Borregos (<i>Ovis aries</i>)	39%	IFAT	(García-Vázquez et al., 1990)
Guanajuato		20%		
Morelos	Borregos (<i>Ovis aries</i>)	37.9% (266/702)	IFAT	(Cruz-Vázquez et al., 1992)
Morelos	Cerdos (<i>Sus scrofa</i>)	8.9% (107/1203)		
Estado de México	Cabras (<i>Capra hircus</i>)	3.2% (23/707)	ELISA	(García-Vázquez, 1993)
	Vacas (<i>Bos taurus</i>)	11.8% (47/397)		
Jalisco	Gato (<i>Felis catus</i>)	40.6% (24/59)	ELISA	(Ramírez, 1999)
	Humanos	64% (38/59)		
Ciudad de México	Perros ferales (<i>Canis familiaris</i>)	66.6% (2/3)	CF	(Suzán y Ceballos, 2005)
	Gatos ferales (<i>Felis catus</i>)	66.6% (4/6)		
Ciudad de México	Vacas (<i>Bos taurus</i>)	16.6% (6/36)	IHA	(Córdoba-Izquierdo et al., 2005)
Estado de México		18.7%		
Ciudad de México	Conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	39.7%	ELISA	(Figueroa-Castillo, 2006)
Puebla		33.3%		

Durango	Perros (<i>Canis familiaris</i>)	51.5% (52/105)	MAT	(Dubey et al., 2007)
Durango	Gatos (<i>Felis catus</i>)	21% (22/105)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2007)
Colima	Gatos (<i>Felis catus</i>)	28.8% (23/80)	ELISA	(García-Márquez et al., 2007)
Colima	Borregos (<i>Ovis aries</i>)	29.1% (102/351)	ELISA	(Caballero-Ortega et al., 2008b)
Ciudad de México	Gatos (<i>Felis catus</i>)	21.8% (37/169)	ELISA	(Besné-Mérida et al., 2008)
Puebla – Veracruz	Borregos (<i>Ovis aries</i>)	77-84%	ELISA	(Caballero-Ortega et al., 2008a)
Durango	Perros (<i>Canis familiaris</i>)	45.3% (68/150)	MAT	(Dubey et al., 2009)
	Gatos (<i>Felis catus</i>)	9.3% (14/150)		
Durango	Cabras (<i>Capra hircus</i>)	31% (174/562)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2011a)
Durango	Cerdos (<i>Sus scrofa</i>)	12.7% (136/1074)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2011b)
Oaxaca	Perros ferales (<i>Canis familiaris</i>)	61.7% (95/154)	ELISA	(Cedillo-Peláez et al., 2012)
Oaxaca	Cerdos (<i>Sus scrofa</i>)	11.2% (59/525)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2012c)
Durango	Borregos (<i>Ovis aries</i>)	15.1% (77/511)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2012a)
Durango	Caballos (<i>Equus caballus</i>)	6.1% (30/495)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2012b)
Yucatán	Gatos (<i>Felis catus</i>)	IgM 75.5% (166/220) IgG 91.8% (202/220) PCR 79% (172/220)	ELISA, PCR	(Castillo-Morales et al., 2012)
Oaxaca	Borregos (<i>Ovis aries</i>)	23.1% (99/429)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al.,

				2013a)
Michoacán	Cabras (<i>Capra hircus</i>)	15.2% (52/341)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2013b)
Durango	Conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	16.3% (70/429)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2013d)
Yucatán	Cerdos (<i>Sus scrofa</i>)	IgM 92.5% (397/429) ----- IgG 95.8% (411/429) ----- PCR 50.8% (218/429)	ELISA, PCR	(Ortega-Pacheco, 2013)
Michoacán	Borregos (<i>Ovis aries</i>)	29.9% (121/405)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2013e)

IFAT: Inmunofluorescencia indirecta; ELISA: Inmunoensayo enzimático; CF: Fijación de complemento; IHA: Hemoaglutinación indirecta; MAT: Prueba de aglutinación modificada; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

1.8 Toxoplasmosis en fauna silvestre de México

En especies silvestres, la toxoplasmosis se ha descrito de forma clínica o subclínica en una amplia gama de huéspedes, carnívoros, herbívoros en cautiverio y de vida libre, y aves. Algunos taxones presentan resistencia aparente a la enfermedad, como los primates del Viejo Mundo, mientras que otros se consideran susceptibles como los marsupiales australianos, en los cuales por lo general la infección por *T. gondii* conlleva a la muerte (Dubey et al., 2004; Hill et al., 2007; Fowler, 2003). Por ejemplo, se ha reportado toxoplasmosis aguda en primates del Nuevo Mundo y wallabies (Basso et al., 2007; Bermúdez et al., 2009; Dubey y Crutchley, 2008; Fernández-Aguilar et al., 2013; Hermosilla et al. 2010; Johnson et al., 1989; Portas, 2010) o toxoplasmosis diseminada en suricatas y lémures (Basso et al., 2009; Juan-Sallés et al., 1997; Juan-Sallés et al., 2011; Spencer et al., 2004). Sin embargo, dichas presentaciones no son específicas de cada familia de animales afectados, pudiéndose presentar otros cuadros clínicos en las mismas especies o bien desarrollarse de manera asintomática y presentarse mortalidad asociada a otra etiología. Se han realizado estudios en diversos

estados de México, tanto en animales silvestres como en cautiverio y se han reportado frecuencias variables (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre de México

Estado	Especie	Frecuencia	Técnica	Referencia
Ciudad de México	Zarigüeya (<i>Didelphis virginiana</i>)	10.3% (3/29)	FC	(Suzán y Ceballos, 2005)
	Ardillas (<i>Spermophilus variegatus</i> , <i>Sciurus aureogaster</i>)	0% (0/2)		
	Cacomixtle (<i>Bassariscus astutus</i>)	20% (4/20)		
	Zorrillo moteado (<i>Spilogale gracilis</i>)	50% (3/6)		
	Comadreja (<i>Mustela frenata</i>)	0% (0/1)		
Jalisco	Monos Ardilla (<i>Saimiri aciureus</i>)	92% (23/25)	Histopatología	(Martínez y Avilés, 2007)
Durango	Zarigüeyas (<i>Didelphis virginiana</i>)	16.6% (11/66)	MAT	(Dubey et al., 2009)
	Ratas (<i>Rattus</i> spp)	0.8% (2/249)		
	Ratones (<i>Mus musculus</i>)	3.1% (4/127)		
	Ardillas (<i>Spermophilus variegatus</i>)	0% (0/69)		
Durango	Aves silvestres (19 especies)	2.6% (17/653)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2011C)
Ciudad de México	Monos ardilla (<i>Saimiri aciureus</i>)	100% (2/2)	Histopatología, MET, PCR	(Cedillo-Peláez et al., 2011)
Ciudad de México y Quintana Roo	Delfín nariz de botella del Atlántico (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	87.3% (55/63)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2012D)
	Delfín nariz de	100% (3/3)		

	botella del Pacífico (<i>Tursiops truncatus gillii</i>)			
	Lobo Marino de California (<i>Zalophus californianus</i>)	50% (2/4)		
	Manatíes (<i>Trichechus manatus</i>)	0% (0/3)		
	Lobos Marinos de la Patagonia (<i>Otaria flavescens</i>)	0% (0/2)		
Coahuila	Venados Cola	16.3%		
Tamaulipas	Blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	11.1%	ELISA y WB	(Olamendi-Portugal et al., 2012)
Nuevo León		6.3%		
Tamaulipas	Ocelote (<i>Leopardus pardalis</i>)	69.2% (18/26)	LAT	(Rendón-Franco et al., 2012)
Ciudad de México	167 mamíferos de 3 zoológicos	53.3% (89/167)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2013c)
Durango	Puma (<i>Puma concolor</i>)	1/1 100%	MAT, PCR	(Dubey et al., 2013)

FC: Fijación de complemento; MAT: Prueba de aglutinación modificada; MET: Microscopía electrónica de transmisión; ELISA: Inmunoensayo enzimático; WB: Western Blot; LAT: Aglutinación en látex; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

1.9 Toxoplasmosis en muflones

El muflón europeo (*Ovis musimon*) es un artiodáctilo de la familia bovidae que se encuentra en diversas partes de Europa. Es un borrego grande de cuerpo robusto y patas fuertes relativamente largas, adecuadas para brincar y correr sobre terrenos montañosos y rocosos. El muflón se extinguió hace milenios de este continente debido a la caza excesiva y quedó relegado a las islas de Córcega, Cerdeña y Chipre. Actualmente, ha sido reintroducido en diversas partes de Europa central y se distribuye en España, Francia, Italia, Alemania, Chipre, República Checa, Austria, Bulgaria y Croacia entre otros (**Figura 5**) (Álvarez et al., 2008).

Son pocos los estudios de seroprevalencia de toxoplasmosis realizados en esta especie. Los reportes existentes en la literatura se han llevado a cabo principalmente en Europa en países como República Checa, España y Francia y en América en un zoológico de la ciudad de México, donde se han encontrado frecuencias de 2.9% a 22.6% (**Cuadro 3**).



Figura 5. Muflón europeo macho (*Ovis musimon*)

Cuadro 3. Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en muflón europeo (*Ovis musimon*)

País	Frecuencia	Técnica	Referencia
República Checa	20% (2/10)	Sabin-Feldman dye test	(Hejlicek et al., 1997)
España	14.8% (4/27)	MAT	(Gauss et al., 2006)
República Checa y Eslovaquia	0% (0/1)	IFAT	(Sedlák y Bártová, 2006)
República Checa	2.9% (3/105)	IFAT	(Bartova et al., 2007)
Francia	22.6% (7/31)	MAT	(Aubert et al., 2010)
México	0% (0/2)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2013)

MAT: Prueba de aglutinación modificada; IFAT: Inmunofluorescencia indirecta

1.10 Toxoplasmosis en felinos silvestres

Los 15 géneros y 41 especies de felinos agrupados en las subfamilias *Felis* y *Panthera*, incluyendo al gato doméstico son huéspedes definitivos de *T. gondii*. Diversos estudios han demostrado la eliminación de ooquistes de manera natural o experimental en 6 de 8 especies de felinos neotropicales brasileños (Cañón-Franco, 2013), de los cuales cinco se distribuyen naturalmente en México: el ocelote (*Leopardus pardalis*), tigrillo (*Leopardus tigrinus*), jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), puma (*Puma concolor*) y jaguar (*Panthera onca*) (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Eliminación de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en felinos silvestres neotropicales

Especie	Positivos/Examinados	Tipo de infección	Referencia
Gato de Geoffroy (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	ND*	Natural	(Pizzi et al., 1978)
	1/1	Natural	(Lukesová y Literák, 1998)
Colocolo (<i>Leopardus colocolo</i>)	ND*	Natural	(Pizzi et al., 1978)
Ocelote (<i>Leopardus pardalis</i>)	2/2	Experimental	(Jewell et al., 1972)
	2/8	Natural	(Patton et al., 1986)
Jaguarundi (<i>Puma yagouaroundi</i>)	1/1	Experimental	(Jewell et al., 1972)
	ND*	Natural	(Pizzi et al., 1978)
	1/1	Experimental	(Miller et al., 1972)
Puma (<i>Puma concolor</i>)	1/2	Natural	(Marchiondo et al., 1976)
	1/16	Natural	(Aramini et al., 1998)
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	1/25	Natural	(Patton et al., 1986)

*ND: No definido

La cantidad de ooquistes eliminados por los felinos en las heces es grande, pero el diagnóstico es difícil dado el corto periodo de eliminación (aproximadamente 3 semanas) y el hecho de que las eliminaciones subsecuentes pueden ocurrir solo ocasionalmente (Dubey y Frenkel, 1972). La eliminación de ooquistes algunas veces está asociada con episodios de diarrea (Cañón-Franco, 2013).

Las dos vías clásicas de transmisión de *T. gondii* a los felinos comprenden la ingestión de quistes tisulares viables encontrados en casi todos los animales homeotermos y la contaminación de alimento y agua por ooquistes que son eliminados en las heces de otros felinos (Cañón-Franco, 2013). Los estudios seroepidemiológicos de toxoplasmosis en felinos silvestres muestran la extensa exposición al parásito en todo el mundo (**Cuadro 5**) y la mayoría de la información corresponde a zoológicos y centros de protección de fauna silvestre (Cañón-Franco, 2013). En los cuadros 6, 7 y 8 se muestran las prevalencias y los

principales aislamientos a partir de muestras de felinos silvestres de vida libre y en cautiverio.

En dos estudios a gran escala en zoológicos de Brasil se concluyó que alimentar felinos adultos con carne cruda en congelación durante menos de 7 días era un factor de riesgo para la infección y persistencia de *T. gondii* (André et al., 2010; Ramos Silva et al., 2007).

Cuadro 5. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en felinos silvestres

Especie	Localización	Técnica	Frecuencia	Condición
<i>Panthera</i> spp	Brasil	MAT, IFAT	100%	Cautividad
Tigre de Bengala (<i>Panthera tigris</i>)	Tailandia	LAT	27.8%	Cautividad
	USA	ELISA	75%	
	Varias áreas	IFAT	63.6%	
Tigre de Amur (<i>P. t. altaica</i>)	USA	MAT	27.8%	Cautividad
León africano (<i>Panthera leo</i>)	Brasil	IFAT, MAT	51.8% - 100%	Cautividad y vida libre
	Sudáfrica	IFAT, ELISA	90.2% - 100%	Vida libre
	Tailandia	LAT	14.3%	Cautividad
	USA	ELISA, MAT	54.5% - 100%	Cautividad
	Varias áreas	IFAT	80%	Cautividad
	Zimbabue	IFAT, MAT	92.3% - 100%	Vida libre
Leopardo (<i>Panthera pardus</i>)	Brasil	MAT	100%	Cautividad
	Bostwana	IFAT	100%	Vida libre
	Sur de África	IFAT	75%	Cautividad
	Sudáfrica	IFAT	86%	Vida libre
	Tailandia	LAT	15.8%	Cautividad
	USA	IFAT, ELISA, MAT	66.6%-100%	Cautividad
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Brasil	MAT, IFAT	63.2% - 100%	ND
	Guyana Francesa	MAT	100%	Vida libre
	Tailandia	LAT	33.3%	Cautividad
	USA	IFAT, MAT	100%	Cautividad
Leopardo de las nieves (<i>Panthera uncia</i>)	USA	MAT	35.7%	Cautividad
	Tailandia	LAT	100%	Cautividad
Lince rojo (<i>Lynx rufus</i>)	Canadá	MAT	40%	Vida libre
	México	LAT	66.6%	Vida libre
	USA	LAT, IFAT, MAT, DT	50% - 100%	Vida libre
Lince canadiense (<i>Lynx canadensis</i>)	Canadá	MAT	44%	Vida libre
	USA	IFAT	100%	Cautividad
Lince euroasiático	Canadá	ELISA, MAT	20% - 44%	Cautividad,

(<i>Lynx lynx</i>)	Suecia	MAT	75%	Vida libre Vida libre
Lince Ibérico(<i>Lynx pardinus</i>)	España	MAT, IHA, LAT	44% - 81.5%	Vida libre
Caracal (<i>Lynx caracal</i>)	USA	IFAT, MAT	50% - 100%	Cautividad
Chita (<i>Acinonix jubatus</i>)	Sur de África	IFAT	43.4%	Cautividad
	Tailandia	LAT	100%	
	USA	IFAT, IHA, MAT	27.3% - 77.7%	
Puma (<i>Puma concolor</i>)	Brasil	MAT, IFAT	48.3% - 100%	Cautividad
	Canadá	LAT, ELISA	7% - 34.8%	Vida libre, Cautividad
	Centro y Sudamérica	LAT	32.5%	Vida libre
	México	LAT	16.7%	Vida libre
	USA	LAT, IFAT, ELISA, MAT	9% - 92.3%	Vida libre y cautividad
Puma (<i>P. c. vancouverensis</i>)	Canadá (Isla de Vancouver)	IHA	100%	Vida libre
Gato de la jungla (<i>Felis chaus</i>)	Brasil	MAT	100%	Cautividad
Gato leopardo de Amur (<i>Felis bengalensis euphilurus</i>)	USA	MAT	100%	Cautividad
Gato del desierto (<i>Felis margarita</i>)	Emiratos Árabes Unidos	MAT	100%	Cautividad
Gato de Pallas (<i>Felis manul</i>)	Austria	MAT	100%	Cautividad
	USA	MAT, LAT	20% - 100%	
<i>Felis lynx</i>	USA (Alaska)	MAT	15.3%	Vida libre
Gato silvestre (<i>Felis silvestris</i>)	Reino Unido	IHA	62%	Vida libre
	España	MAT	50%	
Gato de Gordon (<i>F. s. gordonii</i>)	Emiratos Árabes Unidos	MAT	86.1%	Cautividad
Serval (<i>Leptailurus serval</i>)	Brasil	MAT	100%	Cautividad
	USA	ELISA, IFAT	33.3% - 50%	
Gato dorado asiático (<i>Catopuma temminckii</i>)	Tailandia	LAT	12.5%	NR
Gato pescador (<i>Prionailurus viverrinus</i>)	USA	MAT	25%	Cautividad
	Tailandia	LAT	22.2%	
Gato de Geoffroy (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	Bolivia (El Chaco)	ELISA	25%	Vida libre
	Brasil	MAT	75%	Cautividad
Colocolo (<i>Leopardus</i>)	Brasil	MAT	12.5%	NR

<i>colocolo)</i>				
<i>Leopardus spp</i>	Bolivia (El Chaco)	ELISA	100%	Vida libre
Ocelote (<i>Leopardus pardalis</i>)	Brasil	MAT, IFAT	57.7% - 80%	Cautividad
	USA	IFAT	100%	
Tigrillo (<i>Leopardus tigrinus</i>)	Brasil	MAT	51.9%	Cautividad
Margay (<i>Leopardus wiedii</i>)	Brasil	MAT	55.5%	Cautividad
Pantera nebulosa (<i>Neofelis nebulosa</i>)	USA	IFAT, MAT	14.3% - 50%	Cautividad
	Tailandia	LAT	12.5%	
Jaguarundi (<i>Puma yagouarundi</i>)	Brasil	MAT, IFAT	45.9% - 100%	Cautividad
	USA	ELISA	100%	

MAT: Prueba de aglutinación modificada; ELISA: Inmunoensayo enzimático; LA: Aglutinación en látex; IFAT: Inmunofluorescencia indirecta. Tomado y modificado de Dubey (2009).

En México solo hay un trabajo publicado sobre frecuencia de infección por *T. gondii* en 9 especies de felinos silvestres de zoológicos de la Ciudad de México (**Cuadro 6**), en el cual encontraron 35 de 43 (81.4%) felinos seropositivos (Alvarado-Esquivel et al., 2013).

Cuadro 6. Frecuencia de infección por *Toxoplasma gondii* en felinos silvestres en cautiverio de zoológicos de la ciudad de México

Especie	Frecuencia	Técnica	Referencia
Lince rojo (<i>Lynx rufus</i>)	100% (2/2)	MAT	(Alvarado-Esquivel et al., 2013)
Puma (<i>Puma concolor</i>)	100% (4/4)		
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	76.9% (10/13)		
Jaguarundi (<i>Puma jagouarundi</i>)	50% (1/2)		
Leopardo (<i>Panthera pardus</i>)	100 % (5/5)		
León Africano (<i>Panthera leo</i>)	100% (7/7)		
Ocelote (<i>Leopardus pardalis</i>)	66.6% (2/3)		
Tigrillo (<i>Leopardus tigrinus</i>)	0% (0/2)		
Tigre Sumatran (<i>Panthera tigris sumatrae</i>)	100% (2/2)		
Tigre de Bengala (<i>Panthera tigris</i>)	66.6% (2/3)		

Además de los estudios de seroprevalencia, se han logrado aislamientos a partir de tejidos de felinos silvestres tanto en cautiverio como de vida libre en los que se ha encontrado diversidad genética, dependiendo de la región (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Aislamientos y genotipos de *Toxoplasma gondii* identificados en felinos silvestres en cautiverio y vida libre a nivel mundial

Especie / Condición	Procedencia	Tipo de muestra	Genotipo (No. aislamientos)	Referencia
Lince rojo (<i>Lynx rufus</i>)	Estados Unidos / Vida libre	Encéfalo	ND (1)	(Walton y Walls, 1964)
	Estados Unidos / Vida libre	Corazón	II (5)	(Dubey et al., 2004)
	Estados Unidos / Vida libre	Lengua, músculo, corazón, encéfalo	X(2)	(Miller et al., 2008)
Gato silvestre europeo (<i>Felis silvestris silvestris</i>)	Alemania / Vida libre	Pulmón, encéfalo	II (1), I/II (3)	(Herrmann et al., 2012)
Puma (<i>Puma concolor vancouverensis</i>)	Canadá / Vida libre	Heces	I/II/III/u-1/u-2 (2)	(Aramini et al., 1998; Dubey, Quirk, y Pitt, 2008)
Puma (<i>Puma concolor</i>)	Estados Unidos / Vida libre	Lengua, músculo, corazón, encéfalo	X (5)	(Miller et al., 2008)
	México / Vida libre	Corazón	I/II/u-1(1)	(Dubey et al., 2013)
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Guayana Francesa / Vida libre	Corazón	X (1)	(Demar et al., 2008)
Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	Francia / Cautiverio	Corazón	II (1)	(Alerte, 2008)
Gato de arena (<i>Felis margarita</i>)	Emiratos Árabes Unidos y Qatar/ Cautiverio	Pulmón, hígado, riñón, músculo, corazón	I/II/III/u-1 (3) II (1)	(Dubey et al., 2010)
		Corazón, músculo, encéfalo	I/III/u-1 (1)	
Jaguarundi (<i>Puma yagouarundi</i>)	Brasil / Cautiverio	Corazón, músculo, encéfalo	I/III/u-1 (1)	(Pena et al., 2011)
	Brasil / Vida libre	Corazón, lengua, músculo, encéfalo, ojo, humor vítreo	I/II (1) I/III (1) I/II/III/u-1 (2)	(Cañón-Franco et al., 2013)
Tigrillo (<i>Leopardus tigrinus</i>)	Brasil / Cautiverio	Corazón, encéfalo	I/II/III/u-1 (1)	(Vitaliano, 2012)
	Brasil / Vida libre	Corazón, lengua, músculo, encéfalo, ojo, humor vítreo	I/II/III (1) I/III/u-1 (1) I/III/X/u-1 (1) I/II/III/u-1 (1)	(Cañón-Franco et al., 2013)
Gato de Geoffroy (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	Brasil / Vida libre	Corazón, lengua, músculo, encéfalo, ojo, humor vítreo	I/II/III/X/u-1 (1)	(Cañón-Franco et al., 2013)
Tigrillo o margay (<i>Leopardus wiedii</i>)	Brasil / Vida libre	Corazón, lengua, músculo, encéfalo, ojo, humor vítreo	I/III/u-1 (1) I/II/III/u-1 (1)	(Cañón-Franco et al., 2013)

ND: No determinado

1.11 Genotipificación de *T. gondii* en México

En México son pocos los trabajos que reportan la genotipificación de *T. gondii*. Se han realizado algunas caracterizaciones moleculares mediante PCR-RFLP a partir de aislamientos obtenidos de perros y gatos ferales de un centro antirrábico, palomas y un puma de Durango. En el valle de México, la tipificación de *T. gondii* se llevó a cabo a partir de aislamientos de gallinas domésticas, en un perro feral de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, así como de muestras clínicas de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) y wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*). En el estado de Hidalgo a partir de tejidos de un becerro y en Colima de un gato feral, (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Genotipos de *Toxoplasma gondii* en animales de México a partir de muestras clínicas y aislamientos

Estado	Especie	Genotipo	Referencia
Durango y Ciudad de México	Perro doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	Recombinante I y III Atípica* Tipo III	(Dubey et al., 2009)
	Gato doméstico (<i>Felis catus</i>)		
	Gallina doméstica (<i>Gallus domesticus</i>)		
Ciudad de México	Wallaby de Bennet (<i>Macropus rufogriseus</i>)	Tipo I**	(Cedillo-Peláez, 2009)
Hidalgo	Becerro (<i>Bos taurus</i>)	Tipo I**	(Chávez-Crisóstomo, 2010)
Ciudad de México y Colima	Gato Doméstico (<i>Felis catus</i>)	Tipo I (D.F.)** Tipo III (Colima)**	(Besné-Mérida, 2010)
Ciudad de México	Perro doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	Tipo I** Recombinante**	(Pacheco-Coronel, 2010)
Ciudad de México	Mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>)	Tipo I**	(Cedillo-Peláez et al., 2011)
Durango	Paloma (<i>Columba spp</i>)	Atípica*	(Alvarado-Esquivel et al., 2011)
Durango	Puma (<i>Puma concolor</i>)	Atípica	(Dubey et al., 2013)

*Mismo genotipo entre la paloma y uno de los gatos de Durango

**Genotipificación por PCR-RFLP usando solo 4 marcadores genéticos (SAG2 Alt., SAG3, GRA6 y BTUB)

2. Planteamiento del Problema

Si bien se han realizado estudios acerca de la frecuencia de la infección por *T. gondii* en seres humanos y algunos animales en México, no hay reportes de la presencia de este protozooario en fauna silvestre en cautiverio del estado de Puebla. La frecuencia de seroanticuerpos específicos contra *T. gondii* en seres humanos es más alta en zonas cálidas y húmedas de México que en zonas templadas o secas (Caballero-Ortega et al., 2012; Velasco-Castrejón et al., 1991), que suelen ser regiones con clima tropical, donde coexisten animales domésticos, ferales y silvestres (incluyendo felinos), lo que favorece la transmisión del parásito del ciclo silvestre al doméstico y viceversa. Actualmente, sólo hay un registro en Puebla donde se reporta la frecuencia de infección por *T. gondii* en borregos domésticos (Caballero-Ortega et al., 2008b), trabajo realizado en una granja experimental ubicada en una zona colindante con Veracruz. Esta región se caracteriza por tener un clima subtropical húmedo, condiciones ambientales diferentes a las que se presentan en la zona cercana a la ciudad de Puebla. El otro estudio realizado en este estado es el de Figueroa-Castillo et al., (2006) en una zona más templada y seca.

Actualmente, las principales funciones de los zoológicos son la conservación, educación e investigación de especies animales, incluyendo las que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, por lo cual es importante saber a qué agentes infecciosos están expuestos. *Toxoplasma gondii* es uno de los agentes a los que podrían estar expuestos los animales de la colección, diseminándose por la liberación de ooquistes por los felinos silvestres y ferales y el consumo de quistes tisulares contenidos en la carne que se suministra a los carnívoros. En algunos rumiantes de la colección estudiada como jirafas (*Giraffa camelopardalis*) se han presentado problemas reproductivos; se les han realizado análisis serológicos, descartando algunos agentes infecciosos causales de abortos o crías débiles, pero no se ha llegado a un diagnóstico definitivo. De igual manera los ejemplares de muflón europeo (*Ovis musimon*) han tenido historial de crías débiles, mortinatos y abortos que se han relacionado con problemas de

consanguinidad debido a que no hay manejo reproductivo. Sin embargo, esto no ha sido demostrado, por lo que queda abierta la posibilidad de que sea un problema asociado a un agente infeccioso como *T. gondii*. Por lo tanto, se consideró que determinar la frecuencia de anticuerpos contra este protozooario en herbívoros y carnívoros silvestres permite conocer el estado de riesgo de los ejemplares de la colección y de la población que visita las instalaciones, incluyendo al personal que labora en el sitio y en un futuro adecuar el plan de medicina preventiva.

3. Objetivo General

- Determinar la frecuencia y genotipos de *Toxoplasma gondii* en felinos mayores y herbívoros silvestres de una colección privada del estado de Puebla.

3.1 Objetivos Particulares

- Determinar la incidencia de *Toxoplasma gondii* en una población de muflones europeos (*Ovis musimon*).
- Realizar la confirmación de casos mediante técnicas complementarias en muflones europeos (*Ovis musimon*) y leones africanos (*Panthera leo*).

4. Hipótesis

Nula: La frecuencia global de infección por *Toxoplasma gondii* en carnívoros y herbívoros silvestres de la colección será del 55%.

Alternativa: La frecuencia global de infección por *Toxoplasma gondii* en carnívoros y herbívoros silvestres de la colección será menor a 55%.

5. Material y Métodos

5.1 Tipo de estudio

El trabajo de investigación desarrollado fue prospectivo, observacional, longitudinal y descriptivo.

5.2 Lugar de estudio

Las muestras se obtuvieron de herbívoros y carnívoros, propiedad de una colección zoológica privada ubicada en el municipio de Tecali de Herrera, Puebla (18° 56' 14.42"N, 98° 8' 12.74"W), a una altitud de 2180 msnm, con una temperatura media anual de 17.5°C y precipitación pluvial anual de 1280 mm (INEGI 2012).

5.3 Estrategia general

Según la literatura los ovinos domésticos son de los animales más susceptibles a ser afectados por *T. gondii* ocasionando abortos y mortinatos (Dubey, 2009). Por esta razón se seleccionó una población de muflones europeos (*Ovis musimon*) que al ser ovinos silvestres, podrían servir como centinelas de la colección y así estimar el estado de salud de los demás herbívoros con los que cohabitan y felinos silvestres que al ser el huésped definitivo, están más expuestos a la infección por el parásito y diseminar ooquistes en el ambiente. Se realizó contención física de 55 muflones europeos adultos con edad aproximada entre 1 y 5 años, para obtener 5 mL de sangre de la vena yugular y separar el suero, el cual se empleó para detectar anticuerpos contra *T. gondii* mediante un ELISA indirecto. Los muflones se identificaron por el método de muescas en las orejas con números consecutivos. Un año más tarde los mismos ejemplares fueron muestreados para determinar la incidencia de infección por *T. gondii*. Así mismo, se realizó contención física de 15 felinos silvestres (8 leones africanos -*Panthera leo*- y 7 tigres de Bengala -*Panthera tigris*-) para obtener muestra de sangre y separar el suero. Los dos muflones con la absorbancia más elevada (identificados de aquí en adelante como muf-1 y muf-2), así como cuatro felinos gerontes

incluidos en el muestreo, fueron eutanasiados (un tigre de Bengala macho y 3 hembras de león africano) para realizar un estudio sistemático de necropsia (Schuneman, 2002). Los felinos se eutanasiaron debido a que, por ser animales seniles, presentaban patologías degenerativas en articulaciones, lo cual les impedía tener una calidad de vida adecuada. De cada uno de los seis animales mencionados se colectaron muestras de órganos blanco para intentar el aislamiento del parásito y el diagnóstico histopatológico y molecular de *T. gondii* por PCR. En las muestras que resultaron positivas a la PCR en tiempo real semicuantitativa se amplificaron 6 marcadores genéticos asociados a virulencia (*B1*, *β-TUB*, *GRA6*, *GRA7*, *SAG2*, *SAG3*) ampliamente usados para establecer los linajes de *T. gondii* por PCR en punto final (Dubey et al., 2011; Grigg y Boothroyd, 2001; Khan et al., 2011; Miller et al., 2004; Su et al., 2010; Su et al., 2006).

5.4 Técnicas de laboratorio

Las técnicas empleadas para evaluar y determinar los casos positivos fueron ELISA indirecto, estudio de necropsia, histopatología, inmunohistoquímica y el bioensayo en ratón para aislamiento del parásito; además, para el diagnóstico molecular de *T. gondii*, se empleó la técnica de PCR en tiempo real y PCR punto final; para la caracterización genética se usó la técnica de PCR-RFLP. El DNA del parásito fue obtenido a partir de tejido fresco.

5.4.1 ELISA indirecto

Previo al desarrollo del ELISA indirecto y debido a la falta de un conjugado específico que detecte inmunoglobulinas de muflón, se probaron cinco conjugados acoplados a peroxidasa (anti-bovino, anti-cabra, anti-borrego, proteína A de *Staphylococcus aureus* y proteína G de *Streptococcus pyogenes*) por ELISA directo. Una vez que se determinó el conjugado a emplear para detectar anticuerpos IgG anti-*T. gondii* en muflones (anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA, producto A5295), se estandarizó un ELISA indirecto modificando la metodología previamente descrita (Caballero-Ortega et al., 2008). Para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* en felinos

silvestres, se empleó un conjugado anti-IgG de gato acoplado a peroxidasa (Abcam, Cambridge, MA, USA, producto ab112801). Las placas de poliestireno (Maxisorp Nunc) se sensibilizaron con 100 μ L de un extracto crudo (2 μ g/mL) elaborado con taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH durante toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con albúmina sérica bovina (Euro-Clone, Italy) al 1% y las muestras de suero de herbívoros y carnívoros fueron diluidas 1:400 y 1:200, respectivamente; posteriormente se agregó el conjugado específico correspondiente (anti-IgG de cabra o anti IgG de gato) diluidos 1:10,000 y 1:15,000, respectivamente. Entre cada cambio de reactivo, se llevaron a cabo 5 lavados con 200 μ L de un amortiguador de fosfatos salino (PBS), pH 7.2 adicionado con 0.05% de Tween 20® (PBS-T20). La detección de los complejos antígeno-anticuerpo se llevó a cabo mediante una solución cromógeno-sustrato y la reacción fue detenida con ácido sulfúrico 1N. Los valores de absorbancia fueron obtenidos a 490 nm de longitud de onda con un lector de ELISA (Turner Biosystems, Sunnyvale, California). Como testigos positivos y negativos se usaron sueros de cabras y gatos domésticos previamente confirmados por al menos tres pruebas serológicas (dos kits de ELISA y Western Blot). El punto de corte se calculó obteniendo el promedio de la absorbancia media de los sueros de cabras o gatos negativos más 3 desviaciones estándar. La absorbancia de los sueros de los herbívoros y carnívoros fue dividida entre el punto de corte para establecer el índice de reactividad (IR). Los herbívoros con IR superior a 0.9 fueron clasificados como positivos y de 1.1 en el caso de los carnívoros. Los detalles metodológicos se encuentran en el **Anexo 1**.

5.4.2 Western Blot

Esta técnica fue adaptada para muflones a partir de inmunoblots previamente estandarizados para ovinos, caprinos, bovinos y cérvidos (Xicoténcatl-García, 2010). Las proteínas de diez millones de taquizoítos se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 11% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 2% diluida en PBS-T20 durante 1 hora a 37°C y después toda la noche a 4°C. La

metodología completa del Western Blot se encuentra en el **Anexo 2**. Como testigos positivos y negativos se utilizaron sueros de cabras previamente confirmados por ELISA y Western Blot.

5.4.3 Necropsia

Los animales que fueron remitidos para estudio *postmortem*, se les practicó el estudio sistemático de necropsia con base en lo descrito previamente (Schuneman, 2002; Cooper y Cooper, 2007; Cooper, 2002) y se llevó a cabo en la sala de necropsias.

A cada cadáver evaluado se le inspeccionó externamente la piel, el pelo y los orificios naturales. Posteriormente, se realizó una incisión por línea media separando la piel y se procedió a evaluar el tejido subcutáneo. Se continuó con la disección de los tejidos exponiendo la cavidad oral y la región orofaríngea. Se separó el esternón, cortando las uniones costocentrales y se continuó cortando los músculos de la cavidad abdominal. Se expusieron los órganos de las cavidades, los cuales se revisaron *in situ* y posteriormente se extrajeron para su revisión individual. Una vez retirados los órganos de las cavidades, se disecaron y se revisaron macroscópicamente.

Durante la necropsia, se recolectaron muestras representativas de diferentes aparatos y sistemas de los animales eutanasiados, incluyendo secciones de pulmón, corazón (ventrículos y septo interventricular), hígado, bazo, riñón, diafragma, músculo cuádriceps femoral y encéfalo. Dichas muestras se emplearon para el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y molecular y para intentar el aislamiento de *T. gondii* en bioensayos.

Una parte de los órganos parenquimatosos se fijaron por inmersión en formalina amortiguada (pH 7.2) al 10% y posteriormente se remitieron para su procesamiento histológico al Laboratorio de Patología Molecular del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Pediatría.

Otra parte de las muestras se mantuvo fresca para la extracción de DNA y su posterior análisis por PCR y PCR-RFLP. Una parte más, fue empleada en los bioensayos en roedores. Los tejidos colectados se depositaron en bolsas de

plástico tipo Ziploc® manteniéndose a 4°C hasta su remisión al laboratorio para su procesamiento.

5.4.4 Histopatología

Los tejidos colectados durante la necropsia se procesaron con la técnica de rutina para histología y se evaluaron microscópicamente (Prophet, 1995). Los detalles de la técnica se encuentran en el **Anexo 3**.

5.4.5 Inmunohistoquímica

Para la identificación específica y morfológica de los taquizoítos, pseudoquistes o quistes tisulares de *T. gondii* en los tejidos afectados, se empleó la técnica de inmunohistoquímica con el método de detección complejo avidina-biotina peroxidasa, utilizando como anticuerpo primario un suero de cabra positiva a *T. gondii* previamente probado por al menos dos técnicas diferentes (Cedillo-Peláez et al., 2011; Lindsay y Dubey, 1989; Ramos-Vara, 2005). Como testigo positivo se emplearon secciones de hígado o bazo de ratón infectado con taquizoítos de *T. gondii* cepa Me49, en las cuales se identificó previamente la presencia de quistes y pseudoquistes de este protozooario con la misma técnica. Como testigo negativo se emplearon secciones del mismo tejido, sustituyendo el anticuerpo primario por PBS.

La metodología completa de la inmunohistoquímica se encuentra en el **Anexo 4**.

5.4.6 PCR

De cada uno de los herbívoros y carnívoros positivos por ELISA se seleccionaron varios tejidos en fresco (corazón, pulmón, hígado, bazo, diafragma, músculo cuádriceps femoral y encéfalo –corteza, tálamo y encéfalo posterior-) para la extracción y amplificación de DNA, con base en lo descrito por Cedillo-Peláez (2009) y Rico-Torres (2005).

Para la amplificación de DNA de *T. gondii* por PCR se emplearon los marcadores *B1*, *GRA6* (gen de gránulos densos 6), *GRA7* (gen de gránulos densos 7), *SAG2* (gen de antígeno de superficie 2), *SAG3* (gen de antígeno de superficie 3), *β-TUB*

(beta tubulina) y una región no codificante del genoma de *T. gondii* que se repite de 200-300 veces.

Extracción de DNA. De los órganos recolectados durante el estudio *postmortem*, se cortaron 200 mg de cada tejido y se maceraron en 1.3 mL de solución comercial de lisis celular (Puregen Cell Lysis Solution, GENTRA, Cat. D-50K2).

La concentración y pureza del DNA se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) a 260 y 280 nm, depositando 1 µL de cada muestra sobre el pedestal del equipo. Finalmente el DNA se almacenó a -20°C hasta su uso. Los detalles metodológicos se encuentran en el **Anexo 5**.

PCR en tiempo real. El diagnóstico molecular de *T. gondii* en las muestras de los herbívoros y carnívoros se llevó a cabo mediante un ensayo presencia-ausencia del gen *B1* de *T. gondii* por PCR en tiempo real; para tal fin, se usaron los iniciadores GEN_B1_TG_TX2F y GENE_B1_TG_TX2R, así como la sonda GENE_B1_TG_TX2M1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. **Cuadro 9**) Los oligonucleótidos amplificaron una sección de 62 pb (Kompalic-Cristo et al., 2007). Las muestras fueron probadas por duplicado y cada ensayo de PCR incluyó DNA de las cepas RH, Me49 y Wiktor como testigos positivos. Los detalles metodológicos se encuentran en el **Anexo 6**.

Cuadro 9. Iniciadores y sonda para el gen *B1* de *Toxoplasma gondii*

Marcador	Iniciadores*	Referencia
GENE_B1_TG_TX2F	Sentido 5' CTAGTATCGTGCGGCAATGTG 3'	(Kompalic-Cristo et al., 2007)
GENE_B1_TG_TX2R	Antisentido 5' GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT 3'	
GENE_B1_TG_TX2M1	Sonda 5' (6-FAM)-CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-MGB) 3'	

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

PCR Punto Final. Los DNAs de tejidos que resultaron positivos por PCR en tiempo real se evaluaron mediante PCR punto final para la amplificación de seis marcadores genéticos más una secuencia de 529 pb que se repite 200-300 veces en el genoma de *T. gondii* (**Cuadro 10**). Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y su especificidad fue verificada mediante un análisis de homología utilizando la aplicación BLAST de la NCBI (<http://www.ncbi.org/BLAST>). Como control positivo de *T. gondii* se emplearon las cepas de referencia RH, Me49 y una cepa silvestre aislada en el laboratorio, como control negativo se empleó agua inyectable.

En algunos casos donde no se observaron productos de la PCR, se reamplificó el DNA a partir de los productos iniciales, empleando las mismas condiciones que la PCR punto final, tomando como molde una dilución 1:10 del amplificado original de cada marcador genético.

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa (Gibco) al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 mg/1.0 mL, Invitrogen), agregando 3 µL de un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder 250 ug 1.0 ug/uL, Invitrogen). Los resultados fueron grabados digitalmente mediante un fotodocumentador (UVP) de imágenes. Se consideraron como casos positivos aquellos animales de cuyas muestras se lograron amplificar bandas cercanas al peso esperado para uno o más genes en al menos un tejido. Los detalles metodológicos se encuentran en el **Anexo 6**.

5.4.7 PCR-RFLP

En cada caso confirmado por la PCR, se analizó el polimorfismo de cada locus por los patrones generados por el RFLP, a partir de los productos de amplificación de los genes *B1*, *GRA6*, *GRA7*, *SAG2*, *SAG3* y *β-TUB*, con base en la metodología descrita por Grigg *et al* (2001) y Su *et al* (2006 y 2010).

Digestión del DNA genómico con enzimas de restricción. Los productos de amplificación de los seis marcadores genéticos fueron digeridos con las enzimas

respectivas (**Cuadro 11**). Los productos de digestión se visualizaron de forma similar a lo descrito para los productos de amplificación por PCR, modificando la concentración del gel de agarosa al 3.5% y añadiendo 3 µL de ΦX174 DNA/BsuRI (*HaeIII*) Marker 9 (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Los detalles metodológicos se encuentran en el **Anexo 6**.

5.4.8 Aislamiento en ratones Balb/c

Con el objetivo de aislar al parásito y con esto lograr mayor cantidad de DNA del mismo, una fracción de los tejidos frescos recuperados de las necropsias se procesaron para la inoculación vía intraperitoneal en ratones Balb/c y C57BL6 RAG2^{-/-}. Para esto, se maceraron 10 g de corazón, diafragma y encéfalo (región del tálamo) en PBS estéril en una caja de Petri y con la ayuda del émbolo de una jeringa de 20 mL. Una vez que el tejido fue macerado, se tomó 1 mL del homogenizado y se inyectó vía intraperitoneal a un ratón identificado con el mismo código del animal de procedencia.

Semanalmente se obtuvo una muestra de sangre de los ratones inoculados a través del seno retro orbital para obtener suero y detectar anticuerpos IgG contra el parásito por medio de ELISA indirecto, utilizando condiciones similares al usado en las muestras de los muflones y leones, para determinar si los roedores seroconvirtieron a la infección con *T. gondii*.

Cuadro 10. Iniciadores empleados para la amplificación de DNA (PCR) de *Toxoplasma gondii* y enzimas de restricción utilizadas para la genotipificación (RFLP)

Marcador genético	Oligonucleótidos	TM	Producto	Enzima de restricción	Referencia
Tox4-Tox5	Tox4 F: 5' -CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG 3'	55°C	529 pb	-	(Homan y Vercammen, 2000)
	Tox5 R: 5' -CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT 3'				
B1	TM1 F: 5' -GAGAGGTCCGCCCCACAAG 3'	65°C	619 pb	-	(Cedillo-Peláez, 2009; Pujol-Riqué, 1999)
	TM2 R: 5' -CTGCTGGTGCACGGGAGTG 3'				
	TM2 R: 5' -CTGCTGGTGCACGGGAGTG 3'	55°C	362 pb	-	(Cedillo-Peláez, 2009; Pujol-Riqué, 1999)
	TM3 F: 5' -CAGGAGTTGGATTTTGTAGA 3'				
TM4 (S1) F: 5' -CGACAGAAAGGGAGCAAGAG 3'	63°C	1,008 pb	<i>Pml</i> – 37°C	(Cedillo-Peláez, 2009; Grigg y Boothroyd, 2001; Pujol-Riqué, 1999)	
TM2 R: 5' -CTGCTGGTGCACGGGAGTG 3'					
GRA6	GRA6-F1: 5' -TTTCCGAGCAGGTGACCT 3'	60°C	344 pb		(Su et al., 2010, 2006)
	GRA6-R1x: 5' -TCGCCGAAGAGTTGACATAG 3'				
	Seq3 F: 5' -GTGGACAGCAAGAAGCAGTG 3'	60°C	512 pb	<i>MseI</i> – 37°C	(Su et al., 2010, 2006)
	Seq2 R: 5' -TACAAGACATAGAGTGCCCC 3'				
	Seq1 F: 5' -GTAGCGTGCTTGTGGCGAC 3'	60°C	779 pb		(Su et al., 2010, 2006)
Seq2 R: 5' -TACAAGACATAGAGTGCCCC 3'					

Cuadro 10. (Continuación) Iniciadores empleados para la amplificación de DNA (PCR) de *Toxoplasma gondii* y enzimas de restricción utilizadas para la genotipificación (RFLP)

Marcador Genético	Oligonucleótidos	TM	Producto	Enzima de restricción	Referencia
GRA7	GRA7-F: 5' -CCAAAATGGCCCGACACG 3' GRA7-R: 5' -TGACAGCAAACACTCACCG 3'	64°C	843 pb	<i>Hpy99I</i> - 37°C	(Dubey et al., 2011; Khan et al., 2011)
SAG2 Alt.	SAG2-Fa: 5' -ACCCATCTGCGAAGAAAACG 3' SAG2-Ra: 5' -ATTTGACCAGCGGGAGCAC 3'	60°C	546 PB	<i>HinfI</i> – 37°C <i>TaqI</i> – 65°C	(Su et al., 2010)
SAG3	INT-F 5' –TCTTGTCGGGTGTTCACTCA 3' INT-R 5' –CACAAGGAGACCGAGAAGGA 3' EXT-F 5' –CAACTCTCACCATTCCACCC 3' EXT-R 5' –GCGCGTTGTTAGACAAGACA 3'	60°C	225 pb <hr/> 311 pb	<i>NciI</i> – 37°C	(Su et al., 2010) (Su et al., 2006)
β-TUB	Btb-F: 5' -GAGGTCATCTCGGACGAACA 3' Btb-R: 5' -TTGTAGGAACACCCGGACGC 3'	60°C	411 pb	<i>BsiEI</i> - 60°C <i>TaqI</i> - 65°C	(Su et al., 2010, 2006)

6. Resultados

6.1 Serología

Estandarización del ELISA para muflones

Se realizaron ELISAs directos para determinar qué conjugado de peroxidasa (anti-borrego, anti-cabra, anti-bovino, proteína A o proteína G) presenta reacción más adecuada con la IgG de los muflones. Después de realizar varias pruebas se decidió utilizar el anti IgG de cabra que es el conjugado que da mayor absorbancia y más parecida a la resultante de la especie homóloga (anti cabra-cabra) (**Figura 6**).

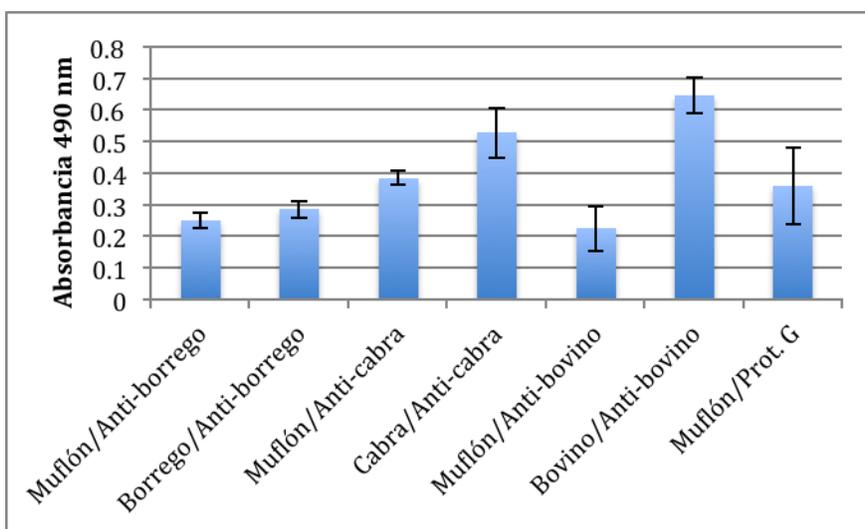


Figura 6. Comparación de absorbancias de los diferentes conjugados a peroxidasa (Dilución 1:10,000) probados con sueros de muflón y especies homólogas al conjugado por ELISA directo

Posteriormente, se realizaron ensayos para determinar la dilución adecuada del conjugado anti-cabra para el ELISA indirecto, probando diluciones dobles seriadas y se decidió utilizar 1:10,000, ya que es en la cual la absorbancia de los sueros de los muflones y de las cabras es más parecida (**Figura 7**).

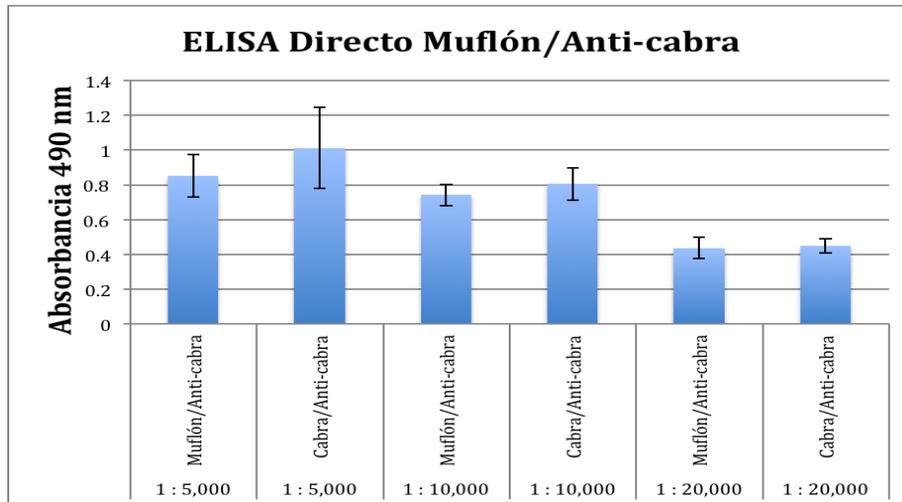


Figura 7. Comparación de absorbancias de las diferentes diluciones del conjugado anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa por ELISA directo

Enseguida se estandarizó la dilución de los sueros de los muflones en el ELISA específico anti-*T.gondii*, además de seis sueros de cabra, tres positivos y tres negativos, para usarlos como testigos en los ensayos. Se determinó que la dilución a la cual se probarían los sueros de los muflones sería 1:400 ya que esta dilución permite diferenciar entre los sueros de los muflones de baja absorbancia y los sueros negativos de cabras (Figura 8).

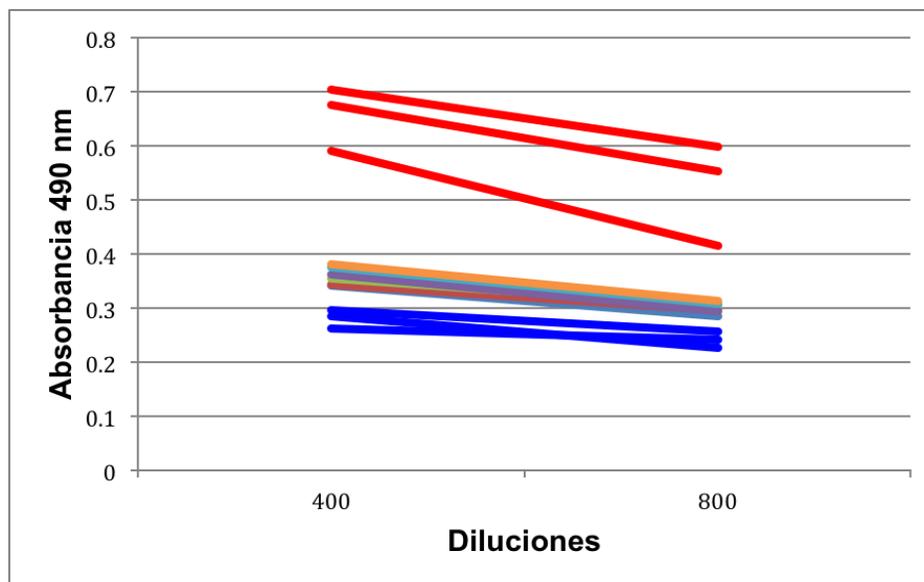


Figura 8. Absorbancias de los sueros de las 3 cabras positivas (líneas rojas), las 3 negativas (líneas azules) y algunas muestras séricas de los muflones por ELISA indirecto

Frecuencia de *T. gondii* en muflones

Una vez estandarizadas las diluciones del suero, se probaron por duplicado los 55 sueros colectados de esta especie y se calculó el Índice de Reactividad (IR) como se mencionó en la metodología, para determinar la frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en los muflones. Usando los sueros de cabras negativas para construir el punto de corte, cuatro muflones resultaron positivos a la infección por el protozoo. Para confirmar lo anterior, se recurrió a la construcción de gráficos de distribución de frecuencias como un método alternativo reportado previamente para calcular la frecuencia de infección por *T. gondii* (Wouda et al., 1999).

En la **Figura 9** se pueden identificar dos poblaciones, una del lado izquierdo donde se agruparían los animales que aparentemente son negativos (menores a 0.9 de IR) y una del lado derecho con 4 muflones, los cuales se consideraron positivos. Realizando este análisis, la frecuencia de infección por *T. gondii* calculada en muflones es de 7.3%.

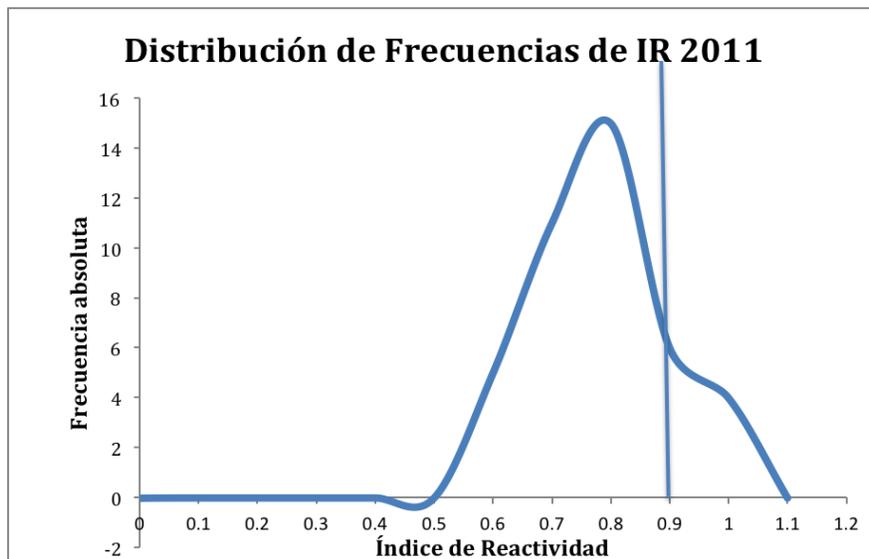


Figura 9. Distribución de frecuencias para los IR de los herbívoros del primer muestreo

Incidencia de *T. gondii* en muflones europeos

Un año después se colectó muestra de sangre en 41 de los 55 herbívoros silvestres originales, se probaron nuevamente por ELISA y se volvió a construir un gráfico de distribución de frecuencias. De los 41 ejemplares, dos se mantuvieron

positivos, dos más aparentemente se volvieron negativos y cinco probablemente seroconvirtieron, con lo cual la incidencia por Infección de *T. gondii* sería del 12.2% anual (5/41; **Figuras 10 y 11**).

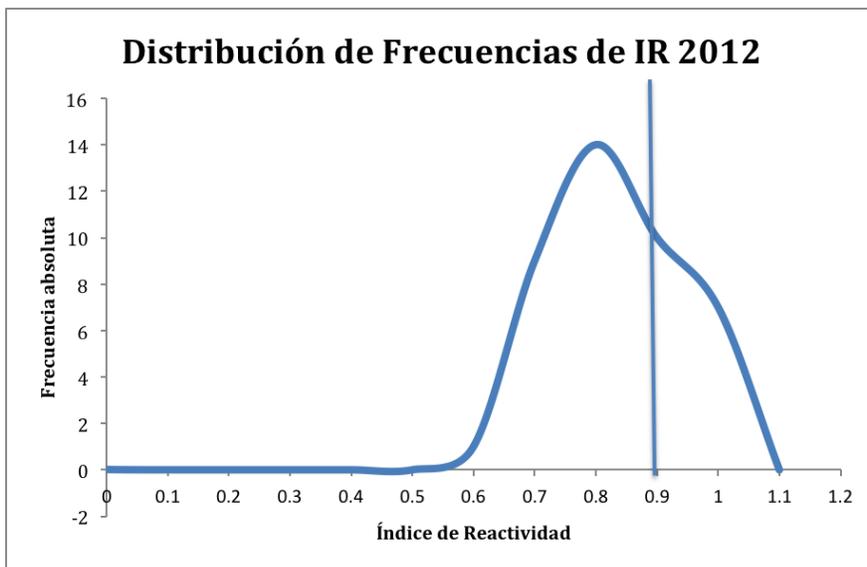


Figura 10. Distribución de frecuencias de los IR de los muflones del segundo muestreo

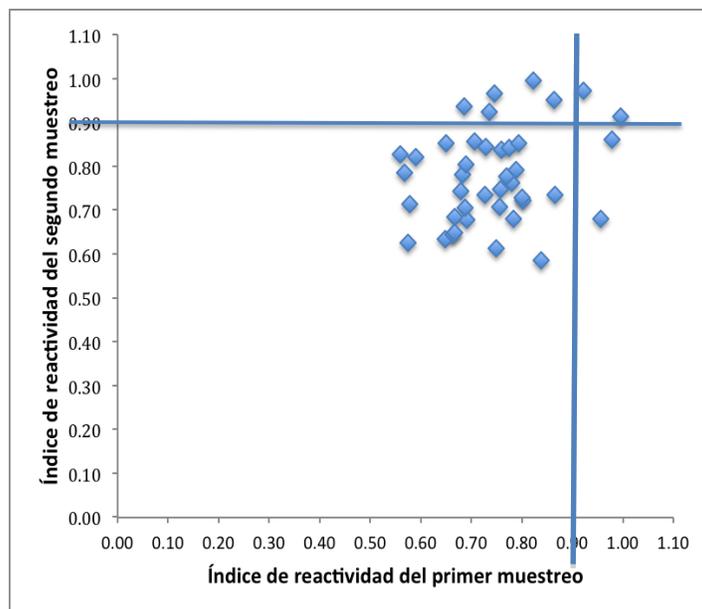


Figura 11. Correlación de los IR de los muflones del primero contra el segundo muestreo (R=0.27)

ELISA de felinos silvestres

De los 15 felinos silvestres a los cuales se les colectó suero, (ocho leones africanos y siete tigres de Bengala), para detectar anticuerpos anti-*T.gondii*, seis de ocho leones (75%) y seis de siete tigres fueron positivos (85.7%). Esto nos da como resultado una frecuencia de infección por *T. gondii* en felinos silvestres del 80% (12/15) con índices de reactividad que van desde 0.4 hasta 2.3.

6.2 Western Blot

Se intentó la estandarización del Western Blot para emplearla como prueba confirmatoria en los herbívoros silvestres, utilizando al igual que en el ELISA, sueros de cabras positivas y negativas como testigos del inmunoensayo y el mismo conjugado anti-IgG de cabra. Se probaron diversas diluciones de suero y de conjugado, y después de realizar varios ensayos, en todas las pruebas con los sueros de los muflones negativos por ELISA, se observaron bandas inespecíficas, a pesar de haber realizado algunas modificaciones en tiempos de incubación, de reactivos, cantidad de éstos y temperaturas; por lo que se determinó suspender la estandarización de este inmunoensayo (**Figura 12**).

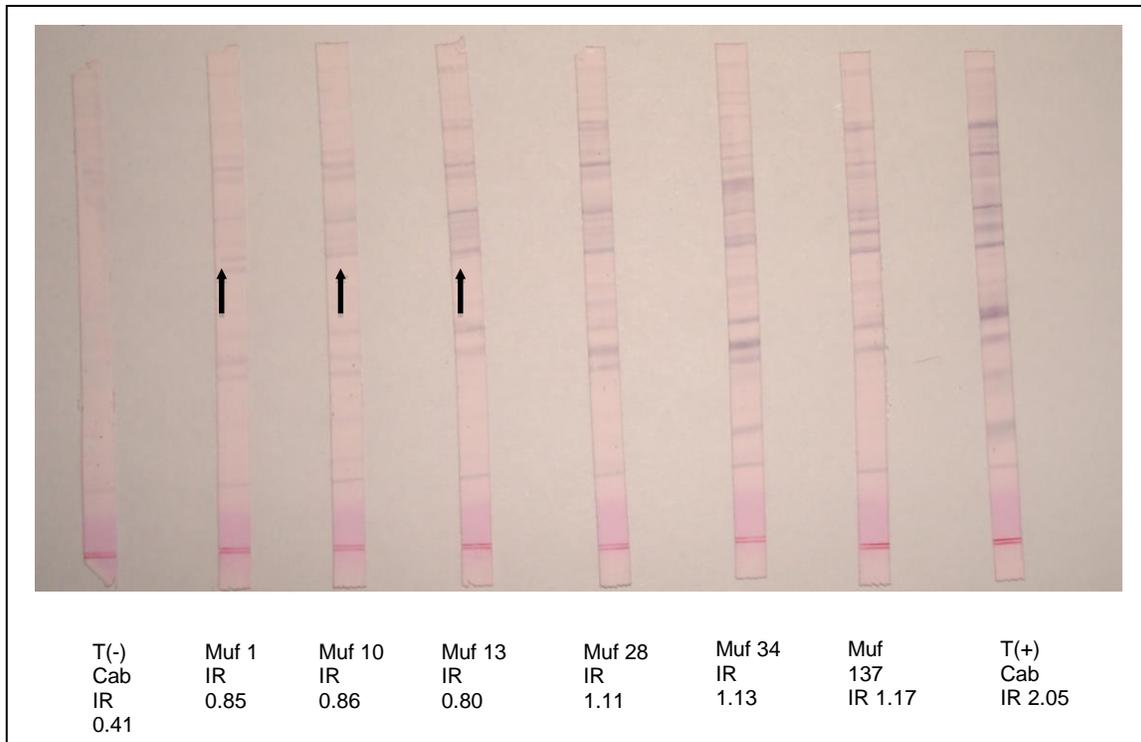


Figura 12. Tiras de nitrocelulosa con bandas inespecíficas en sueros de muflones negativos por ELISA (flechas)

6.3 Necropsia y hallazgos macroscópicos

Herbívoros

Los dos muflones (Muf-1 y Muf-2) con mayor absorbancia por ELISA fueron eutanasiados durante el segundo manejo. En los intestinos de ambos animales se encontraron nemátodos de los géneros *Trichostrongylus* spp y *Haemonchus contortus*. En el resto de los sistemas y órganos no se encontraron cambios patológicos aparentes.

Carnívoros

Las tres leonas africanas y el tigre de Bengala macho con problemas degenerativos propios de la edad fueron seleccionados para eutanasia. En el análisis *postmortem* todos los animales presentaron condición corporal pobre, opacidad corneal (dos de las leonas) y pérdida de piezas dentales por edad avanzada. Una de las leonas presentaba neumonía fibrinopurulenta crónica (35%

de la superficie total del órgano), mientras que otra tenía enfermedad proliferativa pulmonar primaria (adenocarcinoma). El sistema cardiovascular no presentó alteraciones aparentes en ninguno de los animales. Una de las leonas presentó gastritis catarral leve difusa, con quistes hepáticos (en las tres leonas) y otra esplenomegalia. En el sistema urinario, los riñones de todos los animales se apreciaron con disminución de tamaño, superficie irregular, pálidos y con la cápsula engrosada; al incidirlos había pérdida de la proporción corteza-médula; la corteza tenía aspecto granular y los rayos corticales eran evidentes, extendiéndose hasta nivel medular; las pelvillas renales estaban contraídas y con bordes irregulares. Los encéfalos (4/4) estaban disminuidos de tamaño, con meninges engrosadas y muy adheridas al parénquima y las circunvoluciones eran prominentes; al incidirlos longitudinalmente, los ventrículos laterales se encontraban distendidos en diferente grado con abundante cúmulo de líquido cefalorraquídeo (**Figura 13**).

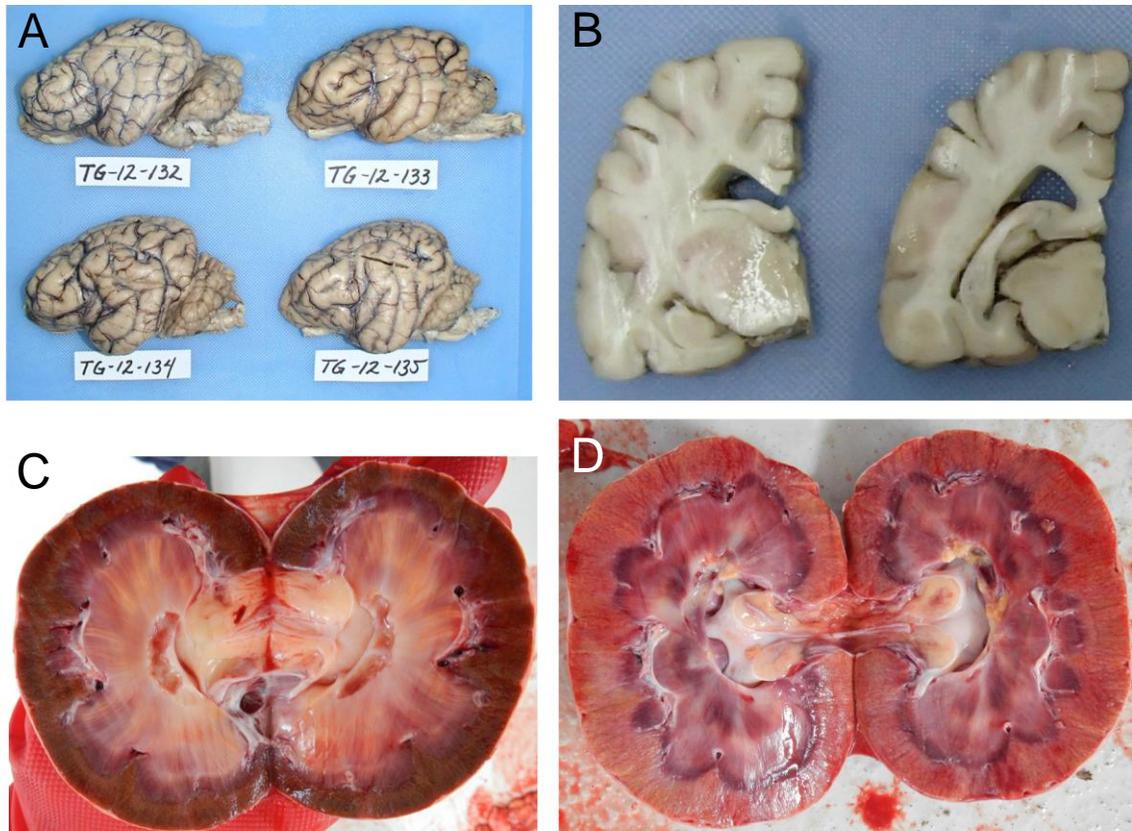


Figura 13. Cambios macroscópicos en encéfalo y riñones de los felinos silvestres. A) Comparación de los cuatro encéfalos (hemisferio izquierdo) de los felinos estudiados, los cuales se observan disminuidos de tamaño, contraídos, con meninges engrosadas y adheridas al parénquima y circunvoluciones prominentes; B) Cortes coronales del encéfalo antes descrito, siendo evidente la dilatación del ventrículo lateral y disminución del grosor de la sustancia gris a nivel de la corteza. C) y D) Comparación de los riñones de dos leonas presentando diferente grado de alteraciones renales, incluyendo pérdida de la morfología del órgano, corteza con aspecto granular, rayos corticales evidentes y distensión de la pelvis renal con necrosis papilar.

6.4 Histopatología

Cambios patológicos en los herbívoros

En la Figura 14 (A y B) se pueden identificar estructuras parasitarias en la luz del alvéolo pulmonar del Muf-1 sin infiltrado inflamatorio. De acuerdo con la literatura científica los agentes causales pueden ser: *Muellerius capillaris*, *Neostrongylus linearis*, *Cystocaulus ocreatus*, *Protostrongylus rufescens* o *Protostrongylus rupicaprae*. *Muellerius capillaris* es el único nemátodo que tiene huésped intermediario en México (caracoles del género *Galba* spp), por lo que es probable

que las estructuras parasitarias encontradas en los cortes histológicos pertenezcan a este parásito.

En los cortes de músculo estriado esquelético y músculo estriado cardiaco de los dos muflones eutanasiados se observaron estructuras parasitarias compatibles con quistes de *Sarcocystis* spp (**Figura 14 C y D**). Al evaluar el tejido renal, se puede apreciar incremento en la celularidad y engrosamiento de la membrana basal de los glomérulos renales de los dos muflones ocasionando glomerulonefritis membrano-proliferativa (**Figura 14 E y F**). El resto de los órganos y sistemas de los herbívoros se encontraban sin cambios patológicos significativos.

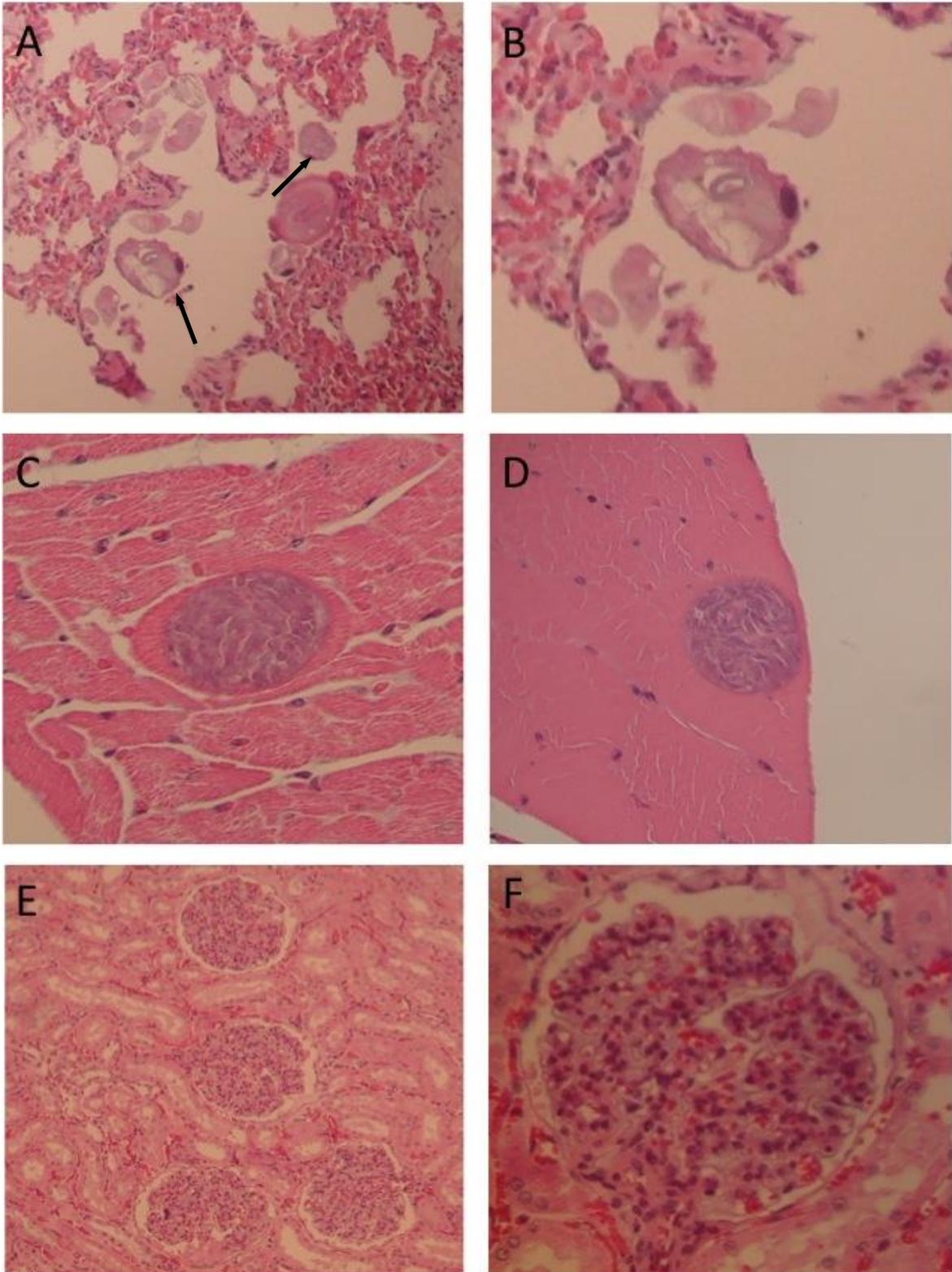


Figura 14. Principales cambios patológicos en los muflones. Cortes de pulmón donde se pueden apreciar estructuras parasitarias (flechas) en la luz del alveolo (A y B). Cortes de músculo estriado cardiaco (C) y músculo estriado esquelético (D) donde se observan quistes tisulares de *Sarcocystis* spp; Glomérulos renales con glomerulonefritis membranoproliferativa (E y F)

Cambios patológicos en los carnívoros

Los hallazgos microscópicos más relevantes se presentaron en el parénquima renal y en el encéfalo. En los riñones, a nivel de la corteza se apreció diferente grado de degeneración de los glomérulos renales, incluyendo glomerulitis membranosa y proliferativa severa difusa, hasta glomérulos esclerosados con pérdida parcial de los ovillos glomerulares. En los túbulos renales se observaron cambios degenerativos y necróticos de las células epiteliales, con presencia de cilindros hialinos en su luz.

En el sistema nervioso central se observaron cambios relacionados con enfermedad neurodegenerativa, encefalopatía espongiiforme renal y enfermedad por acumulación lisosomal (**Figura 15 A-F**). Cabe señalar que ninguno de estos cambios patológicos están relacionados con la infección por *T. gondii*.

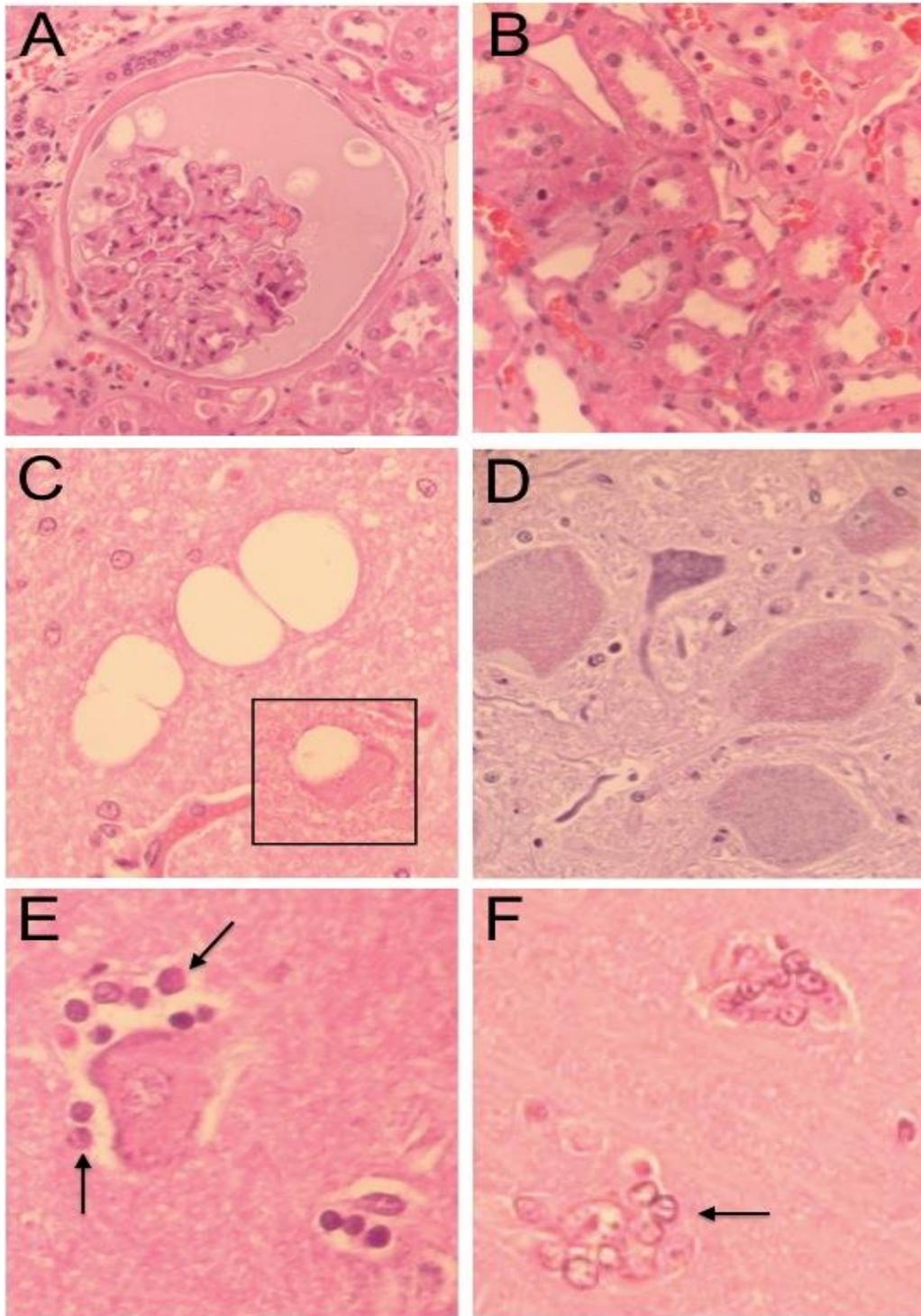


Figura 15. Hallazgos microscópicos relacionados con enfermedad neurodegenerativa, encefalopatía espongiforme renal y enfermedad por acumulación lisosomal. A) Glomerulonefritis membranosa con contenido proteináceo en el espacio de Bowman; B) Necrosis tubular de células epiteliales; C) Vacuolización del neuropilo y neuronal (recuadro); D) Neuronas con presencia intracitoplasmática de material granular positivo a la tinción de PAS; E) Satellitosis clásica alrededor de neuronas en degeneración (flechas); F) Satellitosis por astrocitos Alzheimer tipo II, descritos en casos de encefalopatía espongiforme de origen renal o hepático (Flecha). Técnica HE, 400x.

6.5 Inmunohistoquímica

Las muestras de los dos herbívoros y dos carnívoros silvestres positivos por ELISA se procesaron para IHQ de *Toxoplasma gondii*. En uno de los herbívoros hubo inmunopositividad de estructuras parasitarias (quistes tisulares o pseudoquistes, **Figura 16 A-B y cuadro 11**) en bazo y músculo estriado esquelético. En el encéfalo de los carnívoros, se encontraron estructuras inmunopositivas, pero no concuerdan con la morfología clásica de los quistes tisulares de *T. gondii*, por lo que solamente se diagnosticaron como estructuras sugerentes de éstos (**Figura 16 D y E**). No se encontraron estructuras sugerentes de infección por *T. gondii* en el resto de los tejidos.

Cuadro 11. Inmunohistoquímica de tejidos de herbívoros y carnívoros

Animal	Hígado	Bazo	Músculo	Encéfalo*
Muflón 1	(-)	(+)	(+)	(-)
Muflón 2	(-)	(-)	(-)	(-)
León 1	(-)	(-)	(-)	Estructuras sugerentes
León 2	(-)	(-)	(-)	Estructuras sugerentes

(+): Tejido positivo por inmunohistoquímica

(-): Tejido negativo por inmunohistoquímica

*Se evaluaron cortes de diferentes regiones del encéfalo incluyendo corteza, tálamo y encéfalo posterior

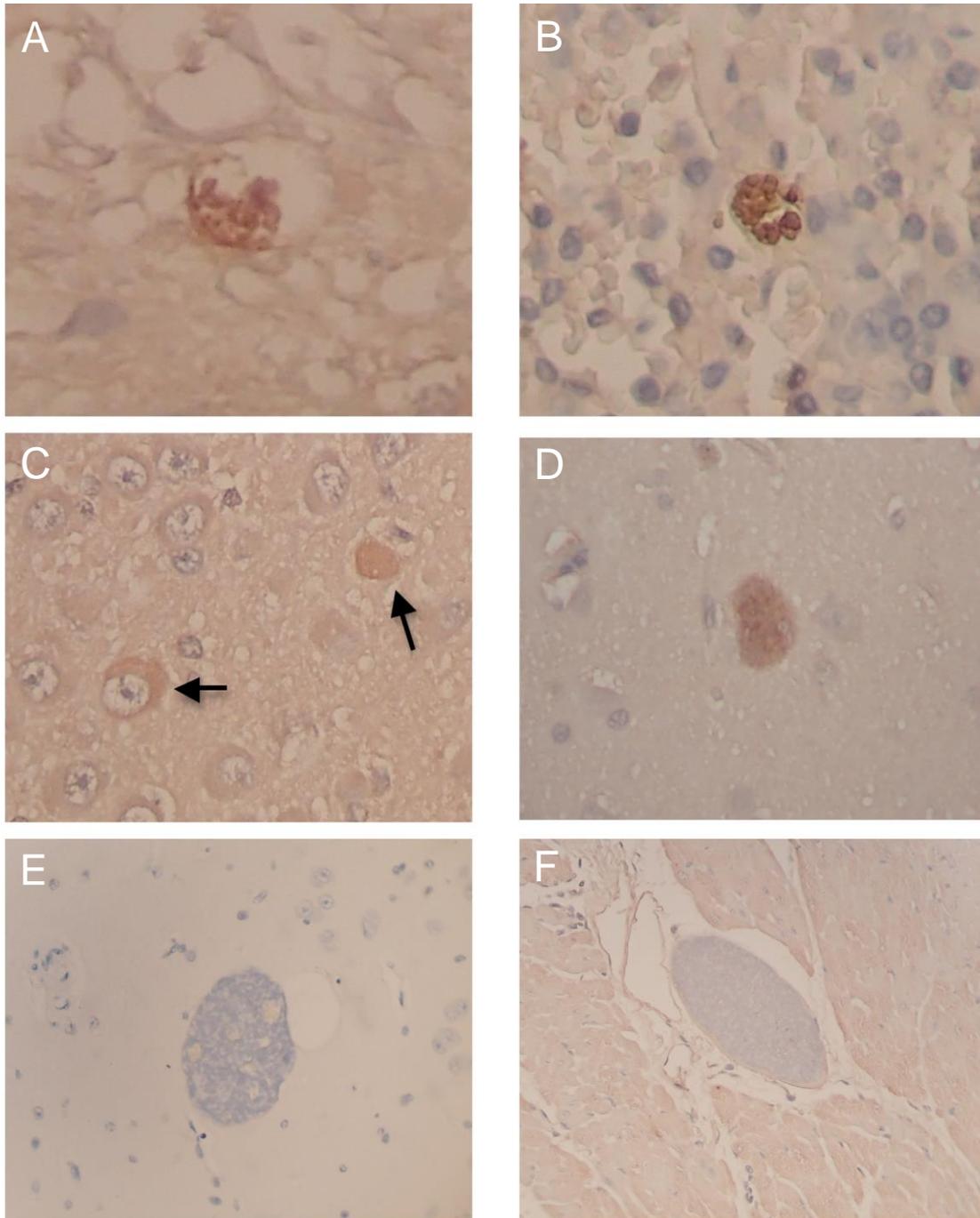


Figura 16. Inmunohistoquímica para la detección de *T. gondii* en tejidos de herbívoros y carnívoros silvestres. A) Quiste o pseudoquiste tisular en sección de músculo estriado esquelético, 400x; B) Cúmulo de taquizoítos en corte de bazo, 400x; C) y D) estructuras inmunopositivas que no cumplen con los requisitos morfológicos de un quiste en encéfalo de león africano (flechas), 400x. E) Quiste tisular inmunonegativo de *Sarcocystis* spp en encéfalo (E) y en músculo estriado esquelético (F) de un muflón, 100x.

6.6 Bioensayo en ratones Balb/c

Ninguno de los ratones inoculados con macerados de tejido de los herbívoros y carnívoros silvestres seroconvirtieron (ni para IgM ni IgG). Por lo tanto, no se logró el aislamiento del parásito.

6.7 Biología molecular

6.7.1 PCR en tiempo real

Los cuatro animales que resultaron positivos por ELISA resultaron positivo por PCR en tiempo real en al menos uno de sus tejidos. Los herbívoros, en la muestra de encéfalo y los carnívoros en la de diafragma (**Cuadro 12**).

Cuadro 12. Resultados de PCR en tiempo real (presencia/ausencia) para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*

Espécimen	Órganos	Resultado
Muflón 1	Corazón	Negativo
	Diafragma	Sospechoso
	Encéfalo Tálamo	Positivo
Muflón 2	Corazón	Negativo
	Músculo estriado esq.	Sospechoso
	Encéfalo Tálamo	Positivo
León 1	Hígado	Sospechoso
	Bazo	Sospechoso
	Diafragma	Positivo
	Encéfalo corteza	Negativo
León 2	Hígado	Negativo
	Bazo	Sospechoso
	Diafragma	Positivo

6.7.2 PCR punto final

De los cuatro casos evaluados por PCR punto final, todos fueron positivos para al menos alguno de los genes probados (*B1*, *SAG2*, *SAG3* y *GRA7*) o a una secuencia repetitiva de 529 pb, denominada TOX4-TOX5. En el caso del gen

GRA6 sólo se obtuvieron productos de amplificación a partir de muestras de los carnívoros con los iniciadores que dan un producto de 512 pb. Para el gen *B1*, en los herbívoros se obtuvieron bandas de aproximadamente 40 pb por encima del producto esperado, mientras que en los carnívoros se obtuvo el producto esperado, además de bandas adicionales en un par de órganos. Para los genes *SAG2*, *SAG3* y *GRA7* se obtuvieron bandas por encima o por debajo del producto esperado, además de múltiples bandas adicionales. Para el gen *β-TUB* la amplificación de las bandas fue muy tenue y muy por encima del producto esperado, por lo que se consideraron negativos a este gen. En el caso de la secuencia TOX4-TOX5 sólo una muestra amplificó el producto esperado (529 pb) y otras tres muestras amplificaron bandas de aproximadamente 1200 pb. Todos los resultados se muestran en las Figuras 17 - 24 y en el Cuadro 13.

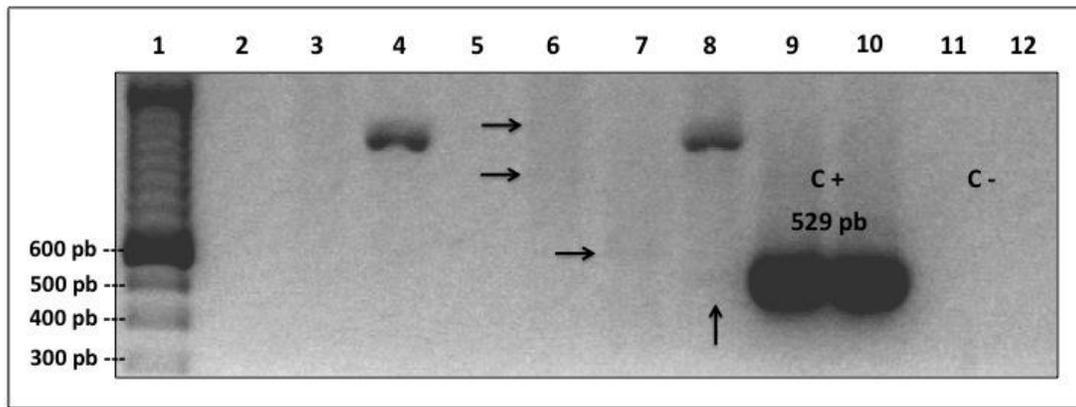


Figura 17. Amplicones de la secuencia repetitiva de 529 pb de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de muflón europeo (*Ovis musimon*) y león africano (*Panthera leo*). Evaluación de tejidos en fresco: encéfalo y músculo estriado de herbívoros; bazo y encéfalo de carnívoros. Carril (1): marcador de peso molecular 100 pb, (4) producto de amplificación de aproximadamente 1200 pb en músculo de muflón, bandas muy tenues (flechas, 6 y 7), reacción negativa en diafragma y encéfalo de muflón (2, 3 y 5), producto de amplificación de aproximadamente 1200 pb en músculo de león (8), controles positivos cepas RH y Me49 (9 y 10 respectivamente), control negativo agua inyectable (11 y 12). Gel de agarosa al 1.5%

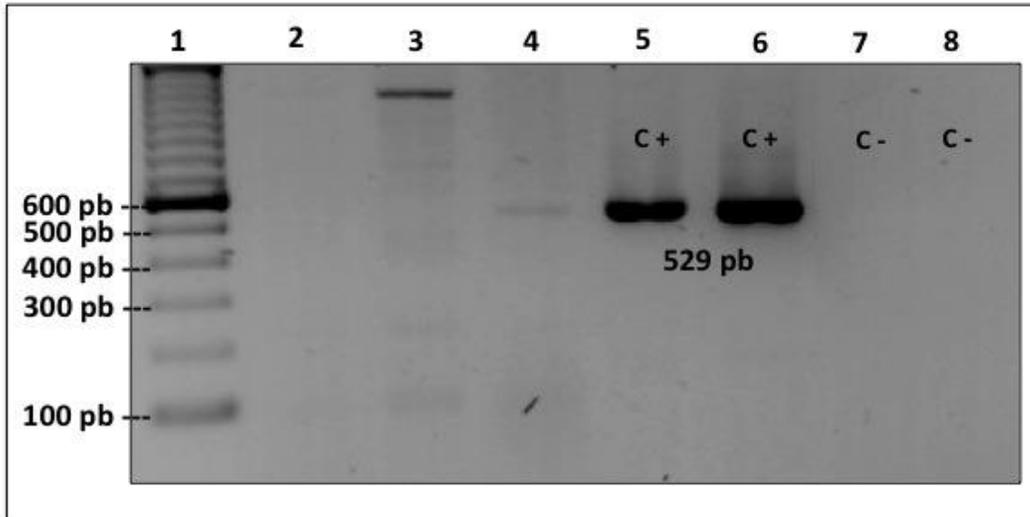


Figura 18. Amplicones de la secuencia repetitiva de 529 pb de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de león africano (*Panthera leo*). Evaluación de tejidos en fresco: hígado y diafragma de carnívoros. Carriles: marcador de peso molecular 100 pb (1), bandas muy tenues en hígado de 100, 250, 450, 650, 800, 1000 y una bien definida de 1200 pb (3), diafragma positivo (4), controles positivos cepas RH y Me49 (5 y 6 respectivamente), control negativo agua inyectable (7 y 8). Gel de agarosa al 1.5%.

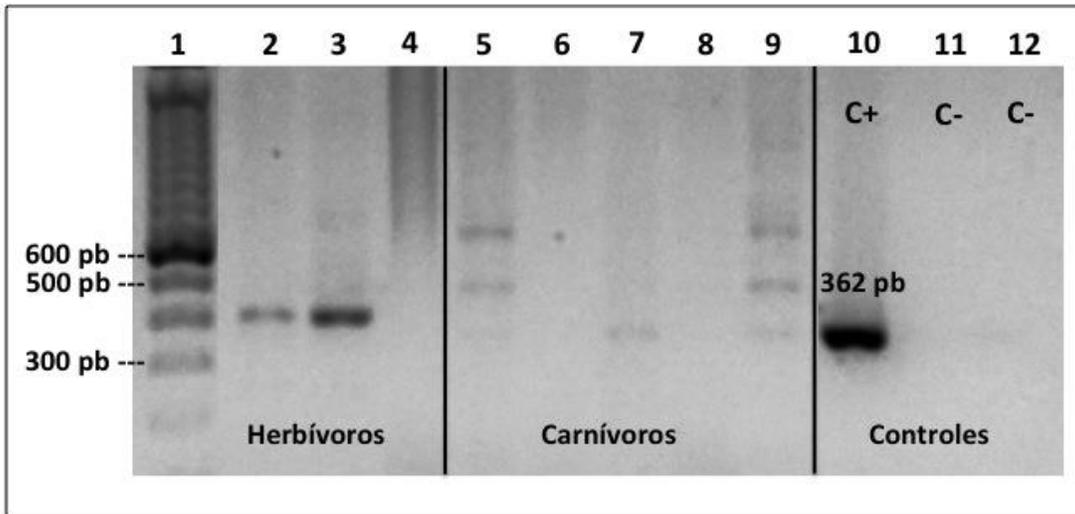


Figura 19. Amplicones del gen B1 (362 pb) de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de muflón europeo (*Ovis musimon*) y león africano (*Panthera leo*). Carriles: marcador de peso molecular (1), encéfalo de muflón 1 (2), músculo estriado esquelético (3) y encéfalo de muflón 2 (4), bazo (5), diafragma (6) y encéfalo de león 1 (7), hígado (8) y bazo de león 2 (9). Control positivo cepa RH (10), control negativo agua inyectable (11 y 12). El patrón de amplificación de los herbívoros y carnívoros es diferente; en los primeros la banda es de aproximadamente 400 pb, 38 pb por encima del producto esperado. En el carril 3 se pueden observar sombras de posibles bandas extras de 500 y 700 pb. En los carnívoros hay 2 patrones, el de los bazos de león 1 y 2 con producto esperado y 2 bandas adicionales de 500 y 700 pb y la del encéfalo de león 1 con sólo la banda esperada. En los carriles 4, 6 y 8 no hubo producto de amplificación. Gel de agarosa al 1.5%.

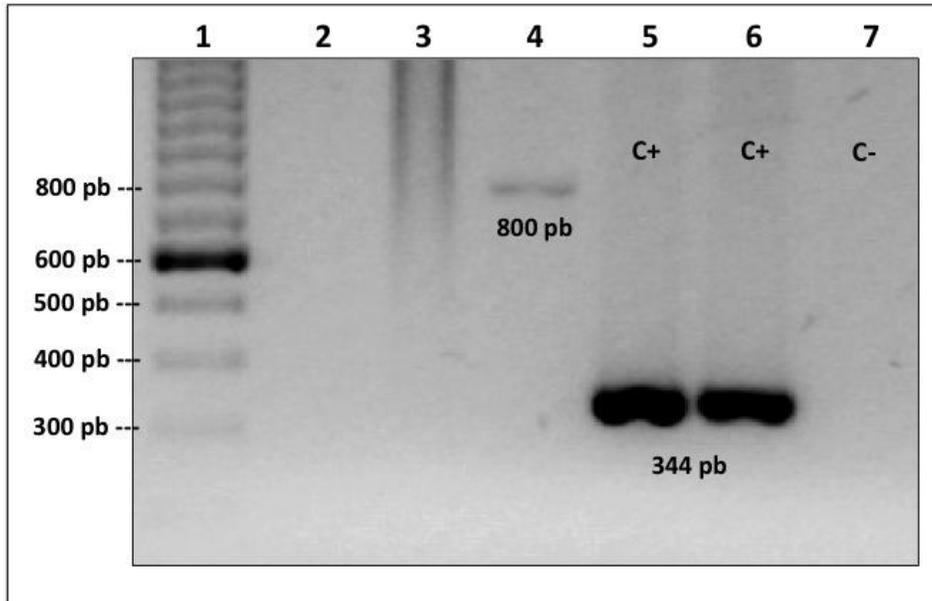


Figura 20. Amplicones del gen *GRA6* de 344 pb de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de muflón europeo (*Ovis musimon*). Marcador de peso molecular (1), diafragma (2) y encéfalo muflón 1 (3), músculo estriado esquelético muflón 2 (4). Controles positivos cepas RH y Me49 (5 y 6), control negativo agua inyectable (7). Sólo la muestra del carril 4 amplificó un producto de aproximadamente 800 pb, muy por encima del producto esperado de 344 pb. Gel de agarosa al 1.5%.

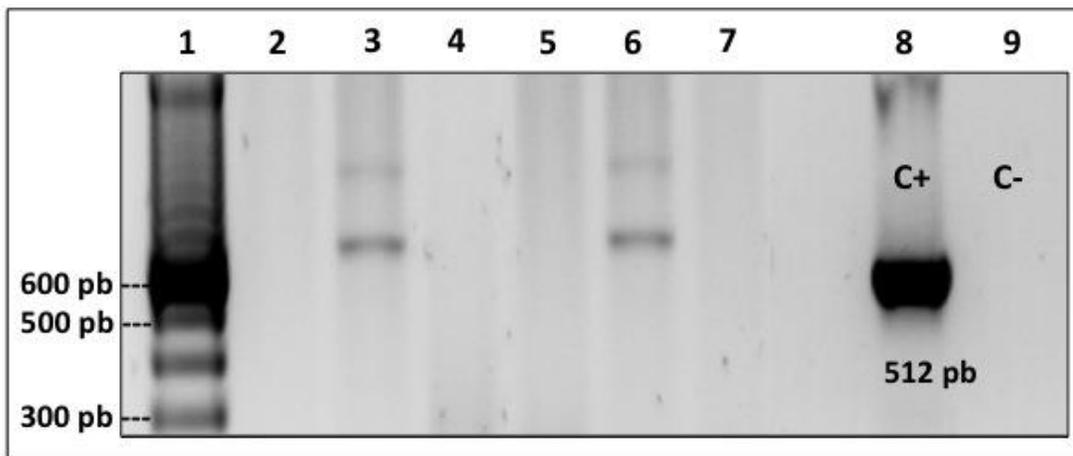


Figura 21. Amplicones del gen *GRA6* de 512 pb de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de león africano (*Panthera leo*). Marcador de peso molecular (1), hígado (2), bazo (3) y encéfalo de león 1 (4), hígado (5), bazo (6) y diafragma de león 2 (7). Control positivo cepa Me49 (8), control negativo agua inyectable (9). Las muestras de bazo de ambos felinos amplifican dos bandas, una de aproximadamente 700 pb y otra de 1200 pb aproximadamente. Gel de agarosa al 1.5%.

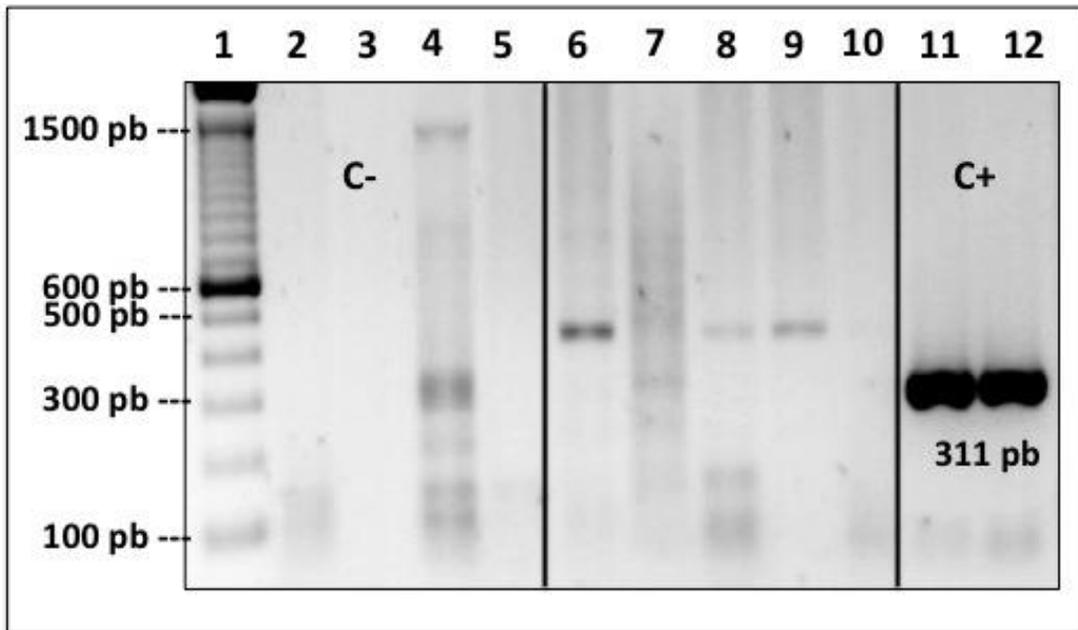


Figura 22. Amplicones del gen SAG3 de 311 pb de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de muflón europeo (*Ovis musimon*) y león africano (*Panthera leo*). Marcador de peso molecular (1), diafragma de muflón 1 (2), músculo (4) y encéfalo (5) de muflón 2. Bazo (6) y encéfalo (7) de león 1, hígado (8), bazo (9) y diafragma (10) de león 2. Controles positivos cepas RH y Me49 (11 y 12), control negativo agua inyectable (3). El patrón de amplificado del herbívoro es diferente del de los carnívoros. En el muflón amplifica la banda esperada muy tenue, una banda por debajo de aproximadamente 300 pb y tres bandas por debajo de aproximadamente 110, 150 y 220 pb. En los tejidos de los leones amplifican una banda de 450 pb, el encéfalo de león 1 (7) es el único de los tejidos de los leones que amplifican la banda esperada de 311 pb además de varias mas tenues de diferentes pesos. En los carriles 2 y 5 no hay producto de amplificación. Gel de agarosa al 1.5%.

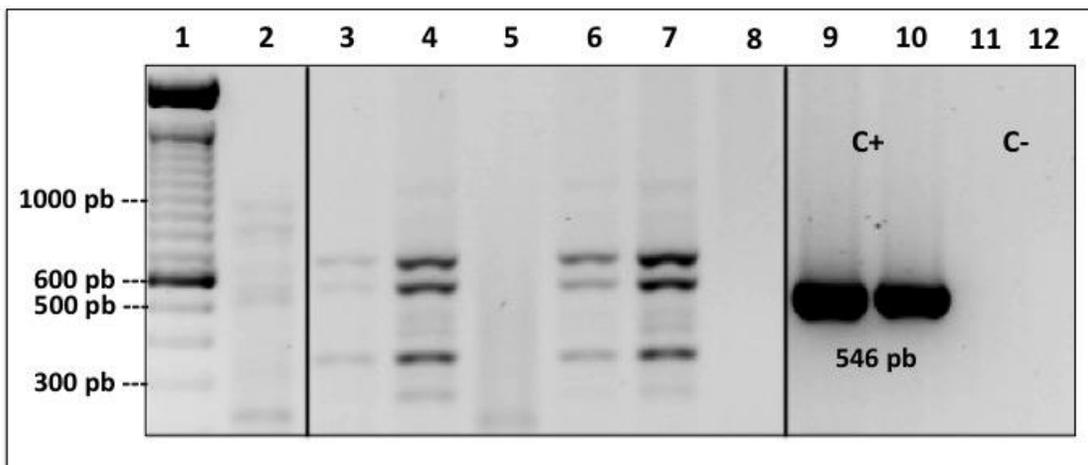


Figura 23. Amplicones del gen SAG2 alternativo de 546 pb de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de muflón europeo (*Ovis musimon*) y león africano (*Panthera leo*). Marcador de peso molecular (1), músculo de muflón 2 (2), hígado (3), bazo (4) y encéfalo de león 1 (5); hígado (6), bazo (7) y diafragma de león 2 (8). Controles positivos cepas RH y Me49 (9 y 10), control negativo agua inyectable (11 y 12). La muestra de muflón amplifica la banda esperada muy tenue pero con múltiples bandas extra por encima y por debajo del peso esperado. Los carnívoros amplifican un par de bandas intensas por encima del peso esperado (600 y 700 pb) o una sola banda de aproximadamente 200 pb (carril 5) al mismo nivel que una del muflón. Carril 8 sin amplificado esperado. El patrón de bandas entre el herbívoro y los carnívoros es diferente llegando a compartir algunas bandas. En el caso de los carnívoros el patrón es igual en los bazos de los 2 animales y los hígados. Gel de agarosa al 1.5%.

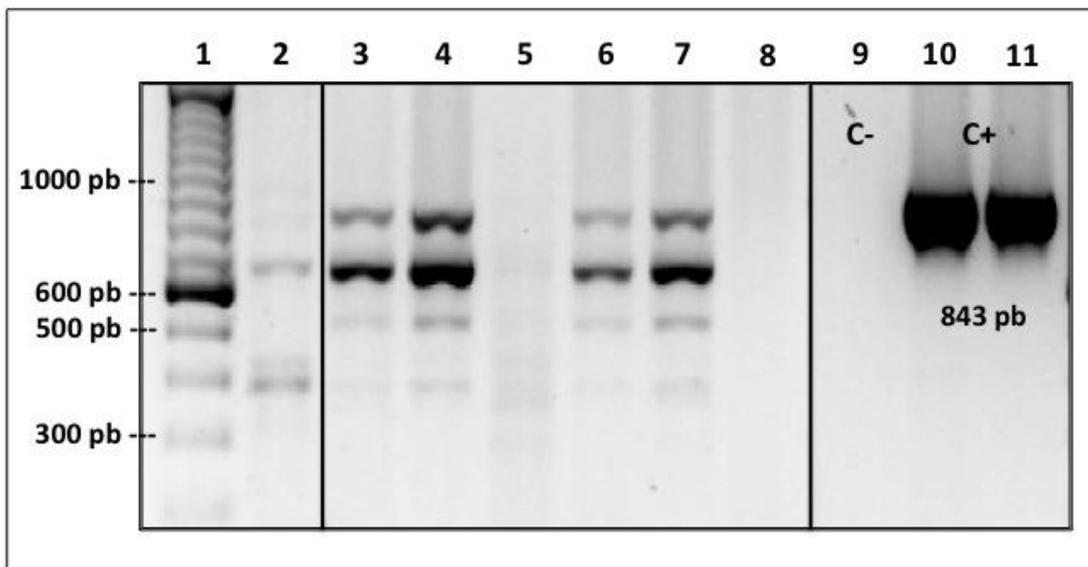


Figura 24. Amplicones del gen *GRA7* de 843 pb de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de muflón europeo (*Ovis musimon*) y león africano (*Panthera leo*). Marcador de peso molecular (1), músculo de muflón 2 (2), hígado (3), bazo (4) y encéfalo de león 1 (5); hígado (6), bazo (7) y diafragma de león 2 (8). Controles positivos cepas RH y Me49 (10 y 11), control negativo agua inyectable (9). En los carriles 3, 4, 6 y 7 se obtuvo la banda del peso esperado y bandas extras por debajo del mismo. En el muflón (carril 2) se obtuvo la banda esperada muy tenue y bandas adicionales por debajo y encima de la esperada. El encéfalo de león (carril 5) amplificó varias bandas leves, mientras que el diafragma (carril 8) no amplificó. Los patrones de bandas son diferentes entre el muflón y los carnívoros. Gel de agarosa al 1.5%.

6.7.3 PCR RFLP

Los productos de amplificación de los genes *SAG2*, *SAG3* y *GRA6* se sometieron a digestión con enzimas de restricción para determinar el genotipo de *T. gondii*. Para el gen *GRA6* la digestión del producto de los bazos del león 1 y 2 dieron como resultado un genotipo diferente a los clásicos. En el caso del gen *SAG3*, el muflón 2 tiene un patrón que coincide con los cortes de las cepas I, II y III, además de algunas bandas adicionales, mientras que en dos de los carnívoros se observó un patrón de corte similar que no concuerda con ninguno de los 3 genotipos clonales. La digestión del gen *SAG2* dio como resultado cortes de varias bandas, dando un patrón diferente a cualquiera de las cepas clonales (**Figuras 25 - 31**).

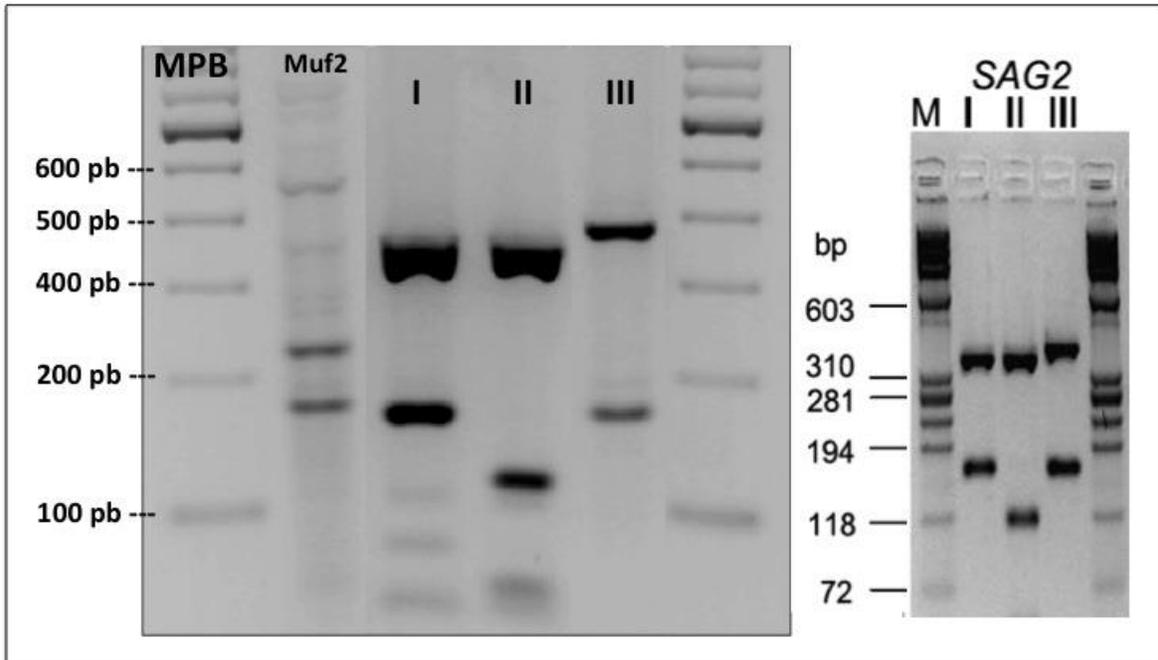


Figura 25. PCR-RFLP para el gen *SAG2* alternativo a partir de tejidos positivos de muflón europeo (*Ovis musimon*). La digestión del producto de PCR se realizó con las enzimas *HinfI* y *TaqI*. Se puede observar que el producto amplificado en el muflón tiene un patrón semejante a las cepas tipo I con alelo(s) extra(s). Como testigos positivos se usaron cepas RH (I), Me49 (II) y una cepa silvestre aislada en el laboratorio (III). Gel de agarosa al 3.5%. Patrón de referencia tomado de Su et al (2006).

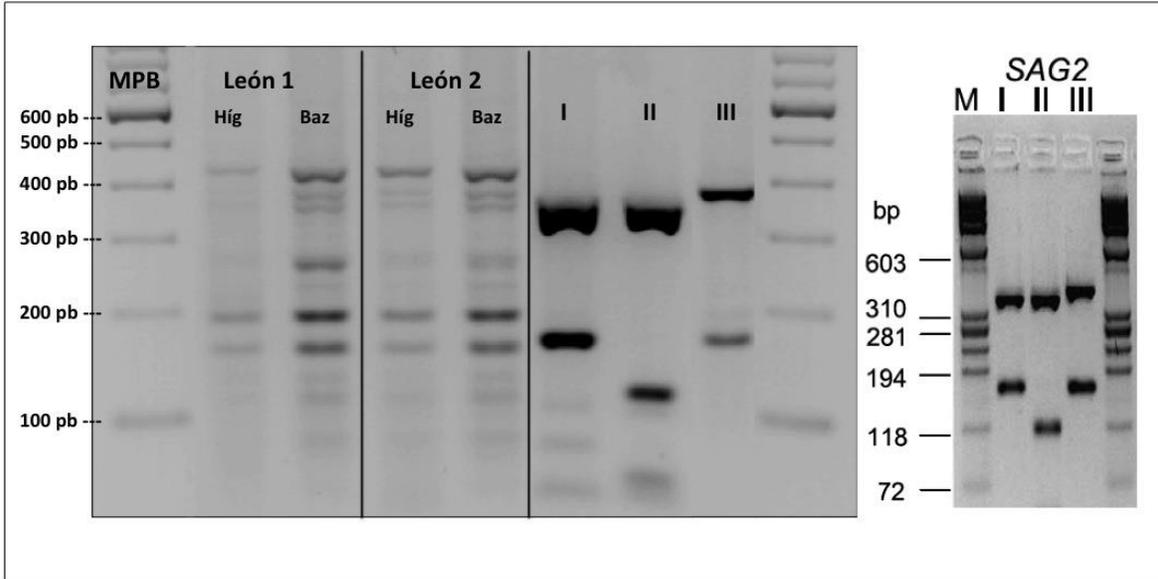


Figura 26. PCR-RFLP para el gen *SAG2* alternativo a partir de tejidos positivos de león africano (*Panthera leo*). La digestión del producto de PCR se realizó con las enzimas *HinfI* y *TaqI*. Se puede observar que las muestras de los leones tienen un patrón de digestión diferente a las cepas de referencia, pero semejante entre los 4 tejidos. Como testigos positivos se usaron cepas RH (I), Me49 (II) y una cepa silvestre aislada en el laboratorio (III). Gel de agarosa al 3.5%. Patrón de referencia tomado de Su et al (2006).

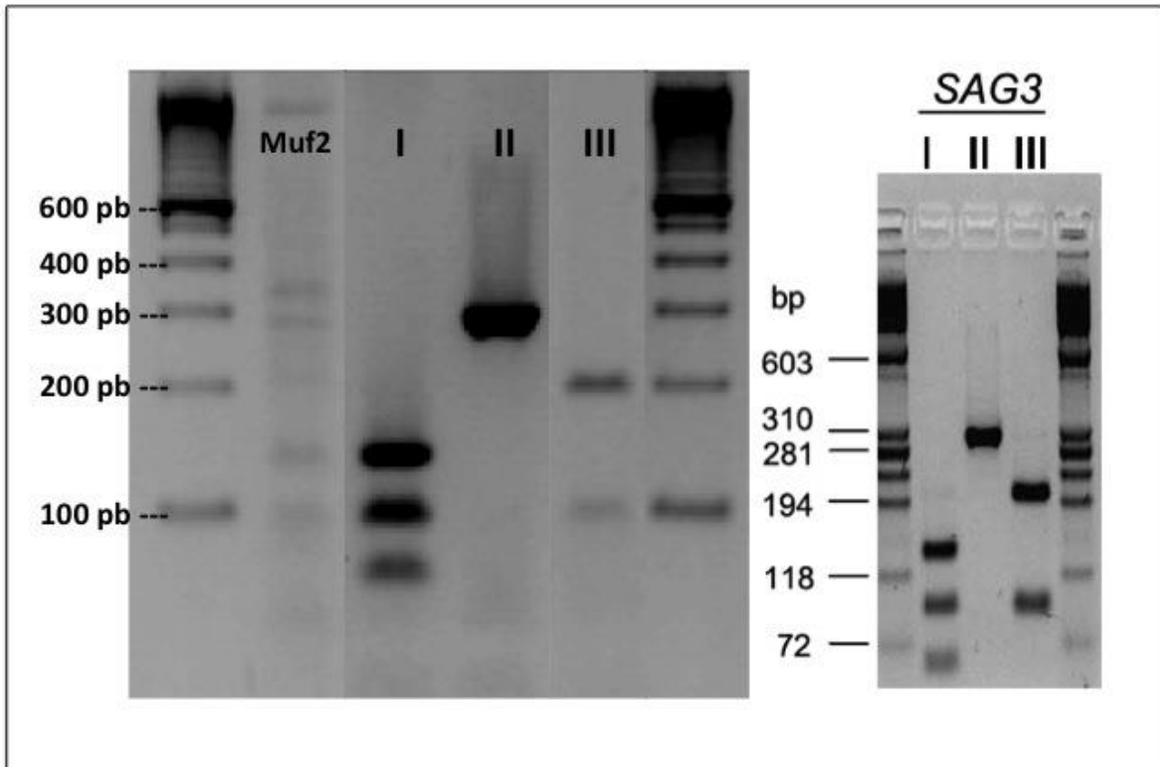


Figura 27. PCR-RFLP para el gen SAG3 (311 pb) a partir de tejidos positivos de muflón europeo (*Ovis musimon*). La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima *NciI*. Se puede observar que el producto amplificado en el muflón tiene un patrón diferente a las cepas de referencia. Como testigos positivos se usaron cepas RH (I), Me49 (II) y una cepa silvestre aislada en el laboratorio (III). Gel de agarosa al 3.5%. Patrón de referencia tomado de Su et al (2006).

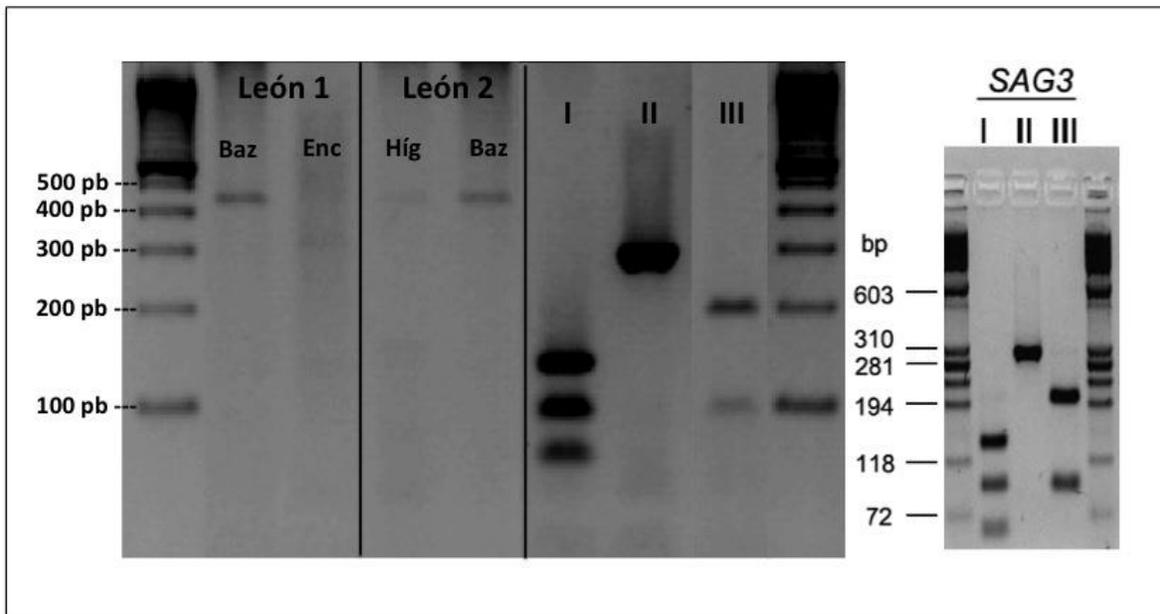


Figura 28. PCR-RFLP para el gen SAG3 (311 pb) a partir de tejidos positivos de león africano (*Panthera leo*). La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima *NciI*. Se puede observar que los productos amplificados en las muestras de los leones no corta ninguna de las bandas del producto de PCR y la banda del encéfalo del león 1 esta al nivel de la cepa tipo II; además ésta es diferente del patrón de los otros 3

tejidos. Como testigos positivos se usaron cepas RH (I), Me49 (II) y una cepa silvestre aislada en el laboratorio (III). Gel de agarosa al 3.5%. Patrón de referencia tomado de Su et al (2006).

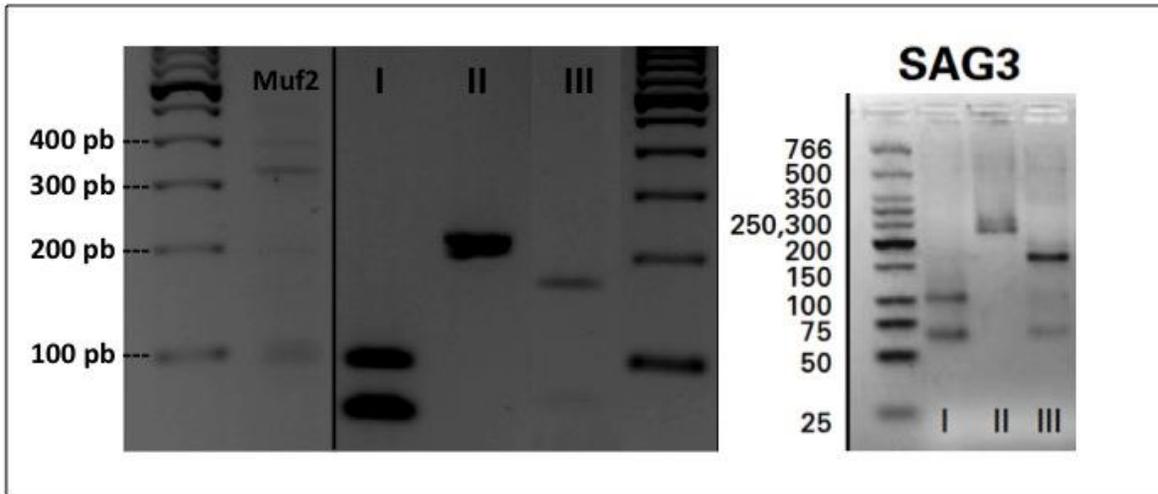


Figura 29. PCR-RFLP para el gen SAG3 (225 pb) a partir de tejidos positivos de muflón europeo (*Ovis musimon*). La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima *NciI*. Se puede observar que hay una banda a la altura de la cepa tipo II y comparte un par de bandas con las de las cepas I y III. Como testigos positivos se usaron las cepas RH (I), Me49 (II) y una cepa silvestre aislada en el laboratorio (III). Gel de agarosa al 3.5%. Patrón de referencia tomado de Su et al (2006).

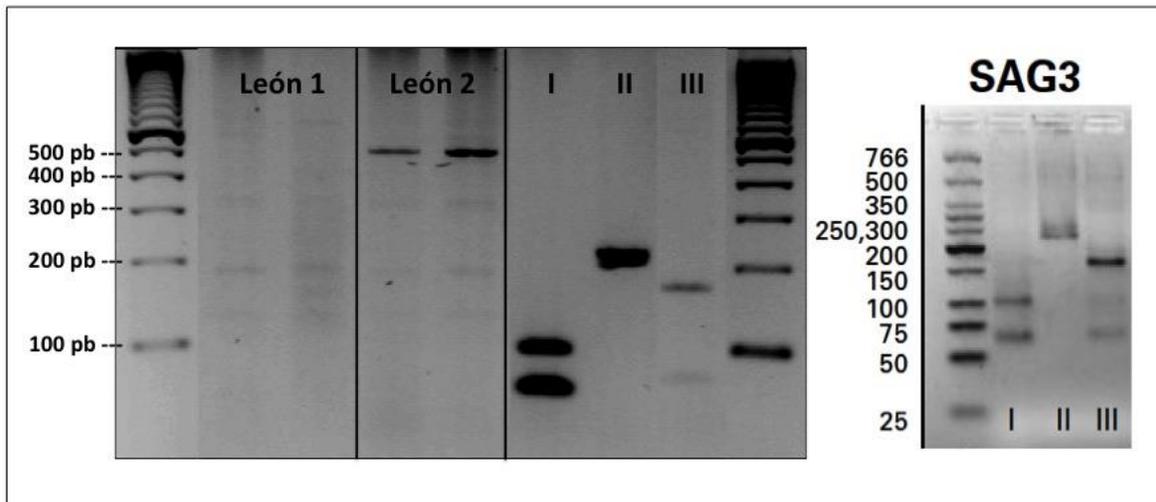


Figura 30. PCR-RFLP para el gen SAG3 (225 pb) a partir de tejidos positivos de león africano (*Panthera leo*). La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima *NciI*. Después de la digestión, el patrón de las muestras es completamente diferente al de las cepas de referencia y éstas difieren entre las de los leones. Como testigos positivos se usaron cepas RH (I), Me49 (II) y una cepa silvestre aislada en el laboratorio (III). Gel de agarosa al 3.5%. Patrón de referencia tomado de Su et al (2006).

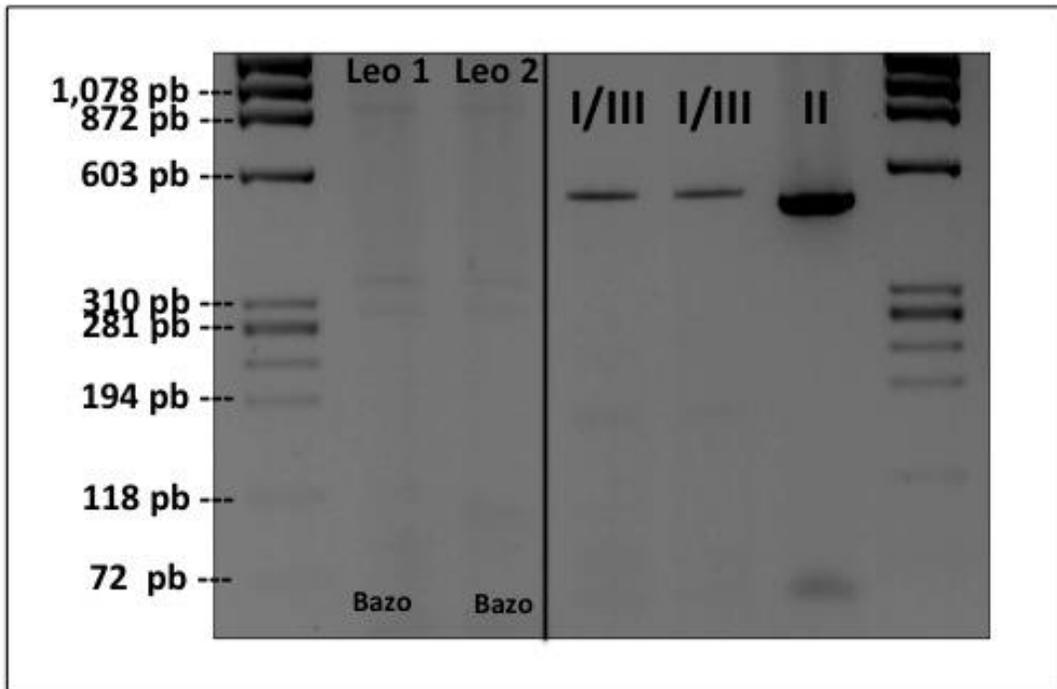


Figura 31. PCR-RFLP para el gen *GRA6* (512 pb) a partir de bazo de león africano (*Panthera leo*). La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima *Msel*. Después de la digestión se puede observar que el patrón de bandas resultante es totalmente diferente a las de las cepas tipo I/III y la II y que la enzima no cortó la banda de mayor peso molecular del producto de amplificación de los leones. Como testigos positivos se usaron cepas Me49 (II) y una cepa silvestre aislada en el laboratorio (III). Gel de agarosa al 3.5%.

Cuadro 13. Resultados de PCR para los diferentes marcadores empleados

I.D.	Tejido	Tox 4-5	B1 362pb	B1 619pb	B1 1,008 pb	GRA6 344pb	GRA6 512pb	GRA6 779pb	GRA7 843pb	SAG3 311pb	SAG3 225pb	SAG2 546pb	BTUB 411pb
Muf-1	Diafragma	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	NR	(-)	NR	NR	NR	NR	NR
	Encéfalo (T)	(-)	(+) ^{400pb}	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	NR	NR	NR	NR
Muf-2	Músculo	(+) 1200pb	u-2 400pb	(-) ^{400pb}	(-)	(-) ^{800pb}	(-)	(-)	u-4	u-5	u-3	u-6	(-)
	Encéfalo (C)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	NR	(-)	NR	NR	NR	NR	NR
León 1	Hígado	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	u-3	NR	NR	u-2	(-)
	Bazo	Sosp.	u-2	(+)	(-)	(-)	u-1	(-)	u-3	(+) ^{450pb}	(+) ^{300pb}	u-7	(-)
	Encéfalo (C)	Sosp.	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	u-2	(+) ^{300pb}	(-)	(-)
León 2	Hígado	(+) 1200pb	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	u-3	u-2 ^{450pb}	u-1	u-6	(-)
	Bazo	(+) 1200pb	u-2	(+)	(-)	(-)	u-1	(-)	u-3	(+) ^{450pb}	u-1	u-7	(-)
	Diafragma	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) ^{450pb}	(+) ^{500pb}	(-)	(-)

u-1, u-2, u-3, etc: alelos adicionales a la banda esperada

NR: No realizado

T = Tálamo

C = Corteza

7. Discusión

La toxoplasmosis es un problema de manejo en zoológicos y colecciones privadas, debido a que los felinos silvestres pueden excretar ooquistes de *T. gondii* en sus heces y a la presencia de gatos ferales en estos sitios, por lo que pueden ser causantes de infección en otros animales así como de humanos (Weiss y Kim, 2013).

La presentación de *T. gondii* en animales de zoológico se considera de interés particular para la medicina veterinaria y ciencias biológicas, debido a que muchas especies de animales en cautiverio mueren por toxoplasmosis, además de ser una fuente potencial de exposición para los visitantes e incluso para quienes viven cerca (Dubey y Jones, 2008). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de este protozooario en animales herbívoros y carnívoros silvestres de una colección privada.

La frecuencia de casos de muflones seropositivos a *T. gondii* por ELISA resultó inferior (7.3%) a lo reportado por Hejlícek (1997), Gauss (2006) y Aubert (2010), pero superior a lo descrito por Sedlák (2006), Bartova (2007) y Alvarado-Esquivel (2013); las comparaciones se deben hacer con reservas, ya que estos estudios fueron realizados utilizando técnicas diagnósticas distintas a la empleada en el presente estudio (Sabin-Feldman Dye test, IFAT y MAT), así como diferentes tamaños de muestra. En México, solo hay un registro sobre frecuencia de infección en muflones (*Ovis musimon*) de un zoológico del Distrito Federal, en el cual los únicos dos animales probados resultaron negativos (Alvarado-Esquivel et al., 2013). Esto puede deberse a que los animales de esa locación están en confinamiento, que si bien están expuestos a la infección por *T. gondii*, el riesgo es menor comparado con el del presente estudio, ya que se encuentran en semi-libertad (de Camps et al., 2008). Aunque los muflones de este estudio están en Puebla, la frecuencia de infección fue considerablemente más baja que lo descrito por Figueroa-Castillo et al (2006) en conejos y por Caballero-Ortega et al (2008a) en borregos domésticos. No obstante que es el mismo estado de la república, la granja de los lepóridos está más cerca del D.F., mientras que la de los borregos se

encuentra en la frontera con el estado de Veracruz, teniendo condiciones climatológicas distintas en los tres estudios.

A pesar de que no se pudieron determinar las fuentes de infección, el hallazgo de seropositividad en herbívoros sugiere que los animales fueron expuestos al parásito principalmente a través de la ingestión de ooquistes, ya sean eliminados por gatos ferales o por transportación mecánica de ooquistes eliminados por felinos silvestres de la colección y esparcidos a otros animales a través del ropaje de los guarda animales, botas o equipo de limpieza, ruedas de los vehículos o por aves e insectos que funcionan como huéspedes transportadores (de Camps et al., 2008).

Este es el primer trabajo que reporta la incidencia de *T. gondii* en muflones (12.2% anual), parámetro elevado respecto a un reporte previo en borregos domésticos de Puebla-Veracruz, el cual fue de 2.1% (Caballero-Ortega et al., 2008a). Esta diferencia puede deberse a que en este trabajo se empleó un conjugado anticabra para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* en muflones, mientras que en el reporte previo se usó un conjugado específico de especie, por lo que cabría la posibilidad de que estos animales fueran falsos positivos, pero al ser positivos por PCR se confirma que son verdaderos positivos. Una alternativa para afinar este dato sería usar otras técnicas diagnósticas como MAT, la cual es ampliamente usada en diagnóstico de infecciones en fauna silvestre, para corroborar a los animales positivos. Otra posibilidad pudiera ser la época del año en la que se colectaron las muestras, ya que se ha reportado un patrón estacional de transmisión de este parásito, siendo mayor en otoño e invierno y menor en primavera-verano, dato que coincide con la época en la que fueron muestreados los animales (Gilot-Fromont et al., 2012).

En los carnívoros se han reportado frecuencias que van del 7% al 100%, presentándose las frecuencias más elevadas en animales en cautiverio (**Cuadro 5**). Alvarado-Esquivel et al., (2013) determinaron la frecuencia de infección en felinos silvestres en cautiverio; de 10 especies de felinos, 9 resultaron positivas a la infección por *Toxoplasma* en tres zoológicos de la Ciudad de México (**Cuadro 6**). La alta seropositividad tiene significancia en salud pública, ya que todos los

felinos tienen el potencial de excretar ooquistes cuando son infectados por este protozoario (Cañón-Franco, 2013; Dubey, 2009). Los felinos de la colección estudiada son alimentados principalmente con carne de pollo o de caballo refrigerada o con algunos días de congelación. La infección por *T. gondii* ha sido reportada en pollos (Dubey et al., 2004) y caballos (Alvarado-Esquivel et al., 2012) en México. Por lo tanto, alimentar animales con esa carne es un factor de riesgo para la transmisión de este parásito en animales silvestres en cautividad (Alvarado-Esquivel et al., 2013). Suministrar carne congelada a -12°C por 7 días es considerada la estrategia más práctica para reducir la infección por *T. gondii* en carnívoros. A pesar de que los quistes tisulares son destruidos instantáneamente a -12°C , las temperaturas internas en congeladores para almacenar carne pueden variar considerablemente y en algunos casos se ha reportado que tan sólo llegan a -2°C . Por lo anterior, se recomienda congelar la carne al menos una semana antes de alimentar a los carnívoros (Dubey, 2009).

La evaluación de los tejidos por técnicas anatomopatológicas convencionales no permitió identificar lesiones asociadas a infección aguda o crónica por *T. gondii* en ninguno de los animales muestreados, por lo que se decidió realizar la Inmunohistoquímica (IHQ) para detectar quistes tisulares de este parásito. Sólo se encontraron estructuras inmunopositivas en tejido muscular de un muflón y en encéfalo de los carnívoros, sugerentes de infección por *T. gondii*. Esto concuerda con lo encontrado por Benavides et al. (2011), quienes infectaron borregos con ooquistes por vía oral para desarrollar un modelo experimental de toxoplasmosis y evaluar el desarrollo de lesiones y su distribución en tejidos. Los animales fueron sometidos a manejo de eutanasia entre la semana 2 y 6 después de la inoculación, extrajeron tejidos y fueron procesados para análisis histopatológico e inmunohistoquímica; sus principales hallazgos fueron focos de gliosis y manguitos perivasculares en el sistema nervioso central y miositis intersticial en el corazón. Además de estos focos de gliosis, observaron quistes tisulares y estructuras compatibles con taquizoítos en la corteza cerebral anterior y encéfalo medio, corazón, pulmón y nódulos linfáticos. Silva et al., (2013) realizaron la identificación de *T. gondii* en cerebro, hígado y corazón de borregos positivos por MAT por

medio de IHQ. El 46.2% de los animales (12/26) fueron positivos por IHQ en al menos un órgano, siendo el hígado el sitio donde más se detectaron quistes y taquizoítos de este parásito. En los ovinos con títulos de anticuerpos altos, se encontraron quistes tisulares en los 3 órganos mencionados, mientras que en los animales con títulos bajos, el corazón fue el órgano en el que encontraron quistes con más frecuencia. Cabe señalar que al igual que en este trabajo, los quistes tisulares encontrados eran pequeños y no tenían la forma característica de los quistes tisulares de *Toxoplasma*. Por histopatología convencional con tinción HE, los autores refieren que no pudieron encontrar estructuras parasitarias compatibles con *T. gondii*, ya que los quistes son tan pocos y pequeños, que se dificulta su observación. En cabras domésticas, también hay reportes de animales positivos por serología y negativos por histopatología o IHQ (Rosa et al., 2001; da Silva y Langoni, 2001). Estos hallazgos pueden estar relacionados con las diferentes etapas de infección en el animal, su estado físico e inmunológico al momento de la eutanasia o incluso la edad, ya que con el tiempo los quistes tisulares podrían haber degenerado (Silva et al., 2013). O, por el contrario, si la infección es de corta duración, los quistes no han alcanzado el tamaño esperado, toda vez que los bradizoítos no se han replicado lo suficiente para alcanzar los tamaños de aquellos presentes en infecciones de larga duración. Adicionalmente durante la revisión de los cortes se encontraron quistes tisulares de *Sarcocystis* spp inmunonegativos, por lo cual se sugiere que la IHQ realizada es específica para *T. gondii* y no hay reacción cruzada. En la literatura, se han reportado casos similares para *Sarcocystis* y *Neospora* por otros autores, quienes demostraron actividad específica de los anticuerpos empleados, tanto policlonales como los monoclonales (Hettiarachchi y Rajapakse, 2009; Uzêda et al., 2013). En un león y en un muflón se encontraron quistes tisulares de *Sarcocystis* en encéfalo, hallazgo poco común pero reportado en otros casos en borregos domésticos y nutrias marinas (*Enhydra lutris*) (Beyazit, 2005; Dubey y Thomas, 2011; Dubey et al., 2001; Fitzgerald et al., 1993; Miller et al., 2010; O'Toole et al., 1993; Scott y Watt, 1993).

Los casos positivos por serología fueron probados por PCR en tiempo real previo a determinar el genotipo del parásito. A pesar de ser una prueba altamente sensible y ser capaz de detectar el DNA de un solo taquizoíto, hubo casos de algunos órganos que fueron clasificados como sospechosos y que fueron confirmados con la PCR punto final. Esto puede ser debido a que en la PCR punto final se adicionan 2 µg de DNA mientras que en tiempo real sólo se emplean 50 ng, por lo que el DNA de *T. gondii* podría estar muy diluido en la muestra. Algunos estudios han demostrado que la carga parasitaria baja en órganos del huésped, o el procesamiento de pequeños fragmentos de tejido pueden ser la causa de la no detección del parásito usando la PCR, a pesar de que los animales tengan la infección (Miller et al., 2008).

Los siete marcadores empleados para la detección del genoma de *T. gondii* permitieron diagnosticar 4 casos positivos por PCR punto final a partir de muestras clínicas, obteniéndose productos de amplificación de diferentes tejidos (encéfalo, músculo estriado esquelético, hígado, bazo).

Mediante el uso de los oligonucleótidos TOX4 y TOX5, se logró la amplificación de un producto de aproximadamente 1200 pb en uno de los muflones y en uno de los leones, cuando el esperado era de 529 pb. Al realizar un análisis bioinformático a partir de secuencias de cepas aisladas en China, Alemania y EUA se aprecia que al estar en “tándem” hay casos en los que la secuencia del oligonucleótido de término se ensambla con el de inicio de la siguiente secuencia, por lo que no es descabellado suponer que algunas cepas tengan cambios en esta región y se amplifiquen productos mayores al esperado (Song et al., 2007).

Para el marcador *B1* de 362 pb se observó que la banda de los herbívoros está ligeramente por encima del producto esperado. Pena et al., (2013) encontraron algo similar a partir de un aislamiento obtenido de tejidos de gallinas de Brasil; por ello, secuenciaron la banda y se dieron cuenta que tenía una inserción de aproximadamente 20 pb con respecto a las cepas de referencia (**Figura 19**). En los carnívoros la banda está a la altura esperada pero en los bazos de ambos leones se presentó un par de bandas adicionales que difieren con el patrón del encéfalo del león 1, lo cual nos hace suponer que este felino podría estar infectado

con parásitos de dos tipos diferentes y uno de esos es compartido por los dos carnívoros estudiados (**Figura 19**).

Con el gen *GRA6* se logró un amplificado específico de 512 pb en los carnívoros y de 344 pb para un herbívoro; se han dado casos de genotipos atípicos en los cuales este gen no se amplifica; por ejemplo en muestras de seres humanos no se ha logrado la amplificación para *GRA6*, pero sí en las de los animales (Besné-Mérida, 2010; Cedillo-Peláez et al., 2011; Cedillo-Peláez, 2009; Rico-Torres et al., 2012) por lo que podría darse el caso de que sea común que algunas cepas no clásicas tengan un cambio en la secuencia, que ocasionaría que los iniciadores usados no puedan hibridar con la secuencia que posee este gen en particular. Para el gen *SAG3* solamente ha habido un reporte publicado de un alelo atípico (Pena et al., 2013) por lo que al tener las bandas extra, el presente estudio podría ser el segundo caso.

Como se puede apreciar para varios de los marcadores, además del producto esperado aparecieron bandas múltiples por encima y por debajo de la esperada.

Lilly y Wortham, (2013) evaluaron la prevalencia de ooquistes en heces de gatos ferales en Virginia, EUA usando los iniciadores TOX4 y TOX5 que amplifican una secuencia repetitiva de 529 pb y encontraron que en varias de las muestras se amplificaban bandas extra además del producto esperado (de 8 a 10 bandas). Los autores lo atribuyeron a una amplificación inespecífica y sólo cortaron las bandas del peso esperado para secuenciar. Sus resultados fueron que de 6 de 9 amplificados fueron falsos positivos y que al comparar las secuencias coincidían con bacterias fecales comunes. Chabbert y Lachaud (2004) obtuvieron resultados similares, al evaluar dos juegos de iniciadores para el diagnóstico de *T. gondii* por PCR, obteniendo productos adicionales que llamaron “productos de amplificación espurios” en muestras de líquido amniótico de seres humanos positivos. Al cortar y secuenciar encontraron que éstos diferían de los productos originales por unos cuantos pares de bases y correspondían a segmentos de los cromosomas 3 y 10 humanos. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser producto de degradación parcial del DNA, o amplificación inespecífica de algunas bandas como describen algunos autores; lo relevante es que hay patrones de bandas muy

similares en diferentes órganos de diferentes animales, además de que amplificaron más de 3 marcadores lo que sugiere que se trata de una cepa atípica o no clásica de *T. gondii*.

Dubey et al., (2004a) han enfatizado la necesidad de replicar las muestras primarias en ratones (bioensayo) debido a que la cantidad de DNA de *T. gondii* en tejidos puede ser menor a 250 µg/100 g de tejido. Esta observación podría explicar la dificultad para amplificar DNA genómico de las muestras de tejido analizado.

Se han reportado varios casos de genotipificación en herbívoros silvestres, sin embargo este es el primer trabajo sobre genotipificación en muflones (*Ovis musimon*). El patrón de RFLP obtenido en tejidos de muflón es parecido al de los genotipos I, II y III para los genes *SAG2* Alt. y *SAG3*, lo que podría sugerir multi-infección con más de una cepa diferente, como ya ha sido descrito previamente por Su et al., (2006), quienes además de encontrar el patrón de bandas del tipo I, observaron un patrón adicional con variación en la intensidad de las bandas que no corresponde a ninguno de los genotipos clásicos, por lo cual se denominó u-1 o atípico al no coincidir con ninguno de los clonales.

Se han reportado algunos casos de infección mixta o multi-infección por *T. gondii* en huéspedes intermediarios (Ajzenberg et al., 2002; Aspinall et al., 2003; Dubey et al., 2003; Dubey et al., 2005). La detección de infecciones mixtas es de particular interés en estudios epidemiológicos ya que demuestran la circulación de varias cepas en una región en particular que pueden dar como resultado la recombinación y generación de nuevas variantes. Para que ocurra intercambio genético, el huésped definitivo debe ingerir diferentes tipos de parásito de su presa (huésped intermediario) casi al mismo tiempo. Las infecciones múltiples en las presas pueden proveer una excelente oportunidad para que ocurra la recombinación genética en el intestino de los felinos (Su et al., 2006).

El patrón de bandas para los diferentes marcadores fue muy similar entre las muestras de los dos carnívoros, pero diferente al observado en los muflones, lo que hace suponer que son genotipos diferentes y que hay al menos dos o tres tipos de cepas circulando en la colección y uno de ellos lo comparten los leones entre sí. Para el fragmento de 512 pb del gen *GRA6* se observó que su digestión

no concuerda con el de la cepa de referencia y tiene una banda por encima del peso esperado, lo cual sugiere que se trata de un genotipo atípico o no clásico. En felinos silvestres se han realizado diversos estudios de genotipificación (**Cuadro 7**). *Toxoplasma gondii* ha sido aislado de tejidos de lince adultos, felinos de vital importancia para mantener el ciclo del parásito en herbívoros silvestres de varias regiones de EUA (Dubey et al., 2004; Weiss y Kim, 2013). Dubey et al., (2011) y Khan et al., (2011) caracterizaron 30 muestras de felinos de EUA usando PCR-RFLP en los genes *B1*, *SAG1* y *GRA6*. Se encontraron los genotipos I y II en un puma, cepas recombinantes II-III y el genotipo atípico-X clasificado como el cuarto linaje clonal de EUA en lince rojo (*Lynx rufus*). Este último genotipo X correlaciona con la contaminación de ooquistes en la costa de California y la introducción de la infección en focas y nutrias marinas de la región (Miller et al., 2008, 2004).

En Canadá una epidemia de toxoplasmosis en Victoria, Columbia Británica fue ocasionada por ooquistes excretados por pumas (*Puma concolor*) que contaminaron el agua. Estas formas parasitarias fueron colectadas en excretas de estos animales cerca de los cúmulos de agua y se confirmó que eran del mismo genotipo atípico encontrado en las personas; a la fecha es el único lugar del mundo donde se ha encontrado ese tipo de *T. gondii* (Aramini et al., 1998; Dubey et al., 2008).

De los genotipos descritos previamente en México (**Cuadro 8**) la mayoría han sido tipo I, III y recombinantes I-III, un par de atípicos en Durango, aislados de una paloma, un gato feral que comparten el mismo genotipo y un puma que estaba en las inmediaciones de la ciudad. En la región centro del país la mayoría han sido clonales tipo I y una recombinante en un perro. Los resultados aquí presentados difieren con lo reportado previamente en la literatura, lo que nos hace pensar que en México podría haber una mayor diversidad genética de lo reportado hasta el momento, dependiendo de la región y estar en un escenario parecido a lo reportado en centro y Sudamérica.

Este es el primer estudio en el cual se llevó a cabo la genotipificación de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras clínicas de muflón europeo y león africano en México.

8. Conclusiones

La toxoplasmosis es de baja prevalencia en los herbívoros de la colección de Puebla estudiada. A pesar de ello, la incidencia parece alta, por lo que debe determinarse si la prueba serológica empleada tiene baja sensibilidad o especificidad. Para ello, se requiere una validación comparando con otras pruebas como MAT.

En los carnívoros la prevalencia fue muy alta, posiblemente debido a que estaban más expuestos a ser infectados por quistes y/u ooquistes por su edad avanzada. Los estudios de PCR en punto final y de genotipificación sugieren que existen tipos de *T. gondii* diferentes a los clásicos y a otros reportados en México; además podría haber multi-infecciones, por lo que es probable que haya más de un genotipo circulando entre los animales de la colección. Sin embargo, los amplicones de todos los casos deben secuenciarse para obtener conclusiones definitivas.

Debido a que fue confirmada la infección por parte de *T. gondii* en los felinos silvestres, es necesario implementar medidas para evitar la infección a partir de carne con quistes tisulares congelándola a -12° C o en su defecto mantenerla congelada por al menos siete días.

Referencias

- Ajzenberg, D., Bañuls, A. L., Tibayrenc, M., & Dardé, M. L. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*, *32*, pp. 27–38.
- Alerte, M. (2008). Prevalence de *Toxoplasma gondii* sur les animaux D'un parc zoologique (Amneville) : seroprevalence et isolement du parasite. , p. 131.
- Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Villena, I., & Dubey, J. P. (2013d). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic rabbits in Durango State, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, *111*(3-4), pp. 325–8. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746573>
- Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Malacón, M. a, Reyes-Hernández, S. O., Pérez-Ramírez, J. a, Trujillo-López, J. I., Villena, I., et al. (2012c). High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *The Journal of Parasitology*, *98*(6), pp. 1248–50. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22559725>
- Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Malacón, M. a, Reyes-Hernández, S. O., Pérez-Ramírez, J. a, Trujillo-López, J. I., Villena, I., et al. (2013a). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic sheep in Oaxaca State, Mexico. *The Journal of Parasitology*, *99*(1), pp. 151–2. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22712886>
- Alvarado-Esquivel, C., García-Machado, C., Alvarado-Esquivel, D., González-Salazar, a M., Briones-Fraire, C., Vitela-Corrales, J., et al. (2011b). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*, *97*(4), pp. 616–9. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21506843>
- Alvarado-Esquivel, C., García-Machado, C., Alvarado-Esquivel, D., Vitela-Corrales, J., Villena, I., & Dubey, J. P. (2012a). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*, *98*(2), pp. 271–3. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21916621>
- Alvarado-Esquivel, C., García-Machado, C., Vitela-Corrales, J., Villena, I., & Dubey, J. P. (2011a). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Durango State, Mexico. *Veterinary Parasitology*, *183*(1-2), pp. 43–6. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767913>

- Alvarado-Esquivel, C., Gayosso-Domínguez, E., Villena, I., & Dubey, J. P. (2013c). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in three zoos in Mexico City, Mexico. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(3), pp. 803–806. Retrieved September 25, 2013, from <http://zoowildlifejournal.com/doi/abs/10.1638/2013-0032.1>
- Alvarado-Esquivel, C., Liesenfeld, O., Herrera-Flores, R. G., Ramírez-Sánchez, B. E., González-Herrera, a, Martínez-García, S. a, et al. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 93(5), pp. 1214–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163360>
- Alvarado-Esquivel, C., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Kwok, O. C. H., Choudhary, S., Alvarado-Esquivel, D., et al. (2011c). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 97(5), pp. 809–12. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612413>
- Alvarado-Esquivel, C., Rodríguez-Peña, S., Villena, I., & Dubey, J. P. (2012b). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 98(5), pp. 944–5. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22559329>
- Alvarado-Esquivel, C., Sánchez-Okrucky, R., & Dubey, J. P. (2012d). Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 184(2-4), pp. 321–4. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944844>
- Alvarado-Esquivel, C., Silva-Aguilar, D., Villena, I., & Dubey, J. P. (2013b). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy goats in Michoacán State, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 99(3), pp. 540–2. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23116086>
- Alvarado-Esquivel, C., Silva-Aguilar, D., Villena, I., & Dubey, J. P. (2013e). Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Michoacán State, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*. Retrieved October 23, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24063950>
- Álvarez, J., Medellín, R., Olivares, A., Gómez, H., & Sánchez, O. (2008). *Animales exóticos en México. Una amenaza para la biodiversidad*. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, UNAM, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- André, M. R., Adania, C. H., Teixeira, R. H. F., Silva, K. F., Jusi, M. M. G., Machado, S. T. Z., et al. (2010). Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids.

The Journal of Parasitology, 96(5), pp. 1007–9. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950109>

Aramini, J. J., Stephen, C., & Dubey, J. P. (1998). *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*) serology and oocyst shedding. *The Journal of Parasitology*, 84(2), pp. 438–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576522>

Aspinall, T. V., Guy, E. C., Roberts, K. E., Joynson, D. H. M., Hyde, J. E., & Sims, P. F. G. (2003). Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *International Journal for Parasitology*, 33, pp. 97–103.

Aubert, D., Ajzenberg, D., Richomme, C., Gilot-Fromont, E., Terrier, M. E., de Gevigney, C., et al. (2010). Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), pp. 346–9. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20417034>

Barragan, A., & Sibley, L. D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in microbiology*, 11, pp. 426–430.

Bartova, E., Sedlak, K., Pavlik, I., & Literak, I. (2007). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in wild ruminants from the countryside or captivity in the Czech Republic. *The Journal of Parasitology*, 93(5), pp. 1216–8. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163361>

Basso, W., Moré, G., Quiroga, M. A., Pardini, L., Bacigalupe, D., Venturini, L., et al. (2009). Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 161, pp. 201–206.

Basso, W., Venturini, M. C., Moré, G., Quiroga, a, Bacigalupe, D., Unzaga, J. M., et al. (2007). Toxoplasmosis in captive Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), pp. 157–61. Retrieved October 23, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056183>

Benavides, J., Maley, S., Pang, Y., Palarea, J., Eaton, S., Katzer, F., et al. (2011). Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), pp. 209–15. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440372>

- Bermúdez, R., Faílde, L. D., Losada, a P., Nieto, J. M., & Quiroga, M. I. (2009). Toxoplasmosis in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, 160 (1-2), pp. 155–8. Retrieved October 23, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046816>
- Besn -Mérida, A. (2010). Caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) de distintas regiones de México (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. , p. 53.
- Besn -Mérida, A., Figueroa-Castillo, J. A., Martínez-Maya, J. J., Luna-Pastén, H., Calder n-Segura, E., & Correa, D. (2008). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Veterinary Parasitology*, 157 (3-4), pp. 310–3. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774649>
- Beyazit, A. (2005). Encephalomyelitis associated with a Sarcocystis-like protozoan in a ten-month-old ewe lamb. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29, pp. 1209–1212. Retrieved February 10, 2014, from <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-05-29-5/vet-29-5-20-0406-15.pdf>
- Black, M. W., & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, pp. 607–623.
- Boothroyd, J. C., & Grigg, M. E. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current Opinion in Microbiology*, 5, pp. 438–442.
- Bowman, D. D. (2008). *Georgis' Parasitology for Veterinarians, 9th ed.* Saunders. Retrieved November 19, 2013, from <http://www.amazon.com/Georgis-Parasitology-Veterinarians-Dwight-Bowman/dp/1416044124>
- Caballero-Ortega, H., Palma, J. M., García-Márquez, L. J., Gildo-Cárdenas, A, & Correa, D. (2008b). Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology*, 135(12), pp. 1385–9. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801208>
- Caballero-Ortega, H., Quiroz-Romero, H., Olazar n-Jenkins, S., & Correa, D. (2008a). Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology*, 135(8), pp. 897–902. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474123>

- Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F. J., Conde-Glez, C. J., Cedillo-Pelaez, C., Vargas-Villavicencio, J. A., Luna-Pastén, H., et al. (2012). 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*, 106(11), pp. 653–9. Retrieved November 19, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998951>
- De Camps, S., Dubey, J. P., & Saville, W. J. a. (2008). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the midwestern United States. *The Journal of Parasitology*, 94(3), pp. 648–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18605803>
- Cañón-Franco, W. (2013). *Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, Sao Paulo*, (26), pp. 50–67. Retrieved September 22, 2013, from http://www.researchgate.net/publication/236884344_Toxoplasma_gondii_in_small_neotropical_wild_felids_Toxoplasma_gondii_em_pequenos_felinos_silvestres_neotropicais/file/50463519e39c9d687e.pdf
- Cañón-Franco, W. a, Araújo, F. a P., López-Orozco, N., Jardim, M. M. a, Keid, L. B., Dalla-Rosa, C., et al. (2013). *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: Molecular detection and genotypic characterization. *Veterinary Parasitology*. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932730>
- Castillo-Morales, V. J., Acosta Viana, K. Y., Guzmán-Marín, E. D. S., Jiménez-Coello, M., Segura-Correa, J. C., Aguilar-Caballero, a J., et al. (2012). 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, p. 529108. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3446670&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Cedillo-Peláez, C. (2009). Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre de México (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. , p. 149.
- Cedillo-Peláez, C., Díaz-Figueroa, I. D., Jiménez-Seres, M. I., Sánchez-Hernández, G., & Correa, D. (2012). Frequency of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stray dogs of Oaxaca, México. *The Journal of Parasitology*, 98(4), pp. 871–2. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360636>
- Cedillo-Peláez, C., Rico-Torres, C. P., Salas-Garrido, C. G., & Correa, D. (2011). Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico.

Veterinary Parasitology, 180(3-4), pp. 368–71. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466920>

Chabbert, E., & Lachaud, L. (2004). Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid , blood , and tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), pp. 1719–1722. Retrieved January 13, 2014, from <http://jcm.asm.org/content/42/4/1719.short>

Chávez-Crisóstomo, D. O. (2010). Aislamiento de *Toxoplasma gondii* de tejido cerebral de un becerro infectado (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. , p. 105.

Cooper, J. E. (2002). Diagnostic pathology of selected diseases in wildlife. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 21, pp. 77–89.

Cooper, J. E., & Cooper, M. E. (2007). *Introduction to veterinary and comparative forensic medicine*. Wiley-Blackwell. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.amazon.com/Introduction-Veterinary-Comparative-Forensic-Medicine/dp/1405111011>

Córdoba-Izquierdo, G. Martínez-García, G. Mejía-Pantaleón, G. (2005). Presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en vacas lecheras , humanos y cánidos (Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in dairy cows , human and canidae). *Revista Electrónica de Veterinaria*, VI(8), pp. 1–5.

Cruz-Vazquez, C., Garcia-Vazquez, Z., Rosario-Cruz, R., & Solorzano-Salgado, M. (1992). Ovine toxoplasmosis in Huitzilac, Morelos, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 12(1-2), pp. 27–33. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016758779290066O>

Dardé, M. L., Bouteille, B., & Pestre-Alexandre, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *The Journal of Parasitology*, 78, pp. 786–794.

Dardé, M. L. (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 40, pp. 57–63.

Demar, M., Ajzenberg, D., Serrurier, B., Dardé, M. L., & Carme, B. (2008). *Atypical Toxoplasma gondii strain from a free-living jaguar (Panthera onca) in French Guiana*.

Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28, pp. 1019–1024.

Dubey, J. P. (2009). *Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second Edition*. CRC Press. Retrieved November 19, 2013, from

<http://www.amazon.com/Toxoplasmosis-Animals-Humans-Second-Edition/dp/1420092367>

- Dubey, J. P., Alvarado-Esquivel, C., Herrera-Valenzuela, V. H., Ortiz-Diaz, J. J., Oliveira, S., Verma, S. K., et al. (2013). 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*. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849518>
- Dubey, J. P., Alvarado-Esquivel, C., Liesenfeld, O., Herrera-Flores, R. G., Ramírez-Sánchez, B. E., González-Herrera, a, et al. (2007). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango City, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 93(5), pp. 1033–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163336>
- Dubey, J. P., & Carpenter, J. L. (1993). Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203, pp. 1546–1549.
- Dubey, J. P., & Crutchley, C. (2008). Toxoplasmosis in wallabies (*Macropus rufogriseus* and *Macropus eugenii*): blindness, treatment with atovaquone, and isolation of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 94(4), pp. 929–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18576797>
- Dubey, J. P., & Frenkel, J. K. (1972). Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *The Journal of Protozoology*, 19(1), pp. 155–77. Retrieved November 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5008846>
- Dubey, J. P., Graham, D. H., da Silva, D. S., Lehmann, T., & Bahia-Oliveira, L. M. G. (2003). *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. *The Journal of Parasitology*, 89, pp. 851–853.
- Dubey, J. P., Graham, D. H., De Young, R. W., Dahl, E., Eberhard, M. L., Nace, E. K., et al. (2004a). Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *The Journal of Parasitology*, 90(1), pp. 67–71. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040668>
- Dubey, J. P., & Jones, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38(11), pp. 1257–78. Retrieved December 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508057>
- Dubey, J. P., Morales, E. S., & Lehmann, T. (2004b). Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *The Journal of*

Parasitology, 90(2), pp. 411–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15165070>

Dubey, J. P., Navarro, I. T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R. L., Kawabata, H. H., et al. (2004c). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *The Journal of Parasitology*, 90, pp. 721–726.

Dubey, J. P., Parnell, P. G., Sreekumar, C., Vianna, M. C. B., De Young, R. W., Dahl, E., et al. (2004d). Biologic and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from striped skunk (*Mephitis mephitis*), Canada goose (*Branta canadensis*), black-winged lory (*Eos cyanogenia*), and cats (*Felis catus*). *The Journal of Parasitology*, 90, pp. 1171–1174.

Dubey, J. P., Pas, A., Rajendran, C., Kwok, O. C. H., Ferreira, L. R., Martins, J., et al. (2010). Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), pp. 195–203. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570441>

Dubey, J. P., Quirk, T., Pittt, J. a, Sundar, N., Velmurugan, G. V, Kwok, O. C. H., et al. (2008). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*), and cougar (*Puma concolor*) from Canada. *The Journal of Parasitology*, 94(1), pp. 42–5. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372620>

Dubey, J. P., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., et al. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 41(8), pp. 827–33. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515278>

Dubey, J. P., & Thomas, N. J. (2011). *Sarcocystis neurona* retinochoroiditis in a sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*). *Veterinary Parasitology*, 183(1-2), pp. 156–9. Retrieved November 20, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782345>

Dubey, J. P., Velmurugan, G. V, Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., et al. (2009). Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 95(2), pp. 319–22. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925790>

Dubey, J. P., Velmurugan, G. V, Rajendran, C., Yabsley, M. J., Thomas, N. J., Beckmen, K. B., et al. (2011). Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii*

in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *International Journal for Parasitology*, 41(11), pp. 1139–47. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802422>

Dubey, J., Quirk, T., & Pitt, J. (2008). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*). *Journal of Parasitology*, 94(1), pp. 42–45. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.journalofparasitology.org/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1645%2FGE-1349.1>

Dubey, J. R., Bhaiyat, M. I., de Allie, C., Macpherson, C. N. L., Sharma, R. N., Sreekumar, C., et al. (2005). Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. *The Journal of Parasitology*, 91, pp. 557–560.

Dubey, J. R., Rosypal, a C., Rosenthal, B. M., Thomas, N. J., Lindsay, D. S., Stanek, J. F., et al. (2001). *Sarcocystis neurona* infections in sea otter (*Enhydra lutris*): evidence for natural infections with *Sarcocysts* and transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*). *The Journal of Parasitology*, 87(6), pp. 1387–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780826>

Fernández-Aguilar, X., Ajzenberg, D., Cabezón, O., Martínez-López, a, Darwich, L., Dubey, J. P., et al. (2013). Fatal toxoplasmosis associated with an atypical *Toxoplasma gondii* strain in a Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, 196(3-4), pp. 523–7. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523164>

Figueroa-Castillo, J. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *Journal of Parasitology*, 92(2), pp. 394–395. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.journalofparasitology.org/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1645%2FGE-663R.1>

Fitzgerald, S. D., Janovitz, E. B., Kazacos, K. R., Dubey, J. P., & Murphy, D. a. (1993). Sarcocystosis with Involvement of the Central Nervous System in Lambs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(2), pp. 291–296. Retrieved November 20, 2013, from <http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879300500230>

Fowler M.E., Miller, R. E. (2003). *Zoo and Wild Animal Medicine*, 5e. Saunders. Retrieved November 19, 2013, from <http://www.amazon.com/Zoo-Wild-Animal-Medicine-5e/dp/0721694993>

- García-Márquez, L. J., Gutiérrez-Díaz, M. A., Correa, D., Luna-Pastén, H., & Palma, J. M. (2007). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 93(6), pp. 1527–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314706>
- García-Vázquez, Z. (1993). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. *Preventive Veterinary Medicine*, 17, pp. 127–132. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016758779390061W>
- García-Vázquez, Z., Rosario-Cruz, R., & Solorzano-Salgado, M. (1990). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in three states of Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 10(1-2), pp. 25–29. Retrieved November 19, 2013, from http://www.researchgate.net/publication/222045963_Prevalence_of_antibodies_against_Toxoplasma_gondii_in_sheep_and_goats_in_three_states_of_Mexico
- Gardiner, C. H., Fayer, R., Dubey, J.P. (1988). *An atlas of protozoan parasites in animal tissues*. United States Department of Agriculture. Retrieved November 19, 2013, from <http://www.amazon.com/Atlas-Protozoan-Parasites-Animal-Tissues/dp/B005NQBDOS>
- Gauss, C. B. L., Dubey, J. P., Vidal, D., Cabezón, O., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., et al. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. *Veterinary parasitology*, 136(3-4), pp. 193–200. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359801>
- Gilot-Fromont, E., Lélou, M., Dardé, M. L., Richomme, C., Aubert, D., Alfonso, E., et al. (2012). The Natural cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment, in: O. D. Djakovic´ (Ed.), *Toxoplasmosis - Recent Advances*, pp. 3–36.
- Greene, C. E. (2011). *Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th ed.* Saunders. Retrieved November 19, 2013, from <http://www.amazon.com/Infectious-Diseases-Dog-Cat-4e/dp/1416061304>
- Grigg, M., & Boothroyd, J. (2001). Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis at the B1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), pp. 398–400. Retrieved September 22, 2013, from <http://jcm.asm.org/content/39/1/398.short>
- Hejlícek, K., Literak, I., & Nezval, J. (1997). Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3). Retrieved November 19, 2013, from

<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Toxoplasmosis+in+wild+mammals+from+the+Czech+Republic#0>

- Hermosilla, C., Pantchev, N., Gies, N., & Taubert, A. (2010). Presumptive acute neural toxoplasmosis in a captive red-necked wallaby (*Macropus rufogriseus*). *Veterinary Medicine International*, 2010, p. 561212. Retrieved October 23, 2013, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2896840&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Herrmann, D. C., Götz, M., Schares, G., Conraths, F. J., & Wibbelt, G. (2012). Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from European beavers (*Castor fiber*) and European wildcats (*Felis silvestris silvestris*). *Veterinary Parasitology*.
- Hettiarachchi, D., & Rajapakse, R. (2009). Antigenic analysis of bovine *Sarcocystis* spp. in Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 36(3), pp. 239–244. Retrieved January 7, 2014, from <http://www.sljol.info/index.php/JNSFSL/article/viewArticle/161>
- Hill, D. E., Chirukandoth, S., & Dubey, J. P. (2007). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, 6(01), pp. 41–61. Retrieved November 18, 2013, from http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1466252305000034
- Homan, W., & Vercammen, M. (2000). 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*, 30, pp. 69–75. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751999001708>
- Howe, D. K., Honoré, S., Derouin, F., & Sibley, L. D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, pp. 1411–1414.
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 172, pp. 1561–1566.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., et al. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine—the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*, 2, p. e13.
- Jewell, M. L., Frenkel, J. K., Johnson, K. M., Reed, V., & Ruiz, A. (1972). Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21, pp. 512–517.

- Johnson, a M., Roberts, H., Statham, P., & Munday, B. L. (1989). Serodiagnosis of acute toxoplasmosis in macropods. *Veterinary Parasitology*, 34(1-2), pp. 25–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2588468>
- Juan-Sallés, C., Mainez, M., Marco, A., & Malabia Sanchís, A. M. (2011). Localized toxoplasmosis in a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) causing placentitis, stillbirths, and disseminated fetal infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 23, pp. 1041–1045.
- Juan-Sallés, C., Prats, N., López, S., Domingo, M., Marco, A. J., & Morán, J. F. (1997). Epizootic disseminated toxoplasmosis in captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*). *Veterinary Pathology*. 1997; 34(1): 1-7
- Khan, A., Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2011a). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology*, 41(6), pp. 645–55. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3081397&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Khan, A., Fux, B., & Su, C. (2007). Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), pp. 14872-14877 Retrieved October 23, 2013, from <http://www.pnas.org/content/104/37/14872.short>
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A. L., Rizzo, L. V., Belfort, R., et al. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12, pp. 942–949.
- Khan, A., Miller, N., Roos, D., & Dubey, J. (2011b). A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. *MBio*. Retrieved September 18, 2013, from <http://mbio.asm.org/content/2/6/e00228-11.short>
- Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A. J., Boyle, J., Cole, R., et al. (2005). Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*, 33, pp. 2980–2992.
- Kim, K., & Weiss, L. M. (2009). *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes and Infection*, 10, pp. 978–984.
- Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suárez-Mutis, M., Fernandes, O., & Britto, C. (2007). 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*, 101(3), pp. 619–25. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17385062>

Levine, N. D. (1988). *Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press. Retrieved November 19, 2013, from <http://www.amazon.com/Protozoan-Phylum-Apicomplexa-Norman-Levine/dp/0849346533>

Lilly, E. L., & Wortham, C. D. (2013). High prevalence of *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. *Parasites & Vectors*, 6(1), p. 266. Retrieved January 13, 2014, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3849917&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (1989). Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research*, 50, pp. 1981–1983.

Lukesová, D., & Literák, I. (1998). Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 74, pp. 1–7.

Marchiondo, A. A., Duszynski, D. W., & Maupin, G. O. (1976). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals of New Mexico, Arizona and Colorado. *Journal of Wildlife Diseases*, 12, pp. 226–232.

Martínez, M., & Avilés, D. (2007). Brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*). *Veterinaria México*, 38(3), pp. 365–369. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42338310>

Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonhabau, H., Bañuls, A.-L., Durand, P., et al. (2010). Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), p. e876. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2970538&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

Miller, D. S., Faulkner, C., & Patton, S. (2003). Detection of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in juvenile great grey kangaroos, *Macropus giganteus giganteus*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34(2), pp. 189-193

Miller, M. a, Conrad, P. a, Harris, M., Hatfield, B., Langlois, G., Jessup, D. a, et al. (2010). A protozoal-associated epizootic impacting marine wildlife: mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis*

- neurona* infection. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), pp. 183–94. Retrieved November 20, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615616>
- Miller, M. a, Miller, W. a, Conrad, P. a, James, E. R., Melli, a C., Leutenegger, C. M., et al. (2008). Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*, 38(11), pp. 1319–28. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452923>
- Miller, M. A., Grigg, M. E., Kreuder, C., James, E. R., Melli, A. C., Crosbie, P. R., et al. (2004). An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *International Journal for Parasitology*, 34(3), pp. 275–84. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003489>
- Miller, N. L., Frenkel, J. K., & Dubey, J. P. (1972). Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *The Journal of Parasitology*, 58, pp. 928–937.
- Minot, S., Melo, M. M. B., Li, F., Lu, D., Niedelman, W., Levine, S. S., et al. (2012). Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), pp. 13458–63. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.pnas.org/content/109/33/13458.short>
- Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The lancet*, 363, pp. 1965–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194258>
- Nicolle, C., & Manceaux, L. (1909). Sur une infection á corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, (148), pp. 369–372.
- Nishi, M., Hu, K., Murray, J. M., & Roos, D. S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, 121, pp. 1559–1568. Retrieved: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18411248
- O'Toole, D., Jeffrey, M., Challoner, D., Maybey, R., & Welch, V. (1993). Ovine myeloencephalitis-leukomyelomalacia associated with a *Sarcocystis*-like protozoan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(2), pp. 212–225. Retrieved November 20, 2013, from <http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879300500213>

- Olamendi-Portugal, M., Caballero-Ortega, H., Correa, D., Sánchez-Alemán, M. a, Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., et al. (2012). Serosurvey of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in white-tailed deer from Northern Mexico. *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), pp. 369–73. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22633992>
- Ortega-Pacheco, a. (2013). Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico. *BioMed Research International*, 2013, p. 231497. Retrieved October 16, 2013, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3690204&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Pacheco-Coronel, N. (2010). Estudio piloto de la frecuencia de parásitos en mamíferos ferales y silvestres en la reserva ecológica del pedregal de San Ángel de la UNAM (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. , p. 132.
- Patton, S., Rabinowitz, A., Randolph, S., & Johnson, S. S. (1986). A coprological survey of parasites of wild neotropical felidae. *The Journal of Parasitology*, 72, pp. 517–520.
- Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, 38, pp. 561–569.
- Pena, H. F. J., Marvulo, M. F. V, Horta, M. C., Silva, M. A., Silva, J. C. R., Siqueira, D. B., et al. (2011). Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 175(3-4), pp. 377–81. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21055880>
- Pena, H. F. J., Vitaliano, S. N., Beltrame, M. a V, Pereira, F. E. L., Gennari, S. M., & Soares, R. M. (2013). 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*, 192(1-3), pp. 111–7. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23116899>
- Pizzi, HL; Rico CM; Pessat, O. (1978). Hallazgo del ciclo ontogénico selvático del *Toxoplasma gondii* en félidos salvajes (*Oncifelis geoffroyi*, *Felis colocolo* y *Felis eirá*) de la Provincia de Córdoba. *Revista Militar de Veterinaria*, 25, pp. 293–300.
- Portas, T. J. (2010). Toxoplasmosis in Macropodids: A Review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(1), pp. 1–6. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1638/2009-0148.1>

- Prophet, E. B. (1995). *AFIP Métodos Histotecnológicos* (I. de P. de las F. A. de los E. U. de América., Ed.). Washington DC: Registro de Patología. Retrieved November 24, 2013, from <http://books.google.com/books?id=qF3eAAAACAAJ&pgis=1>
- Pujol-Riqué, M. (1999). Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. *Journal of Medical Microbiology*, 48(9), pp. 857–62. Retrieved September 26, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10482297>
- Rajendran, C., Su, C., & Dubey, J. P. (2012). Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(2), pp. 359–368. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226702>
- Ramírez, M. G. (1999). Presence of anti- *Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(5), pp. 483–488. Retrieved September 22, 2013, from http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86821999000500003&script=sci_arttext&tlng=es
- Ramos Silva, J. C., Marvulo, M. F. V., Dias, R. A., Ferreira, F., Amaku, M., Adania, C. H., et al. (2007). Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, pp. 286–295.
- Ramos-Vara, J. a. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), pp. 405–26. Retrieved October 31, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006601>
- Rendón-Franco, E., Caso-Aguilar, A., Jiménez-Sánchez, N. G., Hernandez-Jauregui, D. M. B., Sandoval-Sánchez, A. L., & Zepeda-López, H. M. (2012). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in free-ranging ocelots (*Leopardus pardalis*) from Tamaulipas, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3), pp. 829–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740559>
- Rico-Torres, C. P. (2005). Estandarizacion y validacion a nivel laboratorio de una prueba de PCR para la detección directa de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas (Tesis de Licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. , p. 92.
- Rico-Torres, C. P., Figueroa-Damián, R., López-Candiani, C., Macías-Avilés, H. A., Cedillo-Peláez, C., Cañedo-Solares, I., et al. (2012). Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *The Pediatric*

Infectious Disease Journal, 31(4), pp. 411–3. Retrieved January 13, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173138>

Rosa, C., Kasai, N., & Souza, S. (2001). Comparação das técnicas de imunohistoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. *Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo*, 68(1), pp. 13–17. Retrieved November 26, 2013, from http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V68_1/3.pdf

Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., & Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*, 21, pp. 476–481.

Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L. D., Brooke-Powell, E. T., et al. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science (New York, N.Y.)*, 314, pp. 1780–1783.

Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., Grigg, M. E., Arrizabalaga, G., & Boothroyd, J. C. (2005). Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infection and Immunity*, 73, pp. 695–702.

Schuneman, M. A. (2002). Técnicas de necropsia en animales domésticos - 2 ed. (Spanish Edition). Manual Moderno. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.amazon.com/Tecnicas-Necropsia-En-Animales-Domesticos/dp/9684269382>

Scott, P., & Watt, N. (1993). Protozoan encephalomyelitis causing pelvic limb paresis in a yearling sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 41(3), pp. 139–141. Retrieved November 20, 2013, from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.1993.35753>

Sedlák, K., & Bártová, E. (2006). Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4), pp. 223–31. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16387445>

Sibley, L. D. (2003). *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4, pp. 581–586.

Silva, a F., Oliveira, F. C. R., Leite, J. S., Mello, M. F. V, Brandão, F. Z., Leite, R. I. J. C. K., et al. (2013). Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), pp. 347–52. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23062690>

- Da Silva, a V, & Langoni, H. (2001). The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology*, 97(3), pp. 191–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390071>
- Smith, T. G., Walliker, D., & Ranford-Cartwright, L. C. (2002). Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa. *Trends in parasitology*, 18, pp. 315–323.
- Song, H., Zhang, D., & Liao, S. (2007). Amplification, cloning and sequence analysis of a repetitive 529bp DNA fragment from *Toxoplasma gondii* strains from China. *Scientia Agricultura Sinica*, 40(9), pp. 2114–2118. Retrieved January 12, 2014, from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZNYK200709039.htm
- Spencer, J. A., Joiner, K. S., Hilton, C. D., Dubey, J. P., Toivio-Kinnucan, M., Minc, J. K., et al. (2004). Disseminated toxoplasmosis in a captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *The Journal of Parasitology*, 90, pp. 904-906
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., et al. (2012). 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 of the United States of America*, 109(15), pp. 5844–9. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3326454&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q., & Dubey, J. P. (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 137(1), pp. 1–11. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19765337>
- Su, C., Zhang, X., & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, 36(7), pp. 841–8. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16643922>
- Sukthana, Y. (2006). Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in parasitology*, 22, pp. 137–142.
- Suzán, G., & Ceballos, G. (2005). The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two nature reserves within Mexico city limits. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(3), pp. 479–484. Retrieved September 22, 2013, from <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1638/04-078.1>

- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, pp. 1217–1258.
- Uzêda, R. S., Schares, G., Ortega-Mora, L. M., Madruga, C. R., Aguado-Martinez, a, Corbellini, L. G., et al. (2013). Combination of monoclonal antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23927916>
- Velasco-Castrejón, O., Salvatierra-Izaba, B., Valdespino, J. L., Sedano-Lara, A. M., Galindo-Virgen, S., Magos, C., et al. (1991). Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. *Salud Pública de México*, 34, pp. 222–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1631735>
- Vitaliano, S. N. (2012). Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-04102012-182312/pt-br.php>
- Walton, B. C., & Walls, K. W. (1964). Prevalence of toxoplasmosis in wild animals from fort Stewart, Georgia, as indicated by serological tests and mouse inoculation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 13, pp. 530–3. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14196048>
- Weiss, L. M., & Kim, K. (2013). *Toxoplasma gondii*, Second Edition: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods. Academic Press. Retrieved January 13, 2014, from <http://www.amazon.com/Toxoplasma-Gondii-Second-Edition-Apicomplexan/dp/0123964814>
- Wendte, J. M., Gibson, A. K., & Grigg, M. E. (2011). Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Veterinary Parasitology*, 182(1), pp. 96–111. Retrieved September 17, 2013, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3430134&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, a M., van Maanen, C., & Brinkhof, J. M. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 29(10), pp. 1677–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608454>
- Xicoténcatl-García, L. (2010). Estandarización y evaluación de un ELISA indirecto para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii* en mamíferos domésticos y su uso posterior en animales silvestres en cautiverio (Tesis de Licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Au. , p. 92.

Zenner, L., Foulet, a, Caudrelier, Y., Darcy, F., Gosselin, B., Capron, a, et al. (1999). Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Pathology, Research and Practice*, 195, pp. 475–485. Retrieved November 18, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448664>

Anexo 1: ELISA Indirecto

- 1.- Sensibilizar las placas de poliestireno (Maxisorp Nunc) con 100 μ L de extracto crudo (2 μ g/mL) elaborado con taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH.
- 2.- Incubar a 4° C durante toda la noche.
- 3.- Lavar 5 veces con PBS-T20.
- 4.- Bloquear con 200 μ L de albúmina sérica bovina (Euro-Clone, Italy) al 1%, 30 minutos a 37° C.
- 5.- Repetir los lavados con PBS-T20.
- 6.- Adicionar 100 μ L del suero (muflón 1:400; felino 1:200) diluido en PBS-T20.
- 7.- Incubar durante 2 horas a 37° C.
- 8.- Repetir los lavados con PBS-T20.
- 9.- Adicionar 100 μ L de conjugado específico (anti-IgG de cabra o anti IgG de gato, 1:10,000 y 1:15,000 respectivamente) diluidos en PBS-T20.
- 10.- Incubar durante 2 horas a 37° C.
- 11.- Repetir los lavados con PBS-T20.
- 12.- Preparar la solución cromógeno-sustrato (10 mL de amortiguador de citratos más 5 mg de ortofenilendiamina y 4 μ L de H₂O₂).
- 13.- Detener la reacción con 50 μ L de ácido sulfúrico 0.1 N.
- 14.- Obtener la absorbancia a 490 nm de longitud de onda con un lector de ELISA (Turner Biosystems, Sunnyvale, California).

Anexo 2: Técnica de estandarización de Western Blot para anticuerpos clase IgG de muflón europeo

- 1.- Se cortan tiras de la membrana de nitrocelulosa de 3 mm de ancho, manipulándolas con unas pinzas.
- 2.- Se depositan las tiras dentro de los carriles de las cajas para Western Blot con el anverso hacia arriba.
- 3.- En cada ensayo se deben incluir un suero positivo y uno negativo como testigos del ensayo.
- 4.- Se hace una dilución 1:200 de cada suero y se agregan 600 μ L a su carril respectivo.
- 5.- Se incuba durante 1 hora a 37^o C con agitador.
- 6.- Transcurrido el tiempo se almacena en refrigeración durante toda la noche.
- 7.- Se retira el contenido de los carriles con la pipeta multicanal para evitar contaminación y se realizan 5 lavados de 5 minutos cada uno (3 con 1 mL de PBS-T20 y 2 PBS).
- 8.- Se prepara anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa a dilución 1:2000 con PBS-T20 (6 mL de PBS-T20 + 3 μ L de conjugado). Se agregan 600 μ L a cada carril y se incuba durante 2 horas a 37^o C (en agitación).
- 9.- Se decanta el contenido de los carriles. Se realizan 5 lavados de 5 minutos (3 con PBS-T20 y 2 PBS).
- 10.- Se alinean las tiras hasta debajo de la placa.
- 11.- Se prepara la solución de revelado con 30 mg de 4-cloro-1-naphthol (sacar del congelador y esperar que se atempere antes de abrirlo para evitar que se hidrate), 5 mL de metanol absoluto (se homogenizan primero estos 2 reactivos), 5 ml de PBS y 50 μ L de peróxido de hidrógeno este último se agrega hasta el final y se homogeniza con vortex (conservarlo en la oscuridad).
- 12.- Se inclina la placa con las tiras hacia arriba y se agregan 600 μ l en la parte inferior de la placa para que todas entren en contacto al mismo tiempo con el reactivo y se mantiene en agitación.
- 13.- Una vez que aparezcan las primeras bandas en el testigo positivo se detiene la reacción decantando la solución reveladora y agregando agua corriente (2 lavados).
- 14.- Se decanta el agua y se dejan secar al aire.

Anexo 3: Histopatología

Una vez fijados los tejidos, se cortaron secciones de 0.3 a 0.5 cm de grosor y se incluyeron en casetes de plástico, depositándose para su procesamiento automatizado en un histoquinete convencional Leica®. Los tejidos incluidos se deshidrataron con serie ascendente de etanoles (80%, 95% y 100%), alcohol absoluto-Xilol (relación 1:1) y posteriormente se depositaron en dos cambios de Xilol y uno final en parafina líquida, dejando solidificar a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C, por 15 a 40 minutos. Una vez solidificada la parafina, del tejido embebido se cortaron secciones de 5 a 7 µm de grosor con un micrótomo estándar Leica®. Los cortes se extendieron en baño de flotación, se recuperaron montándose en portaobjetos convencionales y se colocaron en platina caliente (37° – 40°C) para su desparafinación. Finalmente los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE), para su posterior revisión microscópica óptica convencional.

Anexo 4: Protocolo de inmunohistoquímica para detección de *Toxoplasma gondii*

- 1.- Desparafinar los tejidos en la termoplatina hasta que se formen gotas de parafina y retirar.
- 2.- Dos lavados con Xilol de 10 minutos cada uno. Sumergir las laminillas en vasos de precipitados de 50 mL con Xilol asegurándose de que cubra por completo el tejido.
- 3.- Lavar las laminillas sumergiéndolas en alcohol absoluto, tres cambios de 3 minutos cada uno.
- 4.- Tratar con solución de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (JT Baker, Cat.: 218601) al 30% con metanol absoluto (relación 1:8 10 mL peróxido:80 mL metanol) por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Rehidratar con serie descendente de etanoles. Primero 96% por 3 minutos.
- 6.- Alcohol al 80% por 3 minutos.
- 7.- Alcohol al 70% por 3 minutos.
- 8.- Agua destilada por 3 minutos.
- 9.- Recuperación antigénica. Tratar los tejidos con proteinasa K a 20 mg/mL 5 minutos a temperatura ambiente (cuanto baste para cubrir el tejido).
- 10.- Lavar con agua destilada por 5 minutos (terminado este paso poner el límite del tejido con el plumón especial) (desechar esta agua destilada).
- 11.- Lavar con PBS-T20 por 5 minutos (desechar al terminar).
- 12.- Aplicar solución bloqueadora de avidina y biotina endógenas (Invitrogen) 50 μ L de cada una sobre los tejidos y homogenizar circularmente sobre la laminilla e incubar en cámara húmeda a 37° C durante 15 minutos.
- 13.- Lavar las laminillas con PBS-T20 por 5 minutos.
- 14.- Bloqueo de sitios de adherencia inespecífica de los anticuerpos primario y secundario (Invitrogen) 2 gotas hasta que cubra todo el tejido. Incubar en cámara húmeda por 20 minutos.
- 15.- Decantar la solución bloqueadora sin hacer lavado.
- 16.- Agregar 100 μ L del anticuerpo primario (suero de cabra positiva) dilución 1:150 incubando en cámara húmeda a 37° C por 30 minutos.

- 17.- Lavado con PBS-T20 por 5 minutos.
- 18.- Agregar 100 μ L del anticuerpo secundario (conjugado anticabra) dilución 1:150 incubando en cámara húmeda a 37° C por 30 minutos.
- 19.- Lavar con PBS-T20 por 5 minutos.
- 20.- Agregar solución reveladora con pipeta goteando la cantidad suficiente para cubrir el tejido, laminilla por laminilla sobre una hoja blanca y observando al microscopio.
- 21.- Detener la reacción sumergiendo la laminilla en agua destilada por 5 minutos.
- 22.- Contrastar con hematoxilina de Meyer durante 1 minuto.
- 23.- Lavar con agua destilada durante 1 minuto.
- 24.- Sumergir en carbonato de litio e hidróxido de amonio durante 1 minuto.
- 25.- Lavar en agua destilada.
- 26.- Secar por completo la laminilla y cada corte se agrega resina comercial y cubreobjetos convencional.

Anexo 5: Extracción de DNA

- 1.- Cortar 200 mg de tejido.
- 2.- Macerar en mortero con 1.3 mL de solución comercial de lisis celular (Puregen Cell Lysis Solution, GENTRA, Cat. D-50K2).
- 3.- Transferir el contenido a un microtubo de 1.5 mL y aforar el contenido con solución comercial de lisis celular hasta llegar a los 1.5 mL.
- 4.- Calentar el tejido a 65° C en termoblock (Boekel Scientific) por una hora.
- 5.- Agregar 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL; Sigma, Cat. 39450-01-6) incubando a 55° C durante toda la noche.
- 6.- Transferir el contenido a un tubo tipo Corning de 15 mL, agregando 2 mL de solución comercial de precipitación de proteínas (Gentra, Cat. 158912).
- 7.- Agitar en vortex y centrifugar a 4000 rpm por 10 min.
- 8.- Recuperar el sobrenadante y se transferir a un tubo nuevo, agregando 2 mL de isopropanol (Sigma, Cat. L9516-500ML) para la precipitación del DNA, mezclando generosamente por inversión 20 veces y se mantienen a -20° C por 1 hora.
- 9.- Centrifugar a 4000 rpm por 10 min.
- 10.- Eliminar la solución por decantación y agregar 2 mL de etanol frío al 70%.
- 11.- Agitar en vortex centrifugar a 4000 rpm por 10 min.
- 12.- Decantar el etanol, invertir el tubo y dejar secar sobre papel absorbente durante toda la noche.
- 13.- El botón del material formado en el fondo del tubo se hidrató con 100-200 µL de solución de hidratación comercial (Puregene DNA Hydration Solution, GENTRA, Cat. D-50K4).
- 14.- La concentración y pureza del DNA se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) a 260 y 280 nm, depositando 1 µL de cada muestra sobre el pedestal del equipo.
- 15.- El DNA se almacena a -20° C hasta su uso.

Anexo 6: Biología molecular

PCR en tiempo real

Las reacciones se llevaron a cabo con 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), mezclados con 0.5 µL de iniciadores sentido, antisentido y sonda marcada con fluoresceína y 2.5 µL (50 ng/µL) de DNA de los tejidos seleccionados de herbívoros y carnívoros; cada reacción fue aforada a 10 µL de volumen final con agua inyectable. La amplificación se realizó durante 40 ciclos con una temperatura de alineamiento de 60° C. La fluorescencia fue registrada y analizada usando el software Step One 2.0.

PCR punto final

Las condiciones de la mezcla maestra para la PCR se ajustaron a un volumen final de 50 µL, empleando 5.0 µL de amortiguador de PCR (10x PCR Gold Buffer, Roche), 5.0 µL de cloruro de magnesio (MgCl₂ 25 mM, Roche), 1.0 µL de PCR Nucleotide Mix (10 mM, Roche), 3.0 µL de cada oligonucleótido (400 pmol), 1.5 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido, 5%, SIGMA) y 0.5 µL de Taq polimerasa (5 u/µL Ampli Taq Gold, Roche); para el marcador Tox4-Tox5 se usó 1.0 µg de DNA y para el resto de los marcadores se agregaron 2.0 µg. El resto del volumen se aforó con agua inyectable. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Veriti, Applied Biosystems) con un paso inicial de desnaturalización de 95° C por 3 minutos y 38 ciclos con desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 55°-65° C por 60 segundos, dependiendo de los iniciadores usados (**Cuadro 11**) y extensión a 72° C por 60 segundos, concluyendo con una extensión final a 72° C por 10 minutos. Una vez terminados los ciclos, las muestras se mantuvieron a 4° C -20° C hasta su empleo.

PCR-RFLP

GRA6: la reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 45 µL: 30 µL de DNA amplificado por PCR, 5.0 µL de solución amortiguadora de digestión

(NEB2 10x, New England), 0.5 μ L de BSA (10 mg/mL, New England), 1.0 μ L de la enzima *MseI* (10U/ μ L, New England) y el volumen restante de agua inyectable; la reacción de digestión se incubó a 37° C durante toda la noche.

SAG3: la reacción incluyó 30 μ L de DNA amplificado por PCR, 5.0 μ L de solución amortiguadora de digestión (NEB4 10x, New England), 0.5 μ L de BSA (10 mg/mL, New England), 0.5 μ L de la enzima *NciI* (20U/ μ L) y el volumen restante de agua inyectable; la reacción de digestión se incubó a 37° C durante toda la noche.

SAG2: se hizo doble digestión con las enzimas *Hinfi* y *TaqI* usando 30 μ L de DNA amplificado por PCR, 5.0 μ L de solución amortiguadora de digestión "B" (Roche), 1.0 μ L de la enzima *Hinfi* (10U/ μ L, Roche) y el volumen restante de agua inyectable. La reacción se incubó durante 7 horas a 37° C y finalmente se agregó 1 μ L de la enzima *TaqI* (10U/ μ L, Roche) y se dejó 7 horas más a 65° C.

GRA7: la reacción incluyó 30 μ L de DNA amplificado por PCR, 5.0 μ L de solución amortiguadora de digestión (NEB4 10x, New England), 0.5 μ L de BSA (10 mg/mL, New England), 3.0 μ L de la enzima *Hpy99I* (2U/ μ L) y el volumen restante de agua inyectable; la reacción de digestión se incubó a 37° C durante toda la noche.

β -TUB: se hizo doble digestión con las enzimas *BsiEI* y *TaqI* usando 30 μ L de DNA amplificado por PCR, 5.0 μ L de solución amortiguadora de digestión (NEB4 10x, New England), 0.5 μ L de BSA (10 mg/mL, New England), 1.0 μ L de la enzima *BsiEI* (10U/ μ L, New England), 1.0 μ L de la enzima *TaqI* (10U/ μ L, Roche) y el volumen restante de agua inyectable. La reacción de digestión se incubó a 60° C durante toda la noche.

B1: la reacción incluyó 30 μ L de DNA amplificado por PCR, 5.0 μ L de solución amortiguadora de digestión (CutSmart Buffer 10x, New England), 1.0 μ L de la enzima *PmlI* (10U/ μ L) y el volumen restante de agua inyectable; la reacción de digestión se incubó a 37° C durante toda la noche.

Anexo 7: Soluciones

1. Solución amortiguadora de carbonatos, 15 mM, pH 9.6
 - 1.59 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 1.26 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
 - disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada
 - ajustar el pH a 9.6
 - aforar a 1000 mL
 - mantener a 4°C
2. Solución salina de fosfatos 10 mM, NaCl 0.15M pH 7.2 (PBS)
 - Medir 800 mL de agua bidestilada
 - Agregar 100 mL de PB 10x y 8.75 g de NaCl
 - Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2
 - Aforar a 1000 mL con agua bidestilada
 - Guardar a 4°C
3. PB10x
 - 2.62 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$) + 11.5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4)
 - disolver en 200 mL de agua bidestilada
 - Guardar a 4°C
4. Amortiguador de lavado (PBS-Tween 20®, 0.05%)
 - En 1000 mL de PBS pH 7.2 (solución 2)
 - Añadir 500 µL de Tween 20®
 - Guardar a 4°C
5. Solución de bloqueo albúmina sérica bovina al 1%
 - Pesar 0.2 g de albúmina sérica bovina
 - Disolver en 20 mL de PBS-Tween 20®, 0.05% (solución 4)
 - Usar en el momento
6. Solución de cromógeno sustrato (ELISA) para peroxidasa
 - Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina
 - Añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1M
 - Adicionar 4 µL de H_2O_2 al 30%
 - Nota: la solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso (máximo 30 minutos)
7. Solución de ácido sulfúrico 1N
 - Tomar 98.08 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4)

- Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL
8. Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%
 - Pesar 29.2 g de acrilamida* (99.9%) más 0.8 g de N'N-bis-metilen-acrilamida.
 - Disolver en agua bidestilada y aforar a 100 mL
 - Guardar en frasco color ámbar a 4°C

*Nota: Manejar con cuidado este reactivo por que es neurotóxico.
 9. Amortiguador del gel separador: Tris-Base 2M, pH 8.8
 - Disolver 18.15 g de Tris-base (Hidroximetil aminometano o Trizma-base) 50 mL de agua bidestilada
 - Ajustar el pH con HCl 6N hasta un pH de 8.8
 - Aforar a 100 mL con agua bidestilada
 - Guardar a 4°C
 10. Lauril sulfato de sodio (duodecil sulfato de sodio) SDS 10%
 - Pesar 10 g de SDS
 - Aforar a 100 mL con agua bidestilada
 11. Persulfato de amonio al 10%
 - Pesar 1 g de persulfato de amonio
 - Disolver en 10 mL de agua bidestilada

Nota: se prepara al momento de usarse
 12. Amortiguador concentrador: Tris-HCl 2M pH 6.8
 - Pesar 30 g de Tris-base en 30 mL de agua bidestilada
 - Ajustar el pH con HCl 5-10N gota a gota hasta un pH de 6.8
 - Aforar a 100 mL con agua bidestilada
 - Guardar a 4°C
 13. Amortiguador tris-glicina (para electroforesis)*
 - Medir 200 mL de Tris-glicina 5X*
 - Aforar a 1000 mL con agua destilada
 - Guardar a 4°C

Tris-glicina 5x: 15.0 g de Tris-base + 72.0 g de glicina + 5.0 g de SDS en 1000 mL de agua bidestilada.

Nota: este amortiguador se puede usar 2 ó 3 veces en la cámara inferior. Después de cada uso se filtra con papel Whatman No.1
 14. Amortiguador de muestra
 - Medir 5 mL de SDS 10%
 - Añadir 37 mg de EDTA, 5 mL de glicerol, 1.25 mL de Tris-HCl 2M pH 6.8 y unos granitos de azul de bromofenol o tironina

- Aforar a 50 mL con agua bidestilada
- Dividir en fracciones de 1mL y congelar

15. Amortiguador de transferencia

- (Tris 0.025M, glicina 0.192M, pH 8.3 metanol 20% v/v)
- Medir 12.5 mL de Trizma-base 2M y agregar 14.49 g de glicina
- Añadir 200 mL de metanol
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

Nota: ajustar el pH, el amortiguador oscila entre pH 8.1 y 8.4 dependiendo de la calidad del Tris, la glicina y el metanol. El metanol debe ser de grado analítico, de lo contrario contiene contaminantes metálicos que interfieren con las láminas de los electrodos. Este amortiguador se puede usar 3 veces, después de cada uso se filtra con papel Whatman No.1

16. Amortiguador de corrida TBE 10x

- 55 g de ácido bórico
- Tris-base 108g
- EDTA 7.44g
- Disolver en 1000 mL de agua bidestilada

17. Amortiguador de corrida TBE 1x

- Agregar 100 mL de TBE 10x
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada

18. Bromuro de etidio al 5%

- 50 µL de bromuro de etidio
- Aforar a 1000 µL con agua inyectable
- Conservar a -20°C cubierto de la exposición de la luz

19. Gel de agarosa al 1.5%

- Pesar 2.25 g de agarosa ultrapura
- 150 mL de TBE 1x
- Calentar en microondas hasta que este completamente transparente y sin burbujas
- Agregar 70 µL de bromuro de etidio (BrEt)

20. Gel de agarosa al 3.5%

- Pesar 5.25 g de agarosa ultrapura
- 150 mL de TBE 1x
- Calentar en microondas hasta que esté completamente transparente y sin burbujas
- Agregar 70 µL de bromuro de etidio (BrEt)

21. Amortiguador de carga (5 mL)

- 1.5 mL de glicerol
- 12.5 mg de azul de bromofenol
- 3.5 mL de agua bidestilada

22. Formalina amortiguada al 10%

- 100 mL de formaldehído 37-40%
- 4 g de fosfato de potasio monobásico anhidro
- 6.5 g de fosfato de potasio dibásico anhidro
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada