



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**DIVERSIDAD GENETICA DE *Toxoplasma gondii* EN
ANIMALES DOMESTICOS Y FAUNA SILVESTRE EN MEXICO Y
CORRELACION DE SU PATOGENICIDAD EN CASOS CLINICOS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
CARLOS CEDILLO PELAEZ

TUTORA PRINCIPAL:
DRA MARIA DOLORES CORREA BELTRAN
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTORAL:
DRA IRENE CRUZ MENDOZA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DR JULIO VICENTE FIGUEROA MILLAN
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MEXICO, D.F.

AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología de Experimental, de la Subdirección de Medicina Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud; bajo la dirección de la Dra. María Dolores Correa Beltrán.

El trabajo de investigación fue financiado parcialmente por el proyecto “Toxoplasmosis congénita: Relación de los polimorfismos de genes del parásito y de la respuesta inmune de la madre y del hijo con la expresión, la actividad biológica, la transmisión vertical y la patogenia fetal”, registro CONACYT 139721 y registros INP 060/2010 y 060/2011; así como por el proyecto “Polimorfismo genético y filogeografía de *Toxoplasma gondii* en diferentes regiones climáticas de México”, registro INP 013/2012.

El alumno fue becario del CONACYT de agosto del 2009 a julio de 2010 con número de apoyo 34514.

DEDICATORIA

A mi familia... Elvira, Jesús, Gustavo, Edith, Natalia y Emilio, porque siempre han estado junto a mí en las diferentes veredas que se ha tornado mi vida...

A mis amigos... porque es lo único que tengo después de la familia, por aceptarme como soy y por seguir creyendo en mí sobre todas las cosas...

A Erika, Selene y Noemí... por haber sido parte de esta historia, por lo que me brindaron y por el tiempo que compartimos juntos...

Al Jack... que ya se encuentra en “mejor vida” y con quien también me hubiera gustado compartir esta etapa de mi vida...

A los 43 y a todos los demás que faltan... porque la verdad saldrá a luz un día y con ella, este país tendrá que cambiar...

A Dios y a la Virgen de Guadalupe... en quien deposito mi fe y me encomiendo todos los días...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a quien siempre me deberé por darme todo lo necesario para alcanzar lo que soy ahora.

A mi tutora, la Dra. María Dolores Correa Beltrán, y mi comité tutorial, integrado por la Dra. Irene Cruz Mendoza y el Dr. Julio Vicente Figueroa Millán, por la confianza, el apoyo y la paciencia que tuvieron durante todo este tiempo, gracias.

Al jurado de mi examen de candidatura y de mi examen de grado, por sus comentarios y recomendaciones, por el tiempo proporcionado en la revisión del trabajo de investigación, así como para mejorar el documento final: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dr. Fernando Alba Hurtado, Dra. Yazmin Alcalá Canto, Dr. Sergio Rodríguez Camarillo, Dr. Juan José Martínez Maya, Dra. Guillermina Ávila, Dra. Lucía García Camacho y Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.

A mis profesores del posgrado, por ser parte de mi formación académica y compartir sus conocimientos: Dr. Gerardo Suzán Azpiri, Ing. José Luis Pablos Hach, Dr. Rene Anzaldúa Arce, Dr. José Gutiérrez Pabello, Dra. Laura Cobos Marín y Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.

La presente tesis se realizó gracias al apoyo del MSc. David Espinosa Avilés, del Zoológico de Guadalajara; del Dr. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez, del Laboratorio de Patología de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre del Gobierno del Distrito Federal; de la MVZ María Isabel Jiménez Seres y del MVZ Ishbak Dirceu Díaz Figueroa, de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca; del Dr. Abner Josué Gutiérrez Chávez, de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato; y del Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México; quienes participaron y dieron las facilidades para la obtención de las muestras evaluadas durante el presente estudio.

El procesamiento de muestras de histopatología y la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo con el apoyo y colaboración del M. en C. Francisco Javier García Vázquez y el Tec. Eduardo Farfán Morales, del Departamento de Anatomopatología del Instituto Nacional de Pediatría; así como del M. en C. Carlos Gerardo Salas Garrido del Departamento de Patología de la FMVZ, UNAM. La secuenciación de las muestras se realizó con el apoyo de la Dra. María Fabiola León Galván, de la División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato. La determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* se llevó a cabo gracias a la donación de un kit comercial, proporcionado por el M. en C. Mario Espinosa González.

Un agradecimiento especial a mi amigo Alejandro Besne Merida, de quien tuve su apoyo constante e incondicional, durante el desarrollo de este trabajo de investigación, gracias Alex. Así mismo, también agradezco de forma particular a mis amigos y compañeros de generación Gerardo Salas Garrido y Mario Espinosa González, quienes desde un principio, me ayudaron a resolver muchas de las dudas técnicas del trabajo de investigación, a ustedes también muchas gracias.

A mi hermano, el Arq. Gustavo Cedillo Peláez, por su constante apoyo para que concluyera esta tesis, por los momentos buenos y los no tantos, gracias por ser siempre estar a mi lado y apoyarme en esta etapa de mi vida.

Al personal de los laboratorios de Toxicología Experimental y Oncología Experimental del INP, por las facilidades prestadas para la cuantificación de DNA y visualización de geles de agarosa.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología Experimental del INP.

A todos aquellos, amigas y amigos, compañeros del posgrado y personas, que “generaron” que este propósito llamado “Doctorado”, se pudiera concluir, de una u otra manera...

Gracias...

RESUMEN

Actualmente la diversidad genética de *Toxoplasma gondii* se considera $\geq 1\%$, describiéndose más de 250 genotipos, de tipo clonal y no clonal, causando diversas presentaciones clínico-patológicas. Los estudios de genotipificación de *T. gondii* son escasos en México, identificándose en Durango, Colima y el centro del país, genotipos clonales I y III, recombinantes y atípicos. El objetivo de esta tesis fue el de caracterizar genéticamente *T. gondii* en animales domésticos y fauna silvestre, correlacionando el grado de su patogenicidad en casos clínicos y asintomáticos. Se obtuvieron muestras de sangre y tejidos de diferentes animales domésticos y silvestres, a partir de estudios retro y prospectivos, así como de aislamientos previos de *T. gondii*, procesándose por diferentes técnicas de laboratorio (de serología, anatomopatología y de biología molecular) y por bioinformática. Por serología se evaluaron 531 muestras, siendo la frecuencia de *T. gondii* en gatos del 73.3% (11 de 15), en perros del 41.8 % (215 de 514) y dos muestras de felinos silvestres resultaron positivas. Las frecuencias de infección de *T. gondii* en perros de los Estado de Oaxaca y de Guanajuato fueron del 61.7% (96 de 154) y 29.4% (74 de 252), respectivamente; en este último Estado, la frecuencia de *Neospora caninum* y de co-infección en la misma población de animales fue del 29.0% y 20.6%, respectivamente. Por anatomopatología, se estudiaron un total de 73 casos; de estos, con base en su curso, 17 casos correspondieron a toxoplasmosis aguda y de acuerdo a su presentación, 8 casos fueron diseminados, cinco con reinfección, tres con co-infección viral (3) y uno con presentación intestinal; nueve casos fueron de toxoplasmosis crónica, ocho de tipo neurológica y uno congénito; 47 casos no tuvieron lesiones asociadas a infección por *T. gondii*, considerándose asintomáticos. Por PCR, muestras de sangre de 5 de 11 felinos (domésticos y silvestres) resultaron positivas al gen B1, pero negativas para otros marcadores. En 32 de 73 casos donde se evaluaron tejidos, por lo menos una muestra resultó positiva. Muestras de diez casos fueron positivas para el gen B1, 18 para GRA6, 28 para SAG3, tres para SAG2 y uno para BTUB. En 13 de los casos se obtuvieron bandas claras y definidas, por lo que se genotipificaron por PCR-RFLP, resultando siete casos con un genotipo I, mientras que en los seis casos restantes, el genotipo fue I con banda extra (I/u-1). Las muestras de aislamientos previos, por PCR-RFLP fueron genotipo I, lo que se corroboró por secuenciación del gen GRA6. Solo dos de los tres aislamientos se pudieron comparar bioinformáticamente, resultando el aislamiento de un gato de Colima, con 99.0% de similitud para la cepa de referencia RH, genotipo I, mientras que el aislamiento de un perro del D.F. tuvo 100.0% de similitud con el aislamiento OkiTp-123, haplogrupo 1. No se observó asociación aparente entre los genotipos de *T. gondii* y los tipos de presentación, los dos genotipos se observaron tanto en casos agudos como crónicos, en diversas presentaciones e incluso en casos asintomáticos, indicando, que la diversidad genética de *T. gondii* es más amplia y con repercusión clínico-patológica diversa en comparación con lo documentado a la fecha en nuestro país e incluso con la literatura científica mundial. La información generada, proporciona una nueva visión sobre los genotipos de este parásito que circula en distintos hospedadores de México y con efecto biológico variable, lo cual aporta nueva información sobre el papel de los animales domésticos y fauna silvestre, en el mantenimiento y extensión de la diversidad genética de *T. gondii* en nuestro país.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, diversidad genética, clínico-patológico, toxoplasmosis.

ABSTRACT

Currently, the genetic diversity of *Toxoplasma gondii* is considered $\geq 1\%$, since more than 250 genotypes, both clonal and non-clonal type, causing various clinico-pathological presentations. In Mexico, studies of *T. gondii* genotyping are scarce, and only in Durango, Colima and the center of country, clonal I and III genotypes, recombinant and atypical variants have been reported. The objective of this research was to genetically characterize *T. gondii* in domestic animals and wildlife, and to look for association pathogenicity in clinical and asymptomatic cases. Isolates, blood and tissue samples of different domestic and wild animals were obtained from retro and prospective studies, and processed by different laboratory techniques (serology, pathology and molecular biology) and bioinformatics. For serology, 531 samples were evaluated, being 73.3% (11 of 15) the frequency of *T. gondii* infections in cats, 41.8% in dogs (215 from 514); also, two samples of wild cats were positive. The overall frequency of *T. gondii* in dogs of the state of Oaxaca and Guanajuato were 61.7% (96 of 154) and 29.4% (74 of 252), respectively; in the later, the frequency of *Neospora caninum* and *T. gondii* / *N. caninum* co-infection were 29.0% and 20.6%, respectively. Seventy three cases were studied by pathology; of these, 17 were diagnosed as acute toxoplasmosis, with disseminated presentation in eight cases, reinfection in five, viral co-infection in three and one with intestinal presentation; nine cases were chronic toxoplasmosis, eight neurological and one congenital; 47 cases not presented injuries associated to infection by *T. gondii*, and were considered asymptomatic. Blood samples from five of eleven cats (domestic and wild), were positive from B1 gene, but negative for other markers. In 32 of 73 cases, where tissues were evaluated, at least one sample was positive for PCR. Ten cases for B1 gene, 18 for GRA6, 28 for SAG3, three for SAG2 and one for BTUB. In 13 cases, from which clear and sharp bands were obtained, PCR-RFLP genotyping was performed, resulting seven cases with genotype I, while in the remaining six cases gave genotype was I with extra alleles (I/u-1). DNA samples from isolation were genotype I by PCR-RFLP, which was confirmed by sequencing of GRA6 gene. Only two of the three isolates could be compared, resulting the cat isolation of Colima with 99.0% of similarity, compared with the reference strain for RH, genotype I, while the dog isolation of D.F. was 100.0% similarity to the isolation OkITp-123, haplogroup 1. No apparent association was observed between genotypes of *T. gondii* and toxoplasmosis presentations, presenting the two genotypes determined in both acute and chronic cases, in various presentations and even in asymptomatic cases, indicating that the genetic diversity of *T. gondii* it is broader and with different clinico-pathological impact, compared to what has been documented in Mexico and even in the world. The information generated provides a new insights of the genotypes circulating in different hosts of Mexico and the varying biological effect, which sheds new light on the role of domestic animals and wildlife in the maintenance and extension of the genetic diversity of *T. gondii* in our country.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, genetic diversity, clinico-pathological. toxoplasmosis.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Biología de <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.2.1 Taxonomía	2
1.2.2 Aislamientos de <i>T. gondii</i>	2
1.2.3 Estadios y ciclo de vida	4
1.3 Genoma y genotipificación	7
1.3.1 Genoma	7
1.3.2 Métodos de genotipificación de <i>T. gondii</i>	7
1.3.3 Genotipos	9
1.4 Diversidad genética de <i>T. gondii</i>	11
1.5 Patogenia	17
1.5.1 Virulencia de aislamientos y cepas de <i>T. gondii</i>	17
1.5.2 Susceptibilidad del hospedador	18
1.5.3 Relación parásito-hospedador	19
1.5.4 Respuesta inmune innata y adquirida	20
1.6 Presentaciones clínico-patológicas de la infección por <i>T. gondii</i> en animales domésticos y silvestres	23
1.6.1 Toxoplasmosis aguda diseminada	24
1.6.2 Toxoplasmosis crónica neurológica	25
1.6.3 Toxoplasmosis crónica congénita	28
1.7 Toxoplasmosis en México	31
1.8 Genotipos de <i>T. gondii</i> en México	38
2. JUSTIFICACION	41
3. HIPOTESIS	42
4. OBJETIVO	42
5. MATERIAL Y METODOS	43
5.1 Tipo de estudio	43
5.2 Estrategia general	43
5.3 Entidades de donde se obtuvo el material de	44
5.4 Análisis del material de estudio	45
5.4.1 Serología	45
5.4.2 Anatomopatología	47
5.4.3 Aislamiento <i>in vivo</i>	52
5.4.4 Biología molecular	53

5.5 Bioinformática	59
5.5.1 Banco de información de genotipos de <i>T. gondii</i>	59
5.5.2 Banco de información de secuencias de <i>T. gondii</i>	60
5.5.3 Comparación de secuencias	60
6. RESULTADOS	62
6.1 Serología (estudio prospectivo)	62
6.1.1 Serología en felinos domésticos y silvestres	62
6.1.2 Serología en caninos domésticos	62
6.2 Anatomopatología (estudio prospectivo y retrospectivo)	66
6.2.1 Estudios postmortem de gatos y perros (estudio prospectivo)	66
6.2.2 Estudios postmortem de fauna silvestre (estudio retrospectivo)	66
6.2.3 Evaluación microscópica y tipos de presentación de toxoplasmosis en animales domésticos y silvestres (estudios prospectivo y retrospectivo)	67
6.3 Aislamiento <i>in vivo</i> del estudio prospectivo	79
6.4 Biología molecular	79
6.4.1 PCR de muestras de sangre (estudio prospectivo)	79
6.4.2 PCR de muestras de tejido (estudio prospectivo y retrospectivo)	81
6.4.3 PCR-RFLP de muestras de tejido (estudio prospectivo y retrospectivo)	84
6.4.4 PCR y PCR-RFLP de aislamientos previos	87
6.5 Secuenciación y análisis bioinformático	88
6.6 Correlación de las presentaciones de toxoplasmosis y genotipo de <i>T. gondii</i> determinado	92
6.6.1 Casos con lesiones agudas y crónicas	92
6.6.2 Casos sin lesiones o asintomáticos	92
7. DISCUSION	94
7.1 Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> en animales domésticos y fauna silvestre (estudio prospectivo)	94
7.1.1 Frecuencia de <i>T. gondii</i> en gatos	94
7.1.2 Frecuencia de <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> en perros	95
7.1.3 Serología en felinos silvestres	96
7.2 Presentaciones anatomopatológicas de toxoplasmosis	97
7.2.1 Casos asintomáticos de toxoplasmosis	97

7.2.2 Toxoplasmosis aguda diseminada	98
7.2.3 Co-infección (subtipo de toxoplasmosis aguda diseminada)	99
7.2.4 Re-infección (subtipo de toxoplasmosis aguda diseminada)	101
7.2.5 Toxoplasmosis aguda intestinal	102
7.2.6 Toxoplasmosis crónica neurológica	105
7.2.7 Toxoplasmosis crónica congénita	106
7.3 Genotipos de <i>T. gondii</i> determinados a partir de casos de animales domésticos y fauna silvestre	108
7.4 Genotipos de <i>T. gondii</i> determinados a partir de aislamientos previos	109
7.5 Correlación anatomopatológica y molecular de casos de toxoplasmosis y aislamientos previos	111
7.5.1 Casos en marsupiales australianos	111
7.5.2 Casos en primates del Nuevo Mundo	113
7.5.3 Casos en carnívoros silvestres	115
8. CONCLUSIONES	118
9. LITERATURA CONSULTADA	119
ANEXO. Artículos publicados	149

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Comparación de dos sistemas de clasificación de genotipos de <i>T. gondii</i> .	15
Cuadro 2. Casos de toxoplasmosis aguda en fauna silvestre con la identificación del genotipo de <i>T. gondii</i> involucrado.	25
Cuadro 3. Casos de toxoplasmosis crónica neurológica animales domésticos y fauna silvestre con la identificación del genotipo de <i>T. gondii</i> involucrado.	27
Cuadro 4. Casos de toxoplasmosis crónica congénita en animales domésticos y fauna silvestre con la identificación del genotipo de <i>T. gondii</i> involucrado.	30
Cuadro 5. Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> en humanos (2005-2013).	33
Cuadro 6. Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> en animales domésticos (1980-2013).	35
Cuadro 7. Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> en fauna silvestre (1991-2012).	37
Cuadro 8. Resumen de aislamientos y genotipos de <i>T. gondii</i> descritos en México.	39
Cuadro 9. Relación de muestras para estudios de serología.	47
Cuadro 10. Relación de casos clínicos de archivo del estudio retrospectivo.	51
Cuadro 11. Relación de muestras para estudios de anatomopatología y biología molecular.	52
Cuadro 12. Iniciadores empleados para amplificación del gen B1 mediante PCR semianidada.	57
Cuadro 13. Iniciadores empleados para PCR punto final y genotipificación por PCR-RFLP.	58
Cuadro 14. Detección de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> en muestras de suero de caninos de tres estados de la República Mexicana.	62
Cuadro 15. Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> en perros del Estado de Oaxaca, por género y estrato de edad.	63

Cuadro 16. Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> en perros del Estado de Guanajuato Oaxaca, por género y estrato de edad.	64
Cuadro 17. Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> en perros del Estado de Guanajuato, con relación al ambiente, raza, hábitat y convivencia con otros animales.	65
Cuadro 18. Frecuencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> en perros del Estado de Guanajuato, con relación al municipio.	65
Cuadro 19. Relación de casos de toxoplasmosis clasificados de acuerdo a su presentación y distribución de lesiones, incluyendo los casos asintomáticos.	78
Cuadro 20. Relación de genotipos de <i>T. gondii</i> determinados.	84
Cuadro 21. Relación del tipo de presentación de toxoplasmosis y el genotipo de <i>T. gondii</i> identificados en el presente trabajo de investigación	93

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .	6
Figura 2. Árbol filogenético de 106 cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> .	12
Figura 3. Árbol filogenético de 138 aislamientos de <i>Toxoplasma gondii</i> representativos de haplotipos únicos.	14
Figura 4. Respuesta inmune innata contra <i>T. gondii</i> durante la infección aguda.	21
Figura 5. Distribución de aislamientos y genotipos de <i>T. gondii</i> descritos en México.	40
Figura 6. Presentaciones de toxoplasmosis y variantes determinadas en el presente trabajo de investigación.	67
Figura 7. Toxoplasmosis aguda diseminada, lesiones microscópicas en diferentes especies de fauna silvestre.	69
Figura 8. Co-infección de <i>T. gondii</i> con un agente etiológico viral en casos de canguros rojos.	70
Figura 9. Re-infección de <i>T. gondii</i> con toxoplasmosis crónica miocárdica en canguro rojo y mono ardilla.	72
Figura 10. Toxoplasmosis aguda intestinal en delfín del Atlántico, detalle de los estadios parasitarios.	73
Figura 11. Toxoplasmosis crónica neurológica en marsupiales australianos.	75
Figura 12. Toxoplasmosis crónica congénita, lesiones en encéfalo de ovino (neonato).	76
Figura 13. Toxoplasmosis crónica congénita neurológica, distribución de quistes tisulares en encéfalo de ovino (neonato).	77
Figura 14. PCR para los genes B1 y GRA6, de muestras de sangre de felinos domésticos y silvestres.	80

Figura 15. PCR del gen B1 y reamplificación de PCR para los genes GRA6, SAG2, SAG3 y BTUB de muestras de tejidos de fauna silvestre, obteniéndose bandas tenues en el peso esperado.	82
Figura 16. PCR del gen B1 y reamplificación de PCR para los genes GRA6 y SAG3 de muestras de tejidos de fauna silvestre.	83
Figura 17. PCR-RFLP de amplicones del gen SAG3, a partir de muestras de marsupiales australianos.	85
Figura 18. PCR-RFLP de amplicones del gen SAG3, a partir de muestras de monos ardilla, marsupiales australianos y carnívoros.	86
Figura 19. PCR y PCR-RFLP de amplicones del gen GRA6, a partir de aislamientos obtenidos previamente.	87
Figura 20. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de la región final del gen GRA6 (región codificante) de <i>T. gondii</i> de los aislamientos G32 y P REP, así como de cepas de referencias del LIE, comparados con las secuencias de genotipos clónales descritas en la literatura.	89
Figura 21. Resumen de secuencias de nucleótidos del gen GRA6 (región codificante) de <i>T. gondii</i> de los aislamientos G32 y P REP comparados con aislamientos representativos de 12 haplogrupos.	90
Figura 22. Cladograma basado en la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen GRA6 de <i>T. gondii</i> de 50 aislamientos y cepas de referencia, incluyendo las secuencias determinadas en el presente estudio.	91

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Toxoplasma gondii es un protozooario intracelular obligado con capacidad de infectar una amplia variedad de vertebrados homeotermos, incluyendo a los humanos, animales domésticos y silvestres, tanto terrestres como acuáticos. En la actualidad, su presentación está documentada en más de 30 especies de aves y 300 especies de mamíferos. La seroprevalencia de *T. gondii* en la población humana se determina por la detección de anticuerpos específicos, oscilando del uno hasta el 100%, dependiendo del ambiente y condiciones socioeconómicas, entre las cuales se incluyen los hábitos alimentarios y sanitarios, los niveles generales de higiene, la susceptibilidad del hospedador, la localización geográfica (geolatitud) y la humedad ambiental. La incidencia de la infección es alta en climas cálido-húmedos, se incrementa con la edad y puede variar por género. Se estima que a nivel mundial se encuentra infectada crónicamente alrededor del 30 al 50% de la población humana; y aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas, se considera una parasitosis de importancia médica relevante, al poder generar diferentes cuadros clínicos, incluyendo enfermedad sistémica, linfadenopatía, neumonía, encefalitis, retinocoroiditis, abortos y enfermedad congénita. Estos cuadros se presentan tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. En medicina veterinaria, el mayor impacto es la generación de abortos en varias especies de producción como los ovinos y caprinos, con las consecuentes pérdidas económicas. Así mismo, en el caso de la fauna silvestre, la infección por *T. gondii* puede llegar a generar cuadros agudos diseminados, culminando con mortalidad en la mayoría de especies susceptibles (Tenter et al., 2000; Hill et al., 2005; Gilbert et al., 2008; Dubey, 2010; Shwab et al., 2014; Flegr et al., 2014).

Durante las últimas cuatro décadas, se sigue considerando una sola especie para el género *Toxoplasma*, y gracias a recientes estudios epidemiológicos moleculares, se conocen diferentes linajes clonales y no clonales,

con variedad genética estrecha y distintas características biológicas, siendo un tema de estudio particular, el grado de virulencia de los aislamientos en los diferentes hospedadores afectados (Tenter et al., 2000; Dubey, 2010, 2014; Shwab et al., 2014).

1.2 Biología de *Toxoplasma gondii*

1.2.1 Taxonomía

T. gondii es un parásito coccidia tisular, con un ciclo biológico indirecto, siendo los felinos domésticos y silvestres, los hospedadores definitivos, y los animales homeotermos, los hospedadores intermediarios. Su clasificación taxonómica es la siguiente (Dubey, 2010):

Phylum: Apicomplexa; Levine, 1970.

Clase: Sporozoasida; Leukart, 1879.

Subclase: Coccidiasina; Leukart, 1879.

Orden: Eimeriorina; Leger, 1911.

Familia: Toxoplasmatidae; Biocca, 1956.

Genero: *Toxoplasma*; Nicolle y Manceaux, 1909.

El Phylum Apicomplexa (protozoarios cuyo estadio móvil presenta complejo apical) abarca más de 5000 especies de parásitos intracelulares obligados, en el que se encuentran otros protozoarios responsables de desarrollar enfermedad en animales y humanos, como son *Plasmodium*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Besnoitia*, *Hammondia*, *Theileria* y *Eimeria*, entre otros (Gardiner et al., 1988; Sibley, 2003; Khan et al., 2005; Nishi et al., 2008; Dubey, 2010).

1.2.2 Aislamientos de *T. gondii*

A partir de los primeros aislamientos de *T. gondii*, provenientes de muestras de casos clínicos en humanos y animales, se han caracterizado muchos de ellos, tanto biológica como genéticamente, en prácticamente todas las regiones del

mundo. En un principio, la mayoría de los aislamientos estudiados eran originarios de Estados Unidos y Europa, los cuales se clasificaron con base en sus características biológicas, tomando en consideración su replicación y propagación, tanto en ratones como en cultivo celular, entre otras características. Estos criterios están vigentes y se pueden emplear para determinar las cualidades de nuevos aislamientos. Inicialmente los aislamientos fueron denominados como tipos I, II y III, reconocidos actualmente también como “linajes o tipos clásicos” (Tinti et al., 2003; Darde, 2004; Saeij et al., 2005; Fazaeli, 2007; Su et al., 2002, 2006, 2012).

Los aislamientos tipo I se comportaban con más virulencia en ratones y se consideraba que generaban casos clínicos de toxoplasmosis en seres humanos inmunocompetentes. Los aislamientos tipo II y III eran menos virulentos para ratones y fueron aislados de humanos inmunocomprometidos y de animales domésticos y silvestres. Diversos experimentos *in vitro* y *ex vivo* demostraron que las cepas virulentas exhibían una alta tasa de crecimiento y una capacidad superior de migración a través de las barreras epiteliales en comparación con las cepas avirulentas. Otras características fenotípicas que diferenciaron los aislamientos tipos clásicos consistieron en la alteración y disrupción de la señalización celular, la inducción de patología intestinal durante la etapa de infección aguda y el desarrollo de patología en sistema nervioso central durante infección crónica en modelo murino (Tinti et al., 2003; Darde, 2004; Saeij et al., 2005; Su et al., 2006; Fazaeli y Ebrahimzadeh, 2007; Dubey, 2010; Su et al., 2012).

Sin embargo, los aislamientos obtenidos en las últimas dos décadas a partir de un amplio rango de hospedadores y de diversas regiones climáticas, han presentado características diferentes a los tipos clásicos, designándose en muchos de los casos como “atípicos” o “exóticos”, ya que la virulencia en ratones no necesariamente correlaciona con la virulencia en humanos y otros animales (p.ej.: aislamientos virulentos para ratones, pero no para gallinas o gatos) (Tinti et al., 2003; Darde, 2004; Saeij et al., 2005; Su et al., 2006; Fazaeli y Ebrahimzadeh, 2007; Pena et al., 2008; Su et al., 2012; Shwab et al., 2014).

1.2.3 Estadios y ciclo de vida

El ciclo de vida comprende cuatro estadios infecciosos con aspectos particulares en su biología y estructura:

- Taquizoíto, etapa de multiplicación rápida.
- Bradizoíto, en quiste tisular, etapa de multiplicación lenta.
- Merozoíto, estadio sexual intestinal.
- Esporozoíto, en ooquistes.

Los estadios de taquizoíto y bradizoíto se encuentran generalmente dentro de tejidos de los hospedadores afectados, los merozoítos exclusivamente se desarrollan durante la fase sexual en el epitelio intestinal de felinos, mientras que los esporozoítos están confinados dentro de los ooquistes, fuera del hospedador (eliminados en las heces). Los taquizoítos y merozoítos son responsables de la expansión de la población de protozoarios dentro del hospedador, mientras que los bradizoítos y los esporozoítos se relacionan directamente con la transmisión a nuevos hospedadores (Tenter et al., 2000; Ferguson, 2004; Hill et al., 2005; Ajzenberg et al., 2005; Dubey, 2010; Ferguson y Dubremetz, 2014).

El ciclo de vida (Figura 1) puede iniciar cuando un hospedador definitivo (gatos o felinos silvestres) ingiere tejidos con quistes tisulares, o bien otros alimentos contaminados con ooquistes esporulados; éstos llegan al tracto digestivo, liberándose a la luz los bradizoítos u esporozoítos (respectivamente), invadiendo activamente el epitelio del intestino delgado, formando y delimitándose en vacuolas parasitóforas. Conforme transcurre el tiempo, los parásitos se multiplican por endodiogenia, generando merozoítos. Los estadios de merozoíto se continúan dividiendo en el epitelio intestinal, generando diferentes estadios (denominados como A, B, C, D y E). Los tipos C, D y E se pueden dividir también por endopoliogenia, generando varias progenies a partir de un solo antecesor. El conjunto de merozoítos se denomina esquizonte, pudiendo estar presentes desde el tipo B hasta el E. Al final de estas divisiones asexuales, la última multiplicación de parásitos da inicio a la fase de división sexual, generando macro y microgametos (gametos femenino y masculino). Posteriormente, estos se

fecundan entre sí, generando el cigoto, que al madurar forma el ooquiste sin esporular, siendo eliminado al ambiente a través de las heces. Las divisiones asexuales y sexuales en los enterocitos, hasta la eliminación de ooquistes sin esporular, representan el ciclo enteroepitelial dentro del ciclo de vida. La esporulación del ooquiste se ve favorecida por condiciones ambientales (aire y humedad) y se lleva a cabo en un periodo de uno a cinco días. El ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales, cada uno con cuatro esporozoítos (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Hill et al., 2005; Speer y Dubey, 2005; Ferguson y Dubremetz, 2014).

Simultáneamente con el progreso del ciclo enteroepitelial, los bradizoítos o esporozoítos también penetran la pared intestinal, multiplicándose como taquizoítos. En el lapso de unas cuantas horas postinfección, *T. gondii* puede diseminarse a tejidos extraintestinales, tanto por vía linfática como sanguínea. En los hospedadores intermediarios, tras la ingestión de cualquiera de los estadios infecciosos, éstos se diferencian a taquizoítos a nivel intestinal y posteriormente se diseminan extraintestinalmente de forma similar como sucede en los hospedadores definitivos. Los taquizoítos se multiplican rápidamente en células de múltiples tejidos del hospedador (endotelios vasculares, fibroblastos, células mono y polimorfonucleares, pero no en eritrocitos) hasta alcanzar varias generaciones y formar pseudoquistes. Por la acción del sistema inmune, los taquizoítos de última generación se transforman en bradizoítos, cambiando su metabolismo y multiplicándose lentamente, delimitándose en quistes tisulares. Los quistes tisulares predominan en el sistema nervioso central, ojo, músculo cardíaco y esquelético; sin embargo, también es posible encontrarlos, en menor cantidad, en órganos viscerales como hígado, pulmón y riñón. Los quistes tisulares se consideran el estadio final del ciclo de vida en los hospedadores intermediarios, con capacidad infecciosa inmediata, pudiendo persistir de por vida en varios organismos (Dubey y Beattie, 1988; Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Tenter et al., 2000; Hill et al., 2005; Dubey, 2010; Ferguson y Dubremetz, 2014; Maenz et al., 2014).

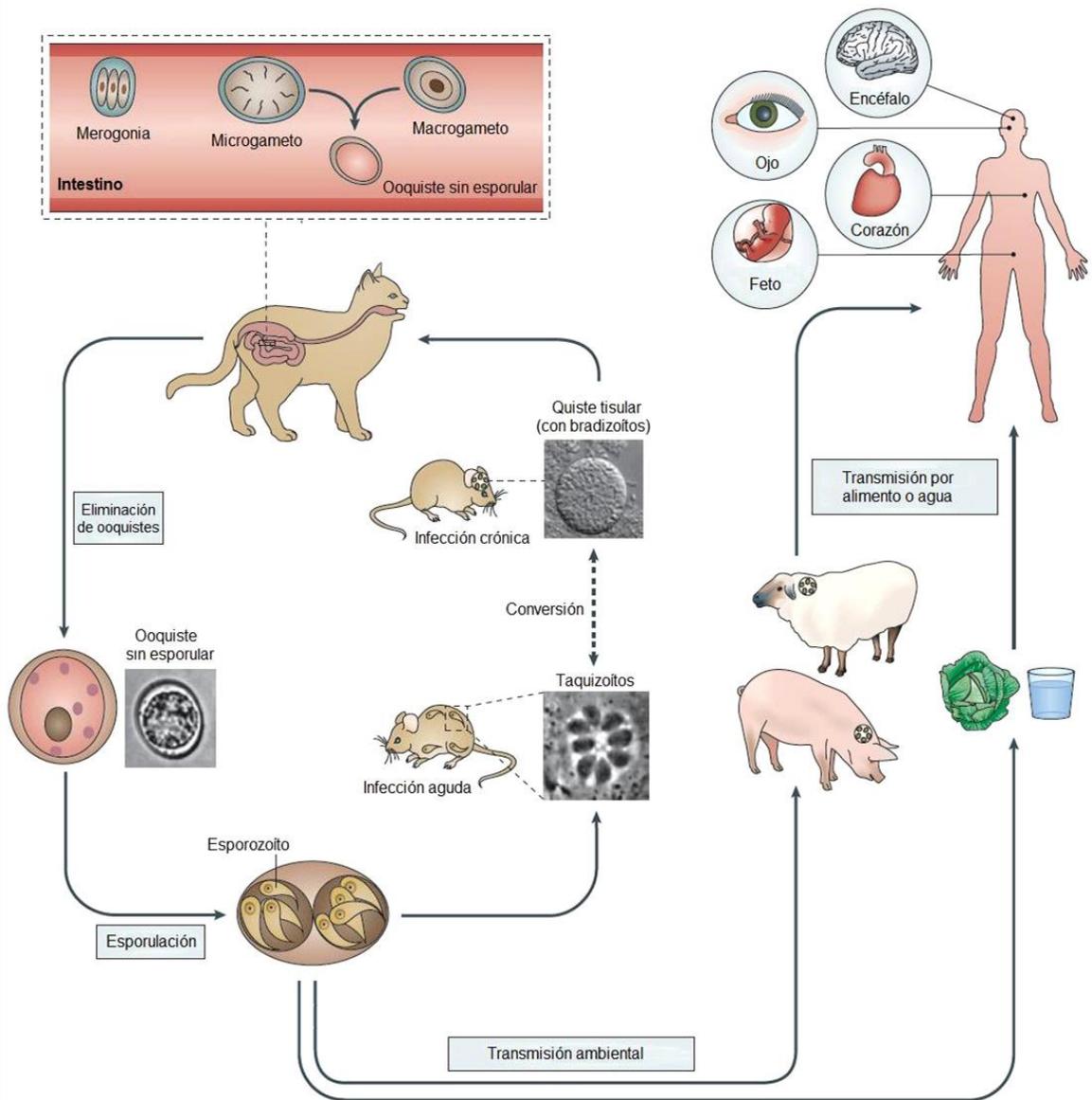


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Tomado y modificado de: Hunter CA, Sibley D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nature Reviews Microbiology. 2012; 10: 766-778.

1.3 Genoma y genotipificación de *T. gondii*

1.3.1 Genoma

El genoma nuclear de *T. gondii* es el que se ha estudiado mas ampliamente. Es haploide (con excepción de la etapa de división sexual en el intestino de los felinos, donde es diploide) y está compuesto por 14 cromosomas lineales (denominados Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI y XII) y 7793 genes. Tiene un tamaño físico de 61 645 498 pb, un tamaño genético de 592 cM y un contenido de G+C del 52.3%. El porcentaje del genoma que codifica para proteínas es del 28.3% (Khan et al., 2005; Dubey, 2010; Reid et al. 2012; Ajioka y Sibley, 2014).

El genoma mitocondrial es similar al descrito en otros apicomplexas: es lineal, de 6 kb con secuencias repetitivas de genes que codifican para subunidades de la citocromo-c-oxidasa 1 y 3, citocromo b y fragmentos de los RNAs ribosomales. El genoma del apicoplasto es altamente conservado, circular y de 35 kb; contiene genes que codifican para algunas proteínas y la síntesis repetida de rRNA y tRNA (Sibley y Ajioka, 2008; Seeber et al., 2014).

1.3.2 Métodos de genotipificación de *T. gondii*

Durante las décadas de los 80's y 90's, fueron desarrollados diferentes métodos y marcadores genéticos para diferenciar y clasificar los aislamientos de *T. gondii*, así como para el análisis de su estructura poblacional (Ajzenberg et al., 2002a, 2002b; Dubey, 2010; Darde, Ajzenberg y Su, 2014).

De los métodos descritos en la literatura, tres de ellos son los que se han empleado con mayor frecuencia (microsatélites, PCR-RFLP y la secuenciación de DNA), generado la mayor cantidad de información relacionada con la diversidad genética y estudios de genética poblacional de *T. gondii*. La ventaja de los marcadores multilocus, implica el estudio de una mayor región para su análisis, con una buena resolución (Ajzenberg et al., 2002a, 2002b; Darde, Ajzenberg y Su, 2014).

Los microsatélites son secuencias cortas de nucleótidos repetidas en tándem, que van de 2 a 6 nucleótidos y se presentan de 2 a 20 veces. Son regiones hipervariables debido a la acumulación rápida de polimorfismos de larga longitud (por el deslizamiento de la polimerasa intra-alelicamente) dentro de la secuencia del microsatélite durante la replicación. En general, el rango de mutación de los microsatélites es de 10^{-2} a 10^{-5} por locus por replicación, lo cual es varias veces más rápida que la de los polimorfismos de nucleótido único (SNP's). La tasa de mutación rápida hace que los microsatélites sean marcadores adecuados para la identificación individual de aislamientos de *T. gondii*, especialmente al proporcionar información para estudios de epidemiología molecular. Varios grupos de marcadores microsatélites se han descrito en la literatura, oscilando entre 5 a 15, sin existir un consenso o un grupo uniforme para estudios de genética de poblaciones (Darde et al., 1992; Blackston et al., 2001; Ajzenberg et al., 2002, 2004, 2010; Lehmann et al., 2004; Darde, Ajzenberg y Su, 2014).

La PCR-RFLP multilocus fue desarrollada para la detección de sitios de restricción polimórficos para endonucleasas. Es una técnica utilizada ampliamente en las últimas décadas, ya que metodología rápida y sencilla proporciona un considerable y favorable costo-beneficio. Se basa en que a partir de productos de PCR amplificados, estos sean digeridos con enzimas de restricción, visualizándose posteriormente por electroforesis en geles de agarosa. Finalmente se analizan y comparan los patrones de bandas obtenidos, con los de cepas de referencia. El desarrollo de esta técnica se basó en un principio en los patrones obtenidos a partir de genotipos clásicos (I, II y III), empleando uno o dos marcadores; posteriormente se expandió a multilocus, utilizando de 4 a 5 marcadores genéticos y en la actualidad se llegan a usar hasta 10 u 11. Los rangos de mutación de los SNP en el caso de *T. gondii* son desconocidos, pero se estima que deben estar cercanos a 10^{-9} a 10^{-10} por posición de nucleótido por replicación para eucariontes en general, por lo que se considera una herramienta excelente para el estudio de interrelación o filogenia de cepas de *T. gondii* (Grigg y

Boothroyd, 2001; Khan et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006, 2010, 2012; Pena et al., 2008; Darde, Ajzenberg y Su, 2014).

El último de los métodos para el estudio de SNP's es la secuenciación de DNA. Esta técnica puede ser empleada directamente como método de tipificación, al contemplar un número abundante de loci (secuenciación multilocus), considerándose uno de los mejores métodos para la detección de polimorfismos y análisis de diversidad genética con una alta resolución y disminuyendo su costo conforme se presenta una nueva generación de sistemas de secuenciación. Esta técnica tiene su mayor aplicación cuando se utiliza para el análisis de una gran cantidad de aislamientos, enfocados el estudio de diversidad genética y evolución del genoma. Sin embargo, la secuenciación es una técnica con limitantes: requiere una demanda considerable de tiempo para la preparación de muestras y la necesidad de repetir varias secuencias (4 a 6) para confirmar los cambios o SNP's encontrados (Grigg y Boothroyd, 2001; Khan et al., 2007, 2011; Frazão-Teixeira et al., 2011; Pan et al., 2012; Su et al., 2012; Darde, Ajzenberg y Su, 2014).

1.3.3 Genotipos

Los primeros estudios con diversas técnicas de genotipificación, previo a la secuenciación del genoma de *T. gondii*, agrupó a los aislamientos en uno de tres genotipos denominados "I, II y III", de forma similar a lo referido a su clasificación biológica. A estos genotipos también se les ha definido como "linajes clásicos o predominantes". La variabilidad genética entre los aislamientos estudiados fue menor o igual al 1%, considerándose relativamente baja, por lo que fueron denominados como linajes clonales (Darde, 2004; Switaj, 2005; Su et al., 2006, 2010, 2012; Pena et al., 2008).

La mayor parte de la información generada desde los años noventa, fue a partir de aislamientos originarios de Europa y Norteamérica. Sin embargo, los estudios más recientes, empleando una mayor cantidad de marcadores y combinación de técnicas (PCR-RFLP, microsatélites y secuenciación), han demostrado la presencia de nuevos genotipos con características particulares en

diversas partes del mundo, revelando una mayor variabilidad genética. Estos aislamientos recientes se han referido como recombinantes (al presentar combinación de alelos I y III o I, II y III, etc) y atípicos (combinación de alelos I, II o III con polimorfismos únicos y nuevos, identificándose los alelos como u-1, u-2, u-3, etc), siendo por lo general más virulentos en ratón que los linajes clásicos II y III. Sin embargo, debido a su diversidad genética, no pueden compararse directamente entre sí. Así mismo, llegan a presentar otras propiedades biológicas, lo cual puede ser el reflejo de las diferentes combinaciones genéticas en cada uno de los casos (Sibley et al, 1992b, Darde, 2004; Switaj, 2005; Su et al., 2006, 2010, 2012; Pena et al., 2008, 2011; Dubey, 2010; Darde, Ajzenberg y Su, 2014).

A la fecha, no existe una designación estándar para clasificar los genotipos de *T. gondii*, debido a los diversos métodos empleados, los cuales proveen un esquema diferente de clasificación en cada caso, lo que genera confusión para la designación del genotipo (Darde, Ajzenberg y Su, 2014; Shwab et al. 2014).

En la página ToxoDb (v. 11.0, actualizada el 12 de mayo de 2014), se cuenta con información sobre diferentes marcadores genéticos para el estudio del genoma de *T. gondii* e información de más de 300 aislamientos, incluyendo la descripción detallada de su estudio por PCR-RFLP para 10 a 11 marcadores genéticos. Actualmente, se han identificado más de 230 genotipos diferentes por esta técnica, designándose como “genotipo #1”, “genotipo #2”, consecutivamente conforme se describen en la literatura y con base en la combinación de resultados de su análisis por PCR-RFLP (Gajria et al., 2007; Shawb et al., 2014).

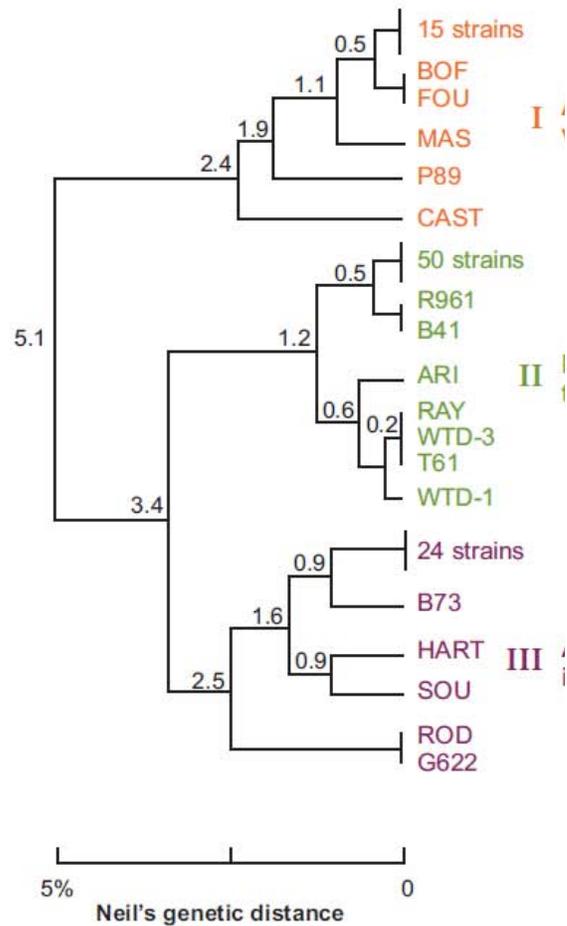
1.4 Diversidad genética de *T. gondii*

Al tener *T. gondii* una amplia gama de hospedadores, se genera un complejo ciclo de vida que facilita su transmisión, ya que se pueden infectar al ingerir carne con quistes tisulares (propagación clonal), o bien, alimentos y agua contaminados por ooquistes esporulados, producidos y eliminados por felinos durante la fase enteroepitelial (propagación sexual). Además, las características ambientales, la susceptibilidad de los hospedadores, la prevalencia de genotipos regionales, entre otros aspectos, han favorecido que la estructura poblacional de *T. gondii* presente una diversidad genética mucho más amplia, compleja y extensa, que lo estimado hasta hace unas décadas, sin contar con suficiente información de muchas regiones u hospedadores, en diferentes partes del mundo (Lehmann et al., 2006; Su et al., 2010, 2012; Darde, Ajzenberg y Su, 2014; Shwab et al., 2014).

Los primeros estudios que permitieron postular la estructura poblacional de *T. gondii*, se basaron en el estudio de isoenzimas y el análisis de PCR-RFLP. Darde et al. (1992) usaron el enfoque isoeléctrico de 6 enzimas para el análisis de 35 aislamientos de *T. gondii*, logrando agruparlos en 5 diferentes zimodemos (Z1, Z2, Z3, Z4 y Z5), perteneciendo la mayoría (56 %) a un solo zimodemo. En ese mismo año, Sibley y Boothroyd (1992a) analizaron 28 aislamientos procedentes de diferentes hospedadores y cinco continentes, usando PCR-RFLP, resultando 10 cepas virulentas con genotipo idéntico, mientras que cepas no virulentas fueron moderadamente polimórficas. Los resultados obtenidos sugirieron que las cepas virulentas provenían de un linaje único, genéticamente homogéneo a pesar de la distribución mundial de los aislamientos. En 1995, Howe y Sibley estudiaron 106 aislamientos de diferentes hospedadores, mediante PCR-RFLP usando 6 marcadores genéticos. El 84% fueron clasificados dentro de algunos de los linajes predominantes I, II y III, el restante se consideraron como aislamientos no típicos (Figura 2).

Figura 2. Árbol filogenético de 106 cepas de *Toxoplasma gondii*. Las cepas se estudiaron mediante PCR-RFLP, utilizando seis marcadores, agrupándose en tres linajes mayores denominados I, II y III.

Tomado y modificado de: Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995; 172 (6): 1561-1566.



En los últimos años, dos estudios con cobertura a nivel mundial, proveen un nuevo escenario sobre la diversidad genética de *T. gondii*.

Su et al. (2012) propusieron un sistema robusto de tipificación y análisis genómico comparativo, basado en tres sistemas que permiten comparar una gran cantidad de aislamientos, agrupar los genotipos relacionados en grupos principales o clados, e identificar cepas prototipo de cada grupo mayor. Inicialmente, se analizaron 956 aislamientos de *T. gondii* provenientes de humanos y animales de diferentes regiones del mundo: 361 de Norteamérica, 101 de Centroamérica, 346 de Suramérica, 60 de Europa y 56 de Asia y Australia; previamente descritos en la literatura.

Los aislamientos se genotificaron por PCR-RFLP multilocus con 11 marcadores, identificándose 138 genotipos diferentes. De estos genotipos, se analizaron aislamientos representativos con 15 marcadores de microsatelites y 4 de intrones. Los productos de amplificación de los tres sistemas fueron secuenciados y analizados bioinformaticamente para realizar el alineamiento de secuencias e identificar los SNP's. Tras analizar los aislamientos por PCR-RFLP, se apreció un patrón con grupos principales de abundante representación (genotipos clonales), y un segundo patrón, con representaciones únicas dispersas o grupos discretos con poca representación. La estructura poblacional clonal de Norteamérica y Europa contrastó marcadamente con muchos de los grupos o aislamientos divergentes de Suramérica. Se construyó un árbol filogenético y los haplogrupos identificados fueron similares a aquellos descritos anteriormente, sin embargo, éstos se dispusieron de forma particular en el árbol filogenético, permitiendo definir 6 grupos mayores o clados (Figura 3):

- Clado A: haplogrupos 1 (clonal, tipo I), 6 y 14 (aislamientos de Suramérica y África principalmente).
- Clado B: haplogrupos 4 y 8 (aislamientos de Suramérica con alta diversidad genética).
- Clado C: haplogrupo 3 (clonal, tipo III y aislamientos cercanos).
- Clado D: haplogrupos 2 (clona, tipo II) y 12 (clonal, genotipos X y A).
- Clado E: haplogrupo 9 (aislamientos de Suramérica, divergentes a los anteriores).
- Clado F: haplogrupos 5, 10 (aislamientos de la Guyana Francesa) y 15 (aislamientos de Brasil).

El haplogrupo 7 con aislamientos de diferentes partes del mundo, el 11 con la cepa atípica clásica (COUGAR) de Canadá y el 13 con genotipos de China, se dispusieron de forma aislada, sin agruparse en algún clado como tal. El análisis del flujo de genes sugirió que un número discreto de linajes ancestrales dieron origen a la diversidad existente a través de un proceso limitado de combinaciones.

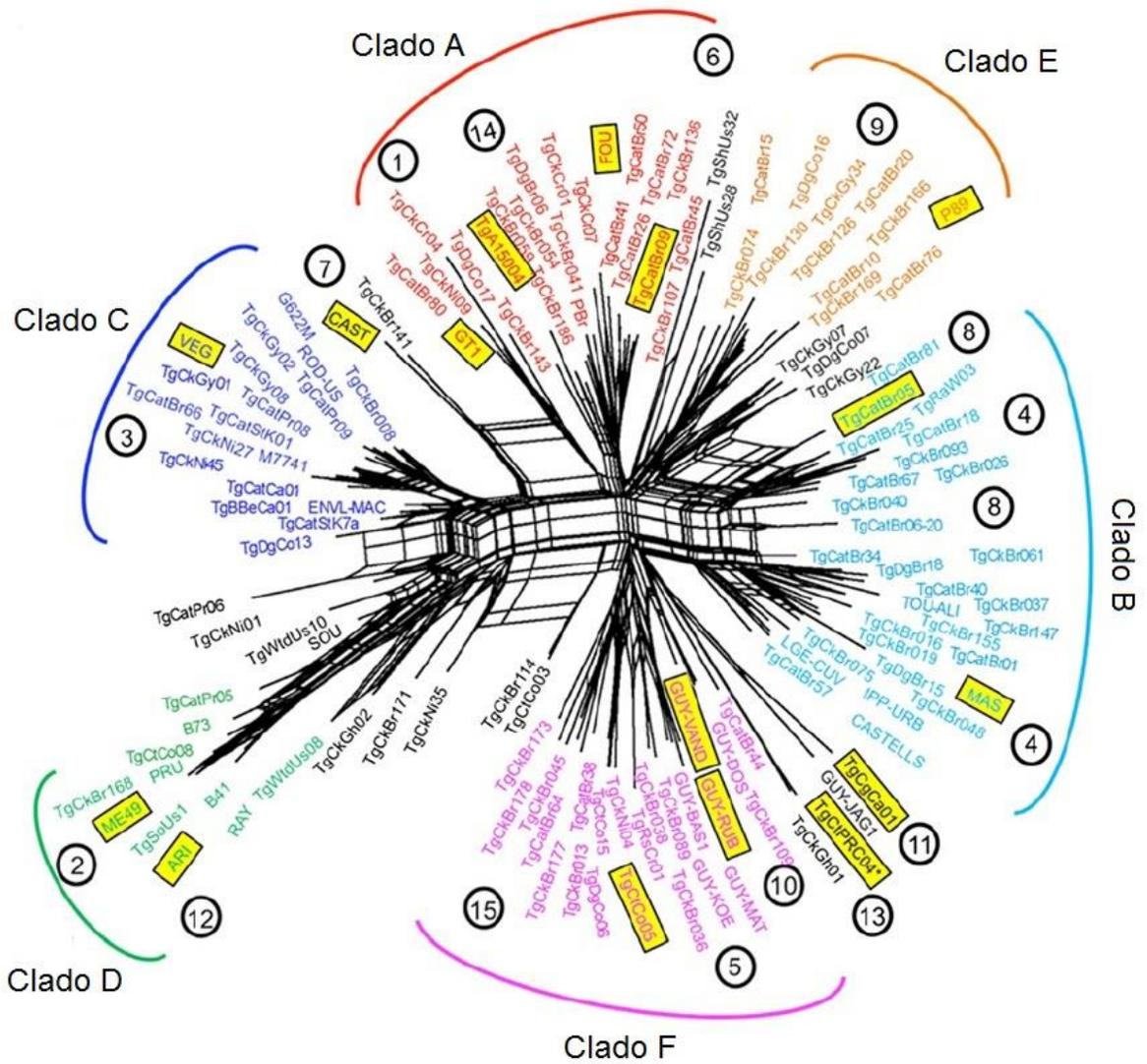


Figura 3. Árbol filogenético de 138 aislamientos de *Toxoplasma gondii* representativos de haplotipos únicos. Los aislamientos se analizaron con 11 marcadores multilocus de PCR-RFLP, 15 microsatélites y 4 secuencias de intrones de. En el árbol, se muestran seis clados mayores (clado A-F) con base en el análisis bioinformático empleando el programa STRUCTURE.

Tomado y modificado de: Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D et al. 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*. 2012; 109(15): 5844-5849.

La referencia más reciente donde se describe la gran variabilidad genética *T. gondii*, de acuerdo a su distribución geográfica, es el artículo de Shwab et al. (2014). Los autores recopilaron las publicaciones relacionadas con genotipificación de *T. gondii* hasta finales del 2012, abarcando datos de todos los continentes (excepto la Antártica), obteniendo información de 1457 aislamientos. Los aislamientos se clasificaron comparando dos sistemas, primeramente se tomaron los datos de los genotipos principales (designación convencional) incluyendo los linajes predominantes (I, II y III) así como otros atípicos, los de Brasil (Brl, II, III y IV), el clonal 12, África 1 y China 1. En segundo término, debido a la gran cantidad de aislamientos descritos en la literatura, se consideró el esquema de designación utilizado en la página electrónica ToxoDB/PCR-RFLP, donde los patrones obtenidos se van designando numéricamente de forma consecutiva. La comparación de ambos sistemas de clasificación se describe en el cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación de dos sistemas de clasificación de genotipos de *T. gondii*.

Designación de genotipo convencional	Designación genotipo ToxoDB PCR-RFLP	Aislamientos Representativos
Tipo I (I clonal)	#10	GT1, RH
Tipo II (II clonal)	#1	PTG, Me49
Tipo II (II variante)	#3	PRU
Tipo III (III clonal)	#2	VEG
Tipo 12 (atípica)	#4	B41
Tipo 12 (atípica, incluye los tipos X y A)	#5	ARI, RAY
Tipo Brl (atípica, incluye tipo África 1)	#6	FOU, TgCatBr2
Tipo BrII (atípica)	#11	TgCatBra1
Tipo BrIII (atípica)	#8	P89, TgPgUs15
Tipo BrIV (atípica)	#17	MAS, TgCkBr147
China 1 (atípica)	#9	TgCtPRC4

Tomado y modificado de: Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. Parasitology. 2014; 141(4): 453-461.

De los 1457 aislamientos descritos, se identificaron un total de 189 genotipos con base en el sistema de ToxoDB/PCR-RFLP, obteniéndose la mayoría de los aislamientos, a partir de muestras de animales domésticos y silvestres con infección crónica. Los 10 genotipos descritos con mayor frecuencia fueron el #2 o tipo III (13.8%), #3 o tipo II variante (12.6 %), #1 o tipo II (12.2 %), #5 o tipo 12 X/A (5.0 %), #4 o tipo 12 (4.5 %), #9 o China1 (3.8 %), #6 o BrI (3.3 %), #7 (2.6 %), #8 o BrII (2.3 %) y #10 o tipo I (2.1 %).

Los genotipos #1 y #3, que solo difieren en el locus Apico, comprenden juntos el linaje convencional tipo II, representando el 24.8% (362/1457) de la población. Para el genotipo #2 (tipo III), se describieron 201/1457 aislamientos, representando el 13.8 % de la población. Los genotipos #4 y #5, los cuales solo difieren en el locus *SAG1*, son representativos del tipo 12 (haplogrupo 12) y colectivamente representan el 9.5 % (139/1457). Los genotipos #6 y 8, representativos de Brasil, suman el 5.6 % (82/1457) de la población.

Al analizar los resultados por regiones geográficas, se observaron patrones particulares. Los genotipos #1, 2 y 3 se han identificado mundialmente y son prevalentes en Europa (de donde se estudiaron 64 aislamientos, determinándose solo 9 genotipos). En Norteamérica (EU y Canadá), se estudiaron 501 aislamientos, con 40 genotipos diferentes, siendo los genotipos #1, 2 y 3 también dominantes, así como los #4 y 5, que se distribuyen principalmente en fauna silvestre, contrastando estos últimos con lo predominante en Europa. Para Centro y Suramérica se estudiaron 646 aislamientos, determinándose 156 genotipos, sin presentarse algún genotipo dominante como tal y observándose una estructura poblacional altamente diversa; los 10 genotipos mas frecuente en estas regiones fueron el # 2, 6, 7, 8, 11, 3, 65, 13, 19 y 146, oscilando su frecuencias del 2.3 hasta el 6.8% de presentación.

1.5 Patogenia

La patogenia de la infección por *T. gondii* depende de diversos factores, que incluyen la virulencia de los aislamientos y cepas, la susceptibilidad del hospedador involucrado, el estadio del que se infectan, el estado inmunológico, entre otros (Montoya y Liesenfeld, 2004; Hill et al., 2005; Dubey, 2010).

1.5.1 Virulencia de aislamientos y cepas de *T. gondii*

En estudios recientes, algunos autores han documentado las variaciones entre aislamientos de *T. gondii* en regiones particulares del mundo, sobre todo en aislamientos de Suramérica, observándose diferentes cuadros clínicos asociados en los hospedadores afectados (Dubey, 2010; Melo et al., 2011; Darde, Ajzenberg y Su, 2014). Cademartori et al. (2014) describieron 17 aislamientos de *T. gondii* a partir de muestras de cerdos de traspatio, que al realizar el bioensayo, 7 de ellos fueron virulentos para ratón causando cuadros agudos diseminados, mientras que los 10 aislamientos restantes, causaron cuadros crónicos considerándose de baja virulencia.

El grado de virulencia de los aislamientos ha sido estudiado a partir de ensayos con ratones infectados con cepas clásicas o recombinantes de ellas, lográndose identificar proteínas específicas que confieren “ventajas” o “mayor capacidad” biológica durante la invasión celular, la replicación de taquizoitos y diseminación tisular. Se conoce que las proteínas ROP5, 16 y 18 de cepas tipo I, participan inhibiendo la actividad de células activadas por IFN- γ , disminuyendo la presentación de antígenos por parte de células dendríticas y prolongación de la activación de STAT3 y 6. Dicha actividad favorece la evasión de los diferentes mecanismos de la respuesta innata con los que cuenta el hospedador afectado. Otras proteínas relevantes que determinan la virulencia de *T. gondii* son las NTPasas (hidrolasas nucleosido-trifosfato), existiendo en dos isoformas (NTPasas I y II). Ambas se encuentran en las cepas virulentas, mientras que las no virulentas solo tienen la isoforma II. Estas enzimas se han asociado con la falta de activación

del inflamosoma, promoviendo la inhibición de la piroptosis y la reducción en los niveles de las citocinas IL-1b e IL-18 (Melo et al., 2011; Hunter y Sibley, 2012).

1.5.2 Susceptibilidad del hospedador

La patogenia de la enfermedad, puede estar condicionada en varias ocasiones por el tipo de hospedador que se encuentre afectado, generando un cuadro clínico-patológico particular, independiente de los demás factores. En la literatura científica, existen descripciones sobre especies que se consideran “resistentes” a la enfermedad, con manifestación clínica discreta o prácticamente nula, como son los primates del viejo mundo, rumiantes silvestres, bovinos domésticos o los equinos. Incluso las dos últimas especies, bajo condiciones experimentales con dosis altas de protozoarios inoculados por diversas vías, no desarrollan manifestación clínica o es casi nula la detección de parásitos postmortem en diversos tejidos. Contrastantemente, otras especies se consideran susceptibles, como los marsupiales australianos o primates del Nuevo Mundo, los cuales desarrollan cuadros agudos, que por lo general conducen a la muerte de los hospedadores infectados (Hill y Dubey, 2002; Montoya y Liesenfeld, 2004; Dubey, 2010; Wendte et al., 2011).

Las razones de este grado de susceptibilidad son desconocidas, existiendo varias hipótesis, como la que se plantea para los primates del Nuevo Mundo, en la que el comportamiento arborícola de estas especies a través de generaciones, ha restringido o minimizado su exposición a estadios infecciosos de *T. gondii*, como ooquistes en el alimento o agua, a los cuales han estado expuestas otras especies. Sin embargo, existen estudios serológicos en estos animales, en los que se han determinado la presencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii*, sugiriendo una primera exposición a la que han sobrevivido, posiblemente por una baja carga parasitaria ingerida o por la exposición a un genotipo de *T. gondii* no virulento para estas especies (Innes, 1997; Epiphany et al., 2003; Garcia et al., 2005; Salant et al., 2009; Dubey, 2010).

1.5.3 Relación parásito-hospedador

La lesión característica e indicativa de infección por *T. gondii* es la necrosis, en un principio es de tipo celular, y conforme transcurre el tiempo, de forma tisular. *T. gondii* usualmente parásita al hospedador, definitivo e intermediario, sin producir enfermedad clínica, siendo poco frecuente los casos clínicos severos. Independientemente del tipo de estadio con el que se infecte, ya sea por la ingestión de carne infectada con quistes tisulares o por alimento contaminado con ooquistes. Al alcanzar la luz intestinal tanto los bradizoítos como esporozoítos, penetran las células epiteliales y se multiplican dentro de las primeras 24 horas, generando múltiples taquizoítos, los cuales al necrosar las células infectadas, se liberan e invaden continuamente las células adyacentes, causando zonas de necrosis, las cuales cada vez son más extensas; conforme se van propagando, pueden invadir el tejido cercano (enterocitos, intersticio y tejido linfoide asociado, incluyendo leucocitos residentes y no residentes). Posteriormente, los zoítos se diseminan a linfonodos mesentéricos y a través de vasos linfáticos y sanguíneos, alcanzan diferentes órganos y se pueden multiplicar virtualmente en cualquier célula nucleada del cuerpo del hospedero. Recientemente se ha descrito, que la diseminación de *T. gondii* se ve favorecida por su habilidad de invadir células migratorias del sistema inmune, como las células dendríticas, lo que permite su distribución hacia tejidos linfoides; o bien, invaden macrófagos, neutrófilos y células NK generando un efecto denominado “caballo de Troya”, alcanzando tejidos distantes como el sistema nervioso central. El cuadro clínico es determinado por la extensión de las lesiones necróticas en los tejidos afectados, por el crecimiento intracelular de los taquizoítos y la presencia de una respuesta inflamatoria franca. El hospedador puede morir por un cuadro de toxoplasmosis aguda debido a las alteraciones en intestino y linfonodos mesentéricos, aunado a las lesiones necróticas en otros tejidos. En la mayoría de los casos, el hospedador controla la diseminación parasitaria y se recupera adquiriendo inmunidad con la aparición de anticuerpos, desarrollando toxoplasmosis crónica (Dubey y Beattie, 1988; Ferguson, 2004; Hill et al, 2005, Dubey, 2010; Weidner et al., 2014).

1.5.4 Respuesta inmune innata y adquirida

Varios autores citan, que el éxito de la infección de *T. gondii* implica un delicado equilibrio entre la respuesta inmune del hospedador que trata de eliminar al parásito y la capacidad de éste, para evadir o modular dicha respuesta, permitiendo su sobrevivencia en el huésped (Buzoni-Gatel y Werts, 2006; Miller et al., 2009).

Durante la fase aguda de la infección por *T. gondii*, la respuesta es innata (Figura 4), mediada por neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NKs), las cuales establecen mecanismos de fagocitosis y citotoxicidad celular. El reconocimiento inicial del parásito se lleva a cabo por receptores de macrófagos, predominantemente de tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4), en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), mediante la detección de proteínas ancladas por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), o de células dendríticas (CDs) que interactúan con el parásito a través de receptores tipo Toll 11 (TLR11) mediando la detección de la profilina del parásito. Posteriormente, los macrófagos y las CDs presentan antígenos y producen la citocina proinflamatoria interleucina 12 (IL-12), induciendo la respuesta adaptativa mediada por los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, los cuales producen un fenotipo Th1, así como estimulando a las células asesinas (NKs), favoreciendo la producción de interferón gamma (IFN- γ). El IFN- γ es el mayor mediador de la resistencia contra *T. gondii*, siendo crucial para la activación de células hematopoyéticas (CHem) y no hematopoyéticas (CNHem) que limitan la replicación del parásito. El IFN- γ propaga su señalización a través de receptores de superficie para IFN- γ (IFN- γ R), los cuales activan al transductor de señalización 1 (STAT-1), un factor de transcripción que controla la expresión de una amplia gama de genes. En respuesta a la activación de STAT-1, los monocitos y macrófagos sobrerregulan la producción de óxido nítrico (NO⁻) y de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales contribuyen al control de los parásitos intracelularmente (Figura 4) (Buzoni-Gatel y Werts, 2006; Correa et al., 2007; Matowicka-Karna et al., 2009; Miller et al., 2009; Hunter y Sibley, 2012).

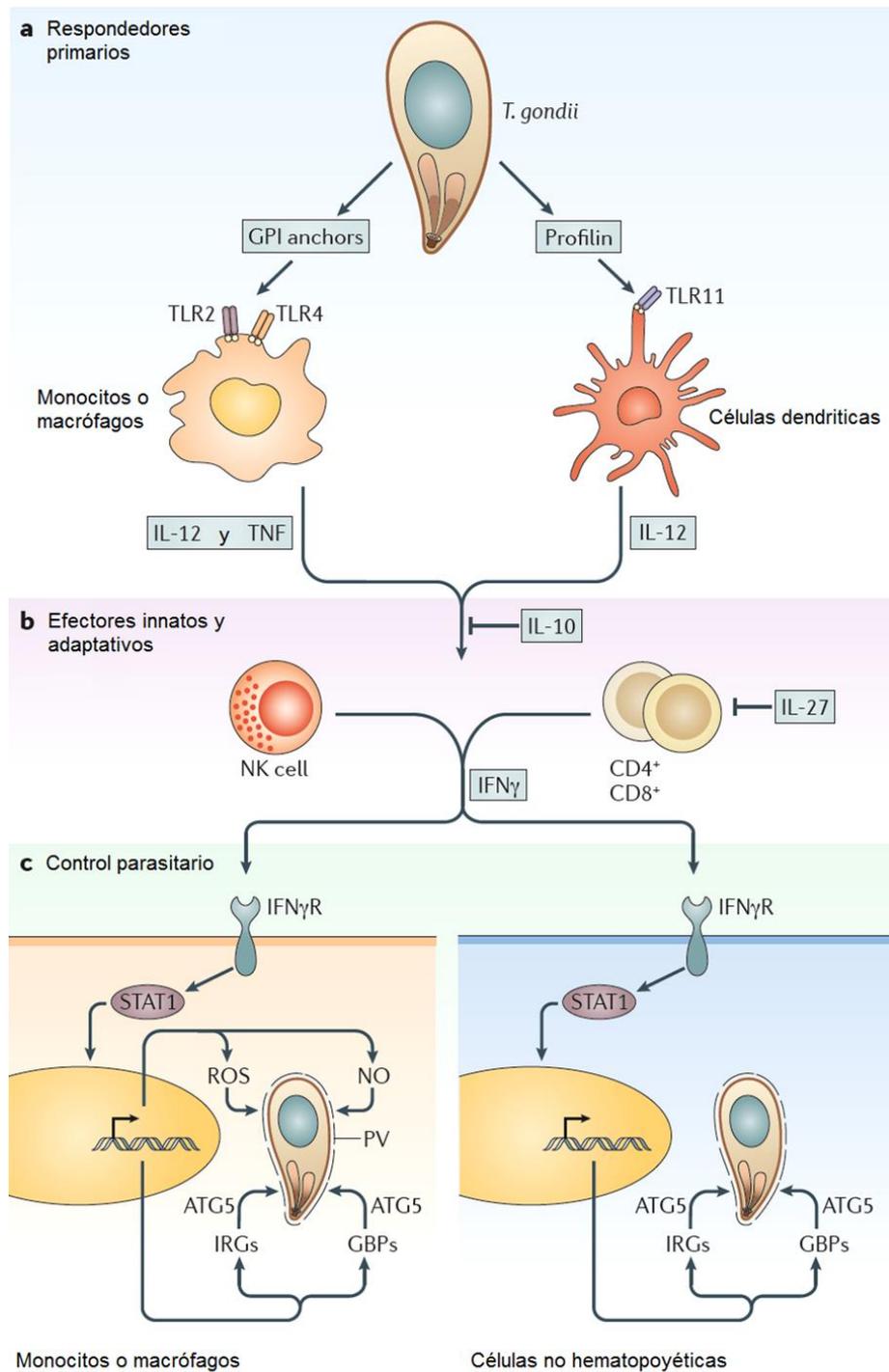


Figura 4. Respuesta inmune innata contra *T. gondii* durante la infección aguda. A) Respondedores primarios, B) Efectores innatos y adaptativos, C) Control parasitario.

Tomado y modificado de: Hunter CA, Sibley D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nature Reviews. 2012; 10: 766-778.

Así mismo, en ambos tipos celulares (CHem y CNHem), el IFN- γ sobrerregula la producción de dos familias de proteínas de defensa, dependientes de la proteína 5 de autofagia (ATG5), llamadas GTPasas relacionadas con la inmunidad (IRGs) y proteínas de unión con guanilato p67 (GBPs), las cuales son reclutadas hacia la vacuola parasitófora, favoreciendo la formación de vesículas y ruptura de la membrana, con subsecuente digestión y eliminación de los parásitos que se encuentren en el citoplasma. El IFN- γ también puede alterar el metabolismo celular, el cual favorece la degradación de triptofano en fibroblastos, el consumo de hierro en enterocitos, activa a las células efectoras incrementando la fagocitosis, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) por las mismas NKs y la citotoxicidad directa por linfocitos T CD8+. Así mismo, los macrófagos activados producen TNF- α que induce la apoptosis de las células infectadas (Buzoni-Gatel y Werts, 2006; Correa et al., 2007; Matowicka-Karna et al., 2009; Miller et al., 2009; Hunter y Sibley, 2012).

Los anticuerpos de clase IgM aparecen 3 a 10 días después de la infección y permanecen en circulación durante algunas semanas hasta varios años; estos anticuerpos pueden matar al parásito por activación del complemento. A nivel de las mucosas, se presentan los anticuerpos de clase IgA, los cuales participan inhibiendo la invasión celular por el parásito. En el caso de los humanos, los anticuerpos de las cuatro clases de IgG aparecen posteriormente al día 10; los de clase IgG1 e IgG3 pueden fijar complemento y actuar como opsoninas o moléculas mediadoras de ADCC, favoreciendo la eliminación de los taquizoitos; mientras que los de clase IgG2 o IgG4 protegen por neutralización de los parásitos. Por otra parte, los anticuerpos de clase IgE se asocian con mal pronóstico, tanto en la toxoplasmosis adquirida como congénita. Todas las formas extracelulares del parásito son afectadas directamente por los anticuerpos, pero no las formas intracelulares tras la formación de los quistes tisulares (alrededor de la tercera semana postinfección), los cuales se localizan en sistema nervioso y muscular principalmente, donde pueden persistir durante varios años (Hill et al., 2005; Correa et al., 2007; Cañedo-Solares et al., 2008; Dubey, 2010).

1.6 Presentaciones clínico-patológicas de la infección por *T. gondii* en animales domésticos y fauna silvestre

Como ya se ha mencionado, independientemente de la frecuencia en cada región del mundo y del hospedador de que se trate, la gran mayoría de las infecciones por *T. gondii* son asintomáticas, siendo los cuadros clínicos poco frecuentes y particulares para las distintas especies (Owen y Trees, 1999; Tenter et al., 2000; Dubey, 2004; Anfray et al., 2005; Hill et al., 2005; Wendte et al., 2011).

El término “toxoplasmosis” se utiliza para describir la enfermedad clínica o anatomopatológica causada por *Toxoplasma gondii*, generando una infección sintomática (enfermedad aguda) o bien, un cuadro persistente con quistes tisulares (enfermedad crónica o infección latente) (Montoya, 2002; Dubey, 2010).

En los casos clínicos como tal, las presentaciones de toxoplasmosis se pueden clasificar desde diferentes puntos de vista, por ejemplo si se adquirió antes (prenatal o congénita) o después del nacimiento (postnatal o adquirida); de acuerdo a su curso, como toxoplasmosis aguda o crónica; o bien, por su distribución anatómica, por ejemplo, toxoplasmosis ocular, nerviosa o diseminada (Hill y Dubey, 2002; Montoya y Liesenfeld, 2004; Bresciani et al., 2013).

En fauna silvestre, se ha descrito la toxoplasmosis de forma clínica o subclínica en una amplia gama de hospedadores, tanto en animales carnívoros como herbívoros, en cautiverio o en vida libre, así como en mamíferos (terrestres y marinos) y aves, documentándose la gran mayoría de los casos a partir de estudios postmortem. Así mismo, existen informes sobre la presentación de brotes esporádicos de enfermedad en diferentes grupos de animales silvestres, sin la presencia de un factor inmunodepresor como tal (Fowler y Miller, 2003, 2008; Dubey, 2004; Hill, 2005; Wendte et al., 2011). A continuación se describen las principales presentaciones clínico-patológicas de toxoplasmosis en animales domésticos y fauna silvestre, discutiendo los genotipos de *T. gondii* identificados en cada presentación, sin describirse a la fecha un patrón, tendencia o relación como tal, donde se refiera esta asociación.

1.6.1 Toxoplasmosis aguda diseminada

Esta presentación se ha descrito con mayor frecuencia en un grupo de animales de fauna silvestre considerados susceptibles o altamente susceptibles, que desarrollan cuadros agudos diseminados en un lapso de 2 a 5 días, llegando a causar mortalidad del 85 al 100%. Dentro de este grupo, se encuentran la mayoría de los géneros de primates del Nuevo Mundo (Dietz et al., 1997; Inoue, 1997; Epiphonio et al., 2000, 2003; Gyimesi et al., 2006); lemures (*Lemur* spp) (Spencer et al., 2004; Lindsay y Dubey, 2014); suricatas (*Suricata* sp) (Juan-Salles et al., 1997; Basso et al, 2009) y marsupiales australianos (Dubey et al., 1988; Hill et al, 2005; Basso et al, 2007), entre otras especies (Lindsay y Dubey, 2014).

Los animales afectados mueren de curso clínico rápido (uno a tres días) o súbitamente, incluso sin presentar signología en algunas ocasiones. En los casos que se percibe manifestación clínica, se llega a observar letargia, anorexia, depresión, diarrea y dificultad respiratoria, entre otros signos. En el caso de los marsupiales australianos, los signos clínicos son variables e incluyen diarrea, dificultad respiratoria, pérdida de peso, ceguera, signos nerviosos nerviosos y muerte súbita. Los órganos principalmente afectados por la diseminación del parásito son el pulmón, hígado, bazo, linfonodos mesentéricos y regionales, con desarrollo de lesiones necróticas y respuesta inflamatoria moderada; los pulmones presentan neumonía intersticial de moderada a severa y edema pulmonar generalizado. En todos los órganos, se pueden llegar a observar taquizoítos libres o en cúmulos intra o extralesionales. La causa de muerte se asocia con insuficiencia respiratoria y la necrosis diseminada (Epiphonio et al., 2003; Gyimesi et al., 2006; Adkesson et al., 2007; Espinosa-Aviles y Morales-Martínez, 2007; Dubey y Crutchley, 2008; Bermúdez et al., 2009; Parameswaran et al., 2009; Dubey, 2010; More et al, 2010; Pan et al., 2012).

Las referencias donde se describen las lesiones causadas por cuadros de curso agudo por *T. gondii* en este tipo de especies y el genotipo involucrado son escasas. En el cuadro 2 se mencionan las descritas a la fecha.

Cuadro 2. Casos de toxoplasmosis aguda en fauna silvestre con la identificación del genotipo de *T. gondii* involucrado.

País / condición	Especie	n ¹	Muestras ²	Genotipo ³	Referencia
Estados Unidos / cautiverio	Lemur (<i>Lemur catta</i>)	3/3	P, H, B, L	II (3)	Spencer et al., 2004
Argentina / cautiverio	Suricata (<i>Suricata suricatta</i>)	3/3	P, H, B, L, R, Enc	III (3)	Basso et al., 2009
Israel / semilibertad	Mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>)	7/8	P, H, C, Enc	III (7)	Salant et al., 2009
Guyana Francesa / cautiverio	Mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>)	3/22 (1 ^{er} brote)	P, H, B, C	II/u-1* (3)	Carme et al., 2009
		6/25 (2 ^{do} brote)	P, H, B, C, S	II/u-2** (6)	
España / semilibertad	Wallaby de Bennet (<i>Macropus rufogriseus</i>)	1/7	Est, I, H, B, L, C, Enc	II/III/u-1 (1)	Fernandez-Aguilar et al., 2013

1. n: número de animales de donde se logró la genotipificación / número de animales afectados.

2. Muestras: P, pulmón; Est, estómago; I, intestino; H, hígado; B, bazo; L, linfonodo; R, riñón; C, corazón; Enc, encéfalo; S, sangre.

3. Genotipo: genotipo determinado, clásico (I, II o III), recombinante (Ej.: I/II, I/II/III) o atípico (Ej.: II/u-1) y número de animales con el mismo genotipo (n).

*Genotipos del 1er brote, algunos marcadores tuvieron alelos atípicos (u-1).

**Genotipos del 2do brote, también se observaron alelos atípicos para algunos marcadores y diferentes (u-2) a los del primer brote.

1.6.2 Toxoplasmosis crónica neurológica

La afección del sistema nervioso central por *T. gondii* ha sido descrita en varias especies, tanto domésticas como silvestres, incluyendo al perro común (*Canis familiaris*) (Dubey, 2010), gato doméstico (*Felis catus*) (Dubey, 2010); canguros rojo y gris (*Macropus rufus*, *M. giganteus*), wallabys (*M. eugenii*, *M. rufogriseus*), (Dubey, 2010; Parameswaran et al., 2010); gato montés (*Felis rufus*) (Smith et al., 1995); borrego cimarrón (*Ovis canadensis canadensis*) (Baszler et al., 2000), y en mamíferos marinos incluyendo la nutria marina (*Enhydra lutrens nereis*) (Miller et al., 2004, 2008b) y diferentes especies de delfines (*Tursiops truncatus*, *Stenella coeruleoalba*) (Dubey, 2010), entre otras especies.

En estos animales se ha documentado esta presentación con presencia o ausencia de un factor predisponente, considerándose en varios casos como la causa de muerte del hospedador afectado. El patrón de lesiones corresponde a encefalitis o meningoencefalitis con gliosis, perivascularitis no supurativa, focos de necrosis e infiltrado inflamatorio tanto en sustancia blanca como gris con presencia de estructuras parasitarias, presentándose en algunas especies distribución preferencial en encéfalo medio (corteza y tallo cerebral) y en otras con un patrón disperso y sin ninguna región neuroanatómica en particular. En animales de compañía inmunocomprometidos, posterior a la infección por el virus de moquillo canino en los perros o por retrovirus en gatos, se puede presentar toxoplasmosis sistémica con afección al sistema nervioso central, que suele ser mortal (Hill y Dubey, 2002; Montoya y Liesenfeld, 2004; Cedillo-Peláez, 2009; Dubey, 2010; Lindsay y Dubey, 2014).

Los marsupiales australianos son un grupo de animales en los que se han documentado cuadros neurológicos por *T. gondii*, con signología asociada como incoordinación, ceguera parcial uni o bilateral, dificultad para desplazarse, marcha inestable y depresión. Sin embargo, también se han descrito en combinación con otros signos de los aparatos digestivo, respiratorio, musculoesquelético y linforreticular principalmente. Esta situación, basado en el patrón de lesiones y el tejido de origen de los aislamientos, sugiere la posibilidad de una infección previa con cepas no virulentas para estas especies, que se enquistaron en tejidos como encéfalo, miocardio y musculo esquelético, reactivándose con una segunda infección, la cual por sí sola o en combinación con la anterior, genera el conjunto de lesiones que causan la muerte de los animales afectados (Dubey y Crutchley, 2008; Dubey, 2010; More et al., 2010; Parameswaran et al., 2010; Fernández-Aguilar et al., 2013)

Los genotipos de *T. gondii* asociados a cuadros con afección primaria al sistema nervioso central en animales domésticos y silvestres se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Casos de toxoplasmosis crónica neurológica en animales domésticos y fauna silvestre con la identificación del genotipo de *T. gondii* involucrado.

País / condición	Especie	n ¹	Muestras ²	Genotipo ³	Referencia
Brasil / doméstico	Perro (<i>Canis familiaris</i>)	9/34	Enc	I (4) III (5)	Da Silva et al., 2005
Brasil / doméstico	Perro (<i>Canis familiaris</i>)	1/1	Enc	I (1)	Moretti et al., 2006
Brasil / doméstico	Perro (<i>Canis familiaris</i>)	3/50	Enc	I/III (1) P89 (1) TgCatBr1 (1)	Langoni et al., 2012
Estados Unidos / cautiverio	Wallaby Bennet (<i>M. rufogriseus</i>)	2/3	P, C, Enc, Mus	III (2)	Dubey y Crutchley, 2008
	Wallaby Tammar (<i>M. eugenii</i>)	½		III (1)	
Argentina / cautiverio	Canguro rojo (<i>M. rufus</i>)	1/1	Enc, Mus	III (1)	More et al., 2010
	Canguro gris (<i>M. giganteus</i>)	1/1		II (1)	
Australia / vida libre y aislamientos	Woyli (<i>B. penicillata</i>)	1/3	C, Enc, Mus	I (1)	Paramesawaran et al., 2010
	Suricata (<i>S. suricata</i>)	1/3		u-1 (1)	
	Wallaby Bennet (<i>M. rufogriseus</i>)	1/1		u-1 (1)	
	Wombat (<i>V. ursinus</i>)	1/1		u-1 (1)	
	Gato (<i>F. catus</i>)	1/1		I (I)	
	Cabra (<i>C. hircus</i>)	2/2		I (1), u-1 (1)	
España / semilibertad	Wallaby Bennet (<i>M. rufogriseus</i>)	1/7	Est, I, H, B, L, C, Enc	II/III/u-1 (1)	Fernandez-Aguilar et al., 2013
Estados Unidos / vida libre	Nutria marina (<i>Enhydra lutris</i>)	35/35	Enc	14, II 21, X	Miller et al., 2004
Costa Rica / vida libre	Delfin listado (<i>S. coeruleoalba</i>)	1/1	Enc	II (1)	Dubey et al., 2007b

1. n: número de animales de donde se logró la genotipificación / número de animales muestreados.

2. Muestras: P, pulmón; Est, estómago; I, intestino; H, hígado; B, bazo; L, linfonodo; C, corazón; Enc, encéfalo; Mus, músculo.

3. Genotipo: genotipo determinado, clásico (I, II o III), recombinante (Ej.: I/II, I/II/III) o atípico (Ej.: II/u-1) y número de animales con el mismo genotipo (n).

Cuadro 3. Casos de toxoplasmosis crónica neurológica en animales domésticos y fauna silvestre con la identificación del genotipo de *T. gondii* involucrado (continuación).

País / condición	Especie	n ¹	Muestras ²	Genotipo ³	Referencia
Estados Unidos / vida libre	Nutria marina (<i>E. lutris</i>)	39/39	Enc	II (13) I/II (3) A (14) X (7) II/III (2)	Sundar et al., 2008
Costa Rica / vida libre	Delfín listado (<i>S. coeruleoalba</i>)	1/1	Enc	II (1)	Dubey et al., 2007b
Estados Unidos / vida libre	Delfín nariz de botella (<i>T. truncatus</i>)	3/3	Enc	2, II (2) I/II/III/u-1 (1)	Dubey et al., 2008a
Canadá / cautiverio	Delfín nariz de botella (<i>T. truncatus</i>)	1/1	Enc	II (1)	Dubey et al., 2009a
Italia / vida libre	Delfín listado (<i>S. coeruleoalba</i>)	3/3	Enc	II (1) II/u-1 (2)	Di Guardo et al., 2011

1. n: número de animales de donde se logró la genotipificación / número de animales muestreados.

2. Muestras: P, pulmón; Est, estómago; I, intestino; H, hígado; B, bazo; L, linfonodo; C, corazón; Enc, encéfalo.

3. Genotipo: genotipo determinado, clásico (I, II o III), recombinante (Ej.: I/II, I/II/III) o atípico (Ej.: II/u-1) y número de animales con el mismo genotipo (n).

1.6.3 Toxoplasmosis crónica congénita

En el caso de esta presentación, la especie doméstica más susceptible a la infección por *T. gondii* son los ovinos (*Ovis aries*), describiéndose en la literatura que el consumo de 20 ooquistes son suficientes para desarrollar una infección crónica con repercusiones en tracto reproductor. La mayoría de los ovinos infectados no desarrollan signos clínicos y eventualmente son destinados para consumo, constituyendo una ruta importante de zoonosis. La transmisión congénita del feto se da cuando los rumiantes se infectan por primera vez, siendo dependiente de la edad gestacional. Las infecciones durante el primer o segundo tercio de la gestación se asocian usualmente a la presentación de abortos,

mientras la infección en el último tercio produce infección congénita con productos viables o sintomáticos. Así mismo, también se ha descrito que *T. gondii* es causante de muerte fetal, por la replicación parasitaria en el feto, o bien, si es más avanzada la gestación, por episodios de anoxia al presentarse múltiples focos de necrosis en los placentomas. Las lesiones en la placenta pueden aparecer desde los 10 días postinfección (PI) y se caracterizan por múltiples focos de necrosis en el septo caruncular, mientras que las lesiones en el feto se observan 15 días PI, siendo más frecuentes 20 días PI en el encéfalo, corazón, pulmón e hígado; estas característicamente son de tipo necróticas, delimitadas por células gliales (en sistema nervioso central) y/o por células inflamatorias mononucleares (en los demás tejidos), con o sin presencia de parásitos libres o en acúmulos, intra o extralesionales (Owen y Trees, 1999; Tenter et al., 2000; Dubey, 2004; Hill et al., 2005; Moreno et al., 2012; Castaño et al., 2014).

En diferentes especies domésticas y silvestres, principalmente rumiantes y mamíferos marinos, también se han descrito casos de toxoplasmosis congénita: bovino (*Bos taurus*) (Chávez-Crisostomo, 2010), cabra (*Capra aegagrus hircus*) (Dubey, 2010), cerdo (*Sus scrofa*) (Dubey, 1988), perro (*C. familiaris*) (Al-Qassab et al., 2009), venado cola blanca (*Odocoileus hemionis*) y venado bura (*O. hemionus*) (Dubey et al., 2008d, 2010), delfín del atlántico (*Tursiops truncatus*) (Jardine y Dubey, 2002), delfín Riso (*Grampus griseus*) (Resendes et al., 2002) y nutria marina (*E. lutris nereis*), entre otros mamíferos.

Los genotipos de *T. gondii* asociados a cuadros de toxoplasmosis congénita en animales domésticos y silvestres se describen en el cuadro 4.

Cuadro 4. Casos de toxoplasmosis crónica congénita en animales domésticos y fauna silvestre con la identificación del genotipo de *T. gondii* involucrado.

País / condición	Especie	n ¹	Muestras ²	Genotipo ³	Referencia
Reino Unido / intensivo	Ovino (<i>O. aries</i>)	13/13	Pla	II (13)	Owen y Trees, 1999
Estados Unidos / vida libre	Nutria marina (<i>E. lutris</i>)	1/1	Enc, Mus	X (1)	Miller et al., 2008a
Estados Unidos / vida libre	Venado cola blanca (<i>O. virginianus</i>)	15/88 F*	Enc	II (9) III (2) I/II (2) I/II/III (1) I/III (1)	Dubey et al., 2008d
Australia / doméstico	Perro (<i>C. familiaris</i>)	6/6	Enc	II (6)	Al-Qassab et al., 2009
Brasil / estabulado lechero	Bovino (<i>Bos taurus</i>)	1/60 F* 1/60 V**	S P, H, C, Enc, S	II (1) II (1)	de Macedo et al., 2012
Estados Unidos / intensivo	Ovino (<i>O. aries</i>)	½	C, Enc	I/II/III/u-1 (1)	Edwards y Dubey, 2013
Brasil / doméstico	Perro (<i>C. familiaris</i>)	1/1	H, C	III (1)	Headley et al., 2013
España / vida libre	Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	3/3 F* 1/1 J***	P, L, C, Enc, Mus C, Mus	I (1), III (1) I y III (1 y 1) I y III (1 y 1)	Calero-Bernal et al., 2013
Estados Unidos / vida libre	Venado cola blanca (<i>O. virginianus</i>)	1/155 F*	Enc	I/II/III* (1)	Dubey et al., 2014

1. n: número de animales o muestras (placentas o fetos) de donde se logró la genotipificación / número de animales o muestras afectados.

*F: fetos, **V: vacas, ***J: jabalí adulta.

2. Muestras: P, pulmón; H, hígado; B, bazo; L, linfonodo; C, corazón; Enc, encéfalo; O, ojo; Mus, musculo esquelético; Pla, placenta; S, sangre.

3. Genotipo: genotipo determinado, clásico (I, II o III), recombinante (Ej.: I/II, I/II/III) o atípico (Ej.: II/u-1) y número de animales con el mismo genotipo (n).

1.7 Toxoplasmosis en México

En nuestro país, se han realizado estudios para determinar la presencia de *T. gondii* en humanos, animales domésticos y silvestres. La mayoría de ellos son tipo serológico, empleando distintas técnicas y con resultados variables para cada estado de la República. En el cuadro 5, se describen los resultados de diferentes estudios realizados en humanos, llevados a cabo entre los años 2005 y 2013; así mismo, en las últimas dos décadas, se realizaron dos estudios en la población general, abarcando muestras de todo el país, los cuales se describen a continuación.

Velasco-Castrejon y colaboradores (1992), a partir de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (de 1987), estudiaron 29 935 sueros de persona, con un rango de edad de uno a 98 años, detectando anticuerpos contra *T. gondii* mediante inmunofluorescencia indirecta en el 32% (dilución 1:16) y 19.5% (dilución 1:128) de los sueros estudiados.

Caballero-Ortega et al. (2012), estudiaron muestras de suero de dos Encuestas Seroepidemiológicas Nacionales (2000 y 2006) para la detección de anticuerpos de clase IgG mediante ELISA indirecta. De la Encuesta del 2000, se estudiaron 3599 muestras y la seroprevalencia fue del 60.1 %, mientras que de la encuesta del 2006, se estudiaron 2916 muestras con una seroprevalencia del 62.6%.

En el caso de animales domésticos y fauna silvestre, la mayoría de los estudios también han sido de tipo serológico (cuadros 6 y 7). Aunque se han descrito otros estudios, donde se han empleado diferentes técnicas de laboratorio para evidenciar la presencia de *T. gondii*, con un enfoque de tipo epidemiológico principalmente.

Vidal-Hernández (1996) detectó anticuerpos contra *T. gondii* en suero de wallaby de cuello rojo (*Macropus rufogriseus*) de diversas edades, que compartían el mismo albergue, alimentación y manejo, pertenecientes al zoológico de Chapultepec en el D.F. Los doce animales estudiados resultaron positivos y 21 meses después del estudio, se presentó mortalidad en el mismo grupo de

animales, los cuales exhibieron signología nerviosa, respiratoria y/o digestiva, confirmándose la presencia de estructuras parasitarias por histopatología.

Espinosa-Avilés y Morales-Martínez (2007) describieron un brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) de Guadalajara, Jalisco; que afectó en un lapso de tres semanas a 23 de 25 animales (92%), muriendo 16 de ellos (64%) con signos clínicos y cambios patológicos similares, asociados a infección por *T. gondii*.

Pacheco-Coronel (2010) estudió la frecuencia de diferentes parásitos incluyendo a *T. gondii*, en mamíferos ferales y silvestres de una reserva ecológica al sur del D.F. La presencia de *T. gondii* se estudió en perros (*Canis familiares*), gatos (*Felis catus*) y tlacuaches (*Didelphys virginiana*) mediante ELISA indirecto, PCR y bioensayo en ratón. En cacomixtles (*Bassariscus astutus*), solamente se realizó serología, resultando negativas las muestras a la detección de anticuerpos.

Méndez-Bernal et al. (2011) describieron un brote de toxoplasmosis aguda en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) provenientes de Cuernavaca, Morelos, los cuales conformaban una colonia de 9 animales; apreciándose en cinco de ellos lesiones similares a las descritas por otros autores.

Recientemente, Alvarado-Esquivel y colaboradores (2013e), determinaron la frecuencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii* mediante aglutinación modificada en mamíferos silvestres de tres zoológicos del D.F., resultando 89 (53.3%) positivos, incluyendo 35 de 43 felinos (81.4%), 35 de 54 carnívoros (64.8%), 9 de 3 artiodáctilos (69.3%), 4 de 4 perisodáctilos, 4 de 6 primates (66.6), 1 de 1 proboscido (100.0%) y 1 de 1 roedores (100.0%).

Cuadro 5. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en humanos (2005-2013).

Grupo / subgrupo	Estado	Técnica ¹	n ²	Positivos		Referencia
				IgM	IgG	
Humanos						
Neonatos	D.F.	ELISA	1001	0.19 %	---	Vela-Amieva et al., 2005
Donadores de sangre	Jalisco	ELISA	359	---	29.0%	Galván-Ramírez et al., 2005
Mujeres gestantes	Durango	ELISA	343	0.0 %	6.1 %	Alvarado-Esquivel et al., 2006a
Pacientes psiquiátricos	Durango	ELISA	137	26.3 %	18.2 %	Alvarado-Esquivel et al., 2006b
Donadores de sangre	Durango	ELISA	432	1.9 %	7.4 %	Alvarado-Esquivel et al., 2007a
RN* asintomáticos	Jalisco	IF	60	---	5.0 %	Galván-Ramírez et al., 2007
Prematuros			30	---	6.6 %	
RN sintomáticos			30	---	13.3 %	
Recolectores de basura	Durango	ELISA	90	---	21.1 %	Alvarado-Esquivel et al., 2008a
Procesadores de basura			83	---	8.4 %	
Población adulta (rural)	Durango	ELISA	462	2.2 %	24.0 %	Alvarado-Esquivel et al., 2008b
Trabajadores de rastro	Jalisco	ELISA	145	---	72.0 %	Galván-Ramírez et al., 2008
Mujeres gestantes (rural)	Durango	ELISA	439	2.3 %	8.2 %	Alvarado-Esquivel et al., 2009
Mujeres gestantes	D.F.	ELISA	100	---	30.0 %	Cañedo-Solares et al., 2009
Recién nacidos asintomáticos	Jalisco	ELISA	860	---	0.6 %	Galván-Ramírez et al., 2009
Comunidad Menonita	Durango	ELISA	152	3.3 %	30.3 %	Alvarado-Esquivel et al., 2010a
P** discapacidad auditiva	Durango	ELISA	85	---	8.2 %	Alvarado-Esquivel et al., 2010b
P con hemodiálisis			50	---	10.0 %	
P discapacidad visual			234	---	12.0 %	
P riesgo inmunosupresión			103	---	6.8 %	

1. Técnica: ELISA, ensayo inmunoenzimático; IF, inmunofluorescencia.

2. n: número de muestras evaluadas.

*RN, recién nacidos. ** P, pacientes.

**Cuadro 5. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en humanos (2005-2013)
(continuación).**

Grupo / subgrupo	Estado	Técnica ¹	n ²	Positivos		Referencia
				IgM	IgG	
Plomeros Trabajador construcción Jardinero	Durango	ELISA	61	0	6.6 %	Alvarado-Esquivel et al., 2010c
			203	1.5 %	8.4 %	
			168	2.4 %	6.0 %	
Propietarios de gatos			80	37.0 %	25.0 %	Jiménez-Coello et al., 2011
Pacientes esquizofrénicos	Durango	ELISA	50	---	20.0 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011a
Población general	Durango	ELISA	974	2.1%	6.1 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011b
Carniceros Clientes de carnicería	Durango	ELISA	124	4.0 %	7.0 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011d
			248	2.0 %	9.0 %	
Pacientes con enfermedad hepática Población general	Durango	ELISA	75	2.7 %	13.3 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011e
			150	3.3 %	10.7 %	
Agricultores Población general	Durango	ELISA	200	1.0 %	7.5 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011h
			400	2.8 %	7.8 %	
Tepehuanos	Durango	ELISA	156	9.6 %	22.4 %	Alvarado-Esquivel et al., 2012d
Pacientes con accidentes de trabajo Población general	Durango	ELISA	133	0.8 %	8.3 %	Alvarado-Esquivel et al., 2012e
			256	2.3 %	5.3 %	
Población adulta mayor	Durango	ELISA	483	2.9 %	12.0%	Alvarado-Esquivel et al. 2012f
Población general (2000)	Nacional	ELISA	3599	---	60.1 %	Caballero-Ortega et al., 2012
Población general (2006)			2916	---	62.6 %	
Mujeres con aborto espontaneo	Yucatán	ELISA	100	20.0 %	55.0 %	Vado-Solis et al., 2013
Migrantes agricultores	Durango	ELISA	173	20.8 %	28.9 %	Alvarado-Esquivel et al., 2013c

1. Técnica: ELISA, ensayo inmunoenzimático.
2. n: número de muestras evaluadas.

Cuadro 6. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en animales domésticos (1980-2013)

Grupo / subgrupo	Estado	Técnica ¹	n ²	Positivos IgG	Referencias
Gatos					
---	D.F.	ELISA	46	63.0 %	Aparicio, 1987
Doméstico	D.F. / Estado de México	HA	600	14.5%	Alba-Hurtado et al. 2001
Doméstico	Durango	MAT	105	21.0 %	Alvarado-Esquivel et al., 2007b
Doméstico	Colima	ELISA	80	28.8 %	García-Márquez et al., 2007
Doméstico	D.F.	ELISA	169	21.8 %	Besn�-Mérida et al., 2008
Ferales	Durango	MAT	150	9.3 %	Dubey et al., 2009c
Caninos					
Doméstico Callejero	D.F.	IF	100 200	34.0 % 52.5 %	Martínez-Maya, 1986
Domestico	Durango	MAT	101	51.5 %	Dubey et al., 2007a
Ferales	Durango	MAT	150	45.3 %	Dubey et al., 2009c
Doméstico y callejero	Oaxaca	ELISA	154	62.3 %	Díaz-Figueroa, 2010
Feral y callejero	Guanajuato	ELISA	73	42.5%	Cedillo-Peláez et al., 2011
Bovinos					
Lechero	Estado de México	IF	1237	18.1%	Juárez, 1980
---	Oaxaca	IF	100	57.0 %	Vargas, 1985
Ovinos					
---	Veracruz	ELISA	351	77-84 %	Caballero-Ortega et al., 2008a
---	Colima	ELISA	103	29.1 %	Caballero-Ortega et al., 2008b
Montaña, valle semidesértico	Durango	MAT	511	15.1 %	Alvarado-Esquivel et al., 2012a
Granja	Oaxaca	MAT	429	23.1 %	Alvarado-Esquivel et al., 2013b
Granja, semiintensivo	Michoacán	MAT	405	29.9 %	Alvarado-Esquivel et al., 2013f

1. Técnica: ELISA, ensayo inmunoenzimatico; HA, hemaglutinación; MAT, aglutinación modificada; IF, inmunofluorescencia.

2. n: numero de muestras evaluadas.

Cuadro 6. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en animales domésticos (1980-2013) (continuación).

Grupo / subgrupo	Estado	Técnica ¹	n ²	Positivos IgG	Referencias
Cabras					
---	Oaxaca	IF	150	32.6 %	Vargas, 1985
Zona semidesértica	Durango	MAT	70	32.7 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011g
Zona montañosa			492	18.6 %	
Granja	Michoacan	MAT	341	15.2 %	Alvarado-Esquivel et al., 2013b
Porcinos					
Traspatio-granja	Durango	MAT	555	16.0 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011c
Granja	Sonora		519	9.1 %	
Traspatio	Oaxaca	MAT	337	17.2 %	Alvarado-Esquivel et al., 2012h
Granja			188	0.5 %	
Granja	Yucatán	ELISA	429	95.8 %	Ortega-Pacheco et al., 2013
Equinos					
---	DF	IF	200	50.5 %	Luna, 1990
---	Durango	MAT	495	6.1 %	Alvarado-Esquivel et al., 2012g
Conejos					
Granja	DF	ELISA	286	26.9 %	Figuroa-Castillo et al., 2006
Granja	Durango	MAT	429	16.3	Alvarado-Esquivel et al., 2013d
Gallinas					
Traspatio	VM*	MAT	208	6.2 %	Dubey et al., 2004
Traspatio	Durango	MAT	51	25.5 %	Alvarado-Esquivel et al., 2012c
Granja	Sinaloa		289	4.9 %	
Granja	Nayarit		179		
Roedores					
Ratas	Durango	MAT	249	0.8 %	Dubey et al., 2009c
Ratones			127	3.1 %	

1. Técnica: ELISA, ensayo inmunoenzimático; MAT, aglutinación modificada; IF, inmunofluorescencia.

2. n: número de muestras evaluadas.

*VM: Valle de México, DF y Estado de México.

Cuadro 7. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en fauna silvestre (1991-2012)

Grupo / subgrupo	Estado	Técnica ¹	n ²	Positivos IgG	Referencias
Mamíferos terrestres					
Felinos silvestres	D.F.	FC	20	5.0 %	Berrón, 1991
Wallaby de cuello rojo (<i>Macropus rufogriseus</i>)	D.F.	FC	12	100.0 %	Vidal-Hernández, 1996
Felinos silvestres	Edo. de México	ELISA	48	58.3	Sánchez, 1997
Puma (<i>Puma concolor</i>)	----	LAT	12	16.7 %	Kikuchi et al., 2004
Gato montes (<i>Lynx rufus</i>)			6	66.6 %	
Mapaches enanos (<i>Procyon pygmaeus</i>)	Quintana Roo	IHA	300	11.0 %	McFadden et al., 2005
Zarigueya (<i>Didelphys virginiana</i>)	Durango	MAT	65	16.6 %	Dubey et al., 2009c
Ardilla (<i>Spermophilus variegatus</i>)			69	0.0 %	
Venado cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas	ELISA, WB	368	13.9 %	Olamendi-Portugal et al., 2012
Ocelote (<i>Leopardus pardalis</i>)	Tamaulipas	LAT	26	69.2 %	Rendón-Franco et al., 2012
Puma (<i>Puma concolor</i>)	Durango	MAT	1	100.0 %	Dubey et al., 2013a
Mamíferos terrestres de tres zoológicos	DF	MAT	167	53.3%	Alvarado-Esquivel et al., 2013e
Mamíferos marinos					
Delfín del Atlántico			63	87.3 %	
Delfín del Pacífico			3	100.0 %	
León marino de California	Centro y sureste del país	MAT	4	50.0 %	Alvarado-Esquivel et al., 2012b
León marino de la Patagonia			2	0.0 %	
Manatí			3	0.0%	
Aves					
Aves silvestres	Durango	MAT	653	2.6 %	Alvarado-Esquivel et al., 2011f

1. Técnica: FC, fijación del complemento; ELISA, ensayo inmunoenzimático; LAT, aglutinación en latex; IHA, hemaglutinación indirecta; MAT, aglutinación modificada; WB, western blot.

2. n: número de muestras evaluadas.

1.8 Genotipos de *T. gondii* en México

En nuestro país, han sido pocos los estudios de genotipificación de *T. gondii*, incrementándose principalmente en los últimos años. El primer estudio de este tipo fue llevado a cabo en el año 2004 por Dubey y colaboradores, a partir de muestras de gallinas de traspatio del valle de México, que posterior a su bioensayo en ratón se lograron obtener 6 aislamientos, genotipificándose con un solo marcador (SAG2) e identificando uno de los aislamientos como genotipo I y los 5 restantes como genotipo III.

En años posteriores (Dubey et al., 2009c y 2013a; Alvarado-Esquivel et al. 2011f), en el mismo estado de Durango, se han logrado diferentes aislamientos a partir de muestras de tejido de perros, gatos, una paloma y un puma de vida libre. Al realizar la genotipificación multilocus (SAG1, 5'-3' SAG2, nuevo SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 y Apico) de los mismos, así como de 4 aislamientos de gallinas publicados previamente, permitió la identificación de 3 genotipos recombinantes (ToxoDB #73, 74 y 155), dos genotipos atípicos (#9 y 222) y un clonal genotipo III (#2).

Por otra parte, el resto de la información generada sobre este tema, corresponde en primer término a trabajos de investigación de posgrado y trabajos presentados en congresos (Cedillo-Peláez, 2009; Luna-Pasten et al., 2009; Besne-Merida, 2010; Chávez-Crisostomo, 2010); y en segundo término, una publicación, correspondiendo a casos congénitos en humanos (binomios), identificándose genotipos I y atípicos (Rico-Torres et al., 2012) (Cuadro 8 y figura 5).

Cuadro 8. Resumen de aislamientos y genotipos de *T. gondii* descritos en México.

Aislamiento / Identificación ¹	Especie	Estado	Genotipo ²	ToxoDB ³	Referencia
TgCkMx1	Gallina	DF/EM*	III	#2	Dubey et al., 2004, 2009c
TgCkMx2	Gallina	DF/EM			
TgCkMx3	Gallina	DF/EM			
TgCkMx4	Gallina	DF/EM			
TgDgMx1	Perro	Durango	I/II/III Recombinante	#74	Dubey et al., 2009c
TgDgMx3	Perro	Durango			
TgCatMx1a	Gato	Durango			
TgDgMx2	Perro	Durango	I/III Recombinante	#73	Dubey et al., 2009c
TgCatMx1b	Gato	Durango	I/III Recombinante	#155	Dubey et al., 2009c
TgCatMx2	Gato	Durango	I/II/III/u-1 Atípico	#9	Dubey et al., 2009c; Alvarado-Esquivel et al., 2011f
TgCatMx3	Gato	Durango			
TgCatMx4	Gato	Durango			
TgCatMx5	Gato	Durango			
TgPigeonMx1	Paloma	Durango			
TgPumaMx1	Puma	Durango	I/II/u-1 Atípico	#222	Dubey et al., 2013a
Wallaby5	Wallaby	DF	I	#ND	Cedillo-Peláez, 2009
P 02a DF	Perro	DF	I/II Recombinante	#10	Luna-Pasten, et al., 2009
P 02b DF	Perro	DF			
G32 Col	Gato	Colima	I	#10	Besné-Mérida, 2010
G45 Col	Gato	Colima	III	#ND	
G GAM4 DF	Gato	DF	I	#ND	
B 01 Hgo	Bovino	Hidalgo	I	#10	Chavez-Crisostomo, 2010
Binomio1	Humano	DF/EM	I/u-1	#ND	Rico-Torres et al., 2012
Binomio2	Humano	DF/EM	I/u-1	#ND	
Binomio3	Humano	DF/EM	I	#ND	
Binomio4	Humano	DF/EM	I	#ND	

1. Aislamiento/identificación: nombre asignado al aislamiento o identificación de las muestras estudiadas.

2. Genotipo: genotipo determinado mediante PCR-RFLP y número asignado de acuerdo a ToxoDB.

3. ToxoDB: número asignado de acuerdo a ToxoDB-PCR-RFLP. #ND: # no determinado.

*EM: Estado de México



Figura 5. Distribución de aislamientos y genotipos de *T. gondii* descritos en México.

2. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la diversidad genética de *T. gondii* en diferentes partes del mundo y su efecto en los huéspedes involucrados, con infección natural o experimental, ha permitido caracterizar nuevos genotipos a los anteriormente descritos o contemplados, como los genotipos endémicos de Brasil o los genotipos X y A propios de nutrias marinas en costas de los Estados Unidos.

Las investigaciones realizadas sobre la toxoplasmosis en México, tanto en medicina humana como veterinaria, se han enfocado principalmente al aspecto epidemiológico generando resultados importantes sobre su frecuencia y presentación. Los estudios sobre las lesiones asociadas a la infección aguda o crónica, solamente se han descrito en algunos hospedadores, así mismo, la descripción de genotipos circulantes en el país siguen siendo escasa, conociéndose solamente la presencia de genotipos I y III, recombinantes y atípicos en el valle de México y el norte del país.

Dichas circunstancias permiten considerar la posibilidad de que estén circulando éstos y otros genotipos, en otras especies o en otras regiones del país, con diferente presentación clínica y efecto en los hospedadores involucrados.

3. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA

La diversidad genética de *Toxoplasma gondii* es discreta en nuestro país, siendo similares los tipos de presentaciones de toxoplasmosis a lo referido en Norteamérica y Europa.

HIPÓTESIS ALTERNA

La diversidad genética de *Toxoplasma gondii* en México comprende los genotipos clásicos I, II y III, genotipos recombinantes y atípicos, distribuyéndose en diversas regiones del país con diferente grado de patogenicidad en los hospedadores afectados.

4. OBJETIVO

Caracterizar genéticamente *Toxoplasma gondii* en animales domésticos y fauna silvestre, correlacionando por anatomopatología el grado de su patogenicidad en casos clínicos y asintomáticos.

5.0 MATERIAL Y METODOS

5.1 Tipo de estudio

El trabajo de investigación desarrollado fue retrospectivo-prospectivo, transversal, comparativo y descriptivo.

5.2 Estrategia general

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se obtuvieron muestras de tejidos de diferentes animales y procedencias, evaluándose por diversas técnicas de laboratorio:

1) Estudio prospectivo: a partir de grupos de animales que presentaran infección asintomática por *T. gondii* (diagnosticados por la presencia de anticuerpos contra *T. gondii* por ELISA indirecto a partir de muestras de suero), que fueran a ser eutanasiados por diversas circunstancias (Ej.: animales de antirrábico) y de los que se pudieran obtener muestras de tejidos para estudios de anatomopatología y biología molecular. Las muestras de suero para determinación de anticuerpos se preservaron en refrigeración hasta su remisión al Laboratorio de Inmunología Experimental (LIE) del Instituto Nacional de Pediatría (INP). En los casos donde se obtuvieron muestras de tejidos, se recolectaron fragmentos representativos de diferentes tejidos, una porción se fijo en formalina amortiguada al 10% y la otra porción se mantuvo en refrigeración, remitiéndose de forma similar a las muestras de suero.

2) Estudio retrospectivo: se recuperaron casos de archivo (cortes histológicos, bloque de parafina y tejidos en formalina amortiguada al 10%) de animales domésticos y fauna silvestre con diagnóstico postmortem de toxoplasmosis, provenientes de tres Laboratorios Patología. Los cortes histopatológicos se reevaluarán para la descripción de lesiones y la presencia de parásitos se confirmó mediante inmunohistoquímica (IHQ). En los casos que se contaba con material fotográfico de las necropsias, también se reevaluaron las alteraciones macroscópicas perceptibles.

3) A partir de otros estudios llevados a cabo previamente en el LIE (Luna-Pasten et al., 2009; Chávez-Crisostomo, 2010; Pacheco-Coronel, 2010), se contaba con tres aislamientos de *T. gondii* obtenidos mediante bioensayo en ratón, de diferentes tejidos provenientes de un perro (del D.F.), un gato (de Colima) y un becerro (de Hidalgo). De cada aislamiento, se utilizó para este estudio, un vial mantenido en criopreservación con por lo menos 10 millones de taquizoítos.

De los tejidos obtenidos a partir de los animales eutanasiados (estudio prospectivo), de bloque de parafina y tejidos fijados (estudio retrospectivo), así como de los aislamientos criopreservados, se extrajo DNA mediante diferentes protocolos y posteriormente se realizaron ensayos de PCR en punto final para la detección de *T. gondii* empleando diferentes marcadores (B1, GRA6, GRA7, SAG2, SAG3 o BTUB). Utilizando los amplicones generados, se llevó a cabo la genotipificación por PCR-RFLP, y en los casos que fue posible, los productos de amplificación se remitieron para su secuenciación comercial y posteriormente se analizaron bioinformáticamente.

5.3 Entidades de donde se obtuvo el material de estudio

A continuación se enlistan las diferentes entidades de donde se obtuvieron las muestras para el presente trabajo de investigación:

- Laboratorio de Patología (LP), Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre, Gobierno del Distrito Federal (DGZVS), México, D.F.
- Zoológico de Guadalajara (ZG), Guadalajara, Jalisco.
- Zoofari (ZF), Amacuzac, Morelos.
- Departamento de Patología (DP), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F.
- Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca (UABJO) y Centro de Control Canino y Antirrábico (CCAO), Oaxaca de Juárez, Oaxaca.

- Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus Irapuato-Silao, Universidad de Guanajuato (CSI-UG) y Centro de Control Canino y Antirrábico (CCAI), Irapuato, Guanajuato.
- Centro de Enseñanza, Investigación, y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) y Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio (DEFSAL), FMVZ, UNAM, México, D.F.

5.4 Análisis del material de estudio

Las técnicas de laboratorio para la evaluación de las diferentes muestras obtenidas en el presente trabajo de investigación se describen a continuación.

5.4.1 Serología

Conforme se recolectaron o recibieron las muestras de suero, se evaluaron por duplicado mediante ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos IgG contra *T. gondii*, con base en los descrito por Besné-Mérida (2008) y Xicotencatl-García (2010).

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc, No. cat. 439454) recubiertas con extracto crudo de taquizoítos de *T. gondii* (2 µg / ml) de la cepa de referencia RH en amortiguador de carbonatos (15 mM), pH 9.6, las cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Transcurrido el tiempo, los pozos se lavaron cinco veces con solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS) adicionado con 0.05% de Tween 20 (T), bloqueando los sitios inespecíficos con 200 µl de albumina sérica bovina (Euro-clone, Italy) al 0.1%, incubándose a 37°C por 30 minutos, lavándose posteriormente con PBS-T. Los sueros a evaluar se diluyeron con PBS-T a diferentes proporciones dependiendo de la especie: perro a 1:400 y felinos (domésticos o silvestres) a 1:200; una vez hechas las diluciones se agregó a cada pozo 200 µl y las placas se dejaron incubar a 37°C por dos horas. Los pozos se lavaron de forma similar a los pasos anteriores y se agregaron 100 µl de conjugado específico comercial anti-perro IgG (SIGMA-Aldrich, MO, USA; producto A6792) o anti-gato IgG (Abcam, Cambridge, MA, USA; producto

ab112801), acoplados a peroxidasa, a diluciones de 1:2500 para perro y 1:15000 para felino, dejándose incubar a 37°C por dos horas.

La detección de anticuerpos IgG fue revelada agregando a cada pozo 100 µl de solución sustrato/cromógeno (compuesta por 5 ml de citrato de sodio 0.1 M, 5 ml de ácido cítrico 0.1 M, 5 mg de ortofenilendiamina y 4 µl de peróxido de hidrogeno al 30%). Después de 10 a 20 minutos, la reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 1N. Los valores de absorbancia se obtuvieron utilizando un lector de ELISA (Turner Biosystemss, Sunnyvale, California) a 490 nm de longitud de onda, capturando los datos a través del programa Modulus™ Microplate Reader. Para cada ensayo, se incluyeron en cada placa sueros negativos y positivos de cada especie, previamente confirmados por western blot.

El punto de corte se calculó para cada placa mediante el promedio de las absorbancias (OD) de los controles negativos más tres desviaciones estándar de los mismos. Los resultados se expresaron como índice de ELISA (IE), de acuerdo a lo descrito por Silva et al (2002, 2007) con modificaciones, mediante la siguiente formula: $IE = OD \text{ muestra} / OD \text{ punto de corte}$. Las muestras de perros con un IE > a 1.200 se consideraron positivas, mientras que las muestras de felinos se consideraron positivas con un IE > a 1.000. En los casos que se consideró necesario, se confirmó el punto de corte mediante distribución de frecuencias. Se utilizó el programa Excel (Microsoft Office 2003) para determinar las frecuencias de anticuerpos por género, grupos de edad, procedencia, hábitat, entre otros datos. Las diferencias entre las frecuencias de anticuerpos se analizaron por X^2 , empleando los programas JMP 5.0.1 (SAS Institute Inc, USA) y Epi-Info V 7.0 (CDC, Atlanta, GA, USA), considerando significativos los valores $P < 0.05$.

Adicionalmente, para las muestras de perros procedentes del Estado de Guanajuato, se realizó la determinación de anticuerpos IgG contra *Neospora caninum*, para confirmar o descartar antigenicidad cruzada. La evaluación de los sueros se llevó a cabo empleando parcialmente un kit comercial de diagnóstico serológico por ELISA indirecto (CIVTEST BOVIS NEOSPORA, Laboratorios HIPRA). Del kit comercial se tomaron las placas recubiertas con extracto crudo de

N. caninum y el resto de la metodología fue similar a la llevada a cabo para la determinación de anticuerpos contra *T. gondii*. En el cuadro 9 se describen el total de muestras obtenidas para los estudios de serología.

Cuadro 9. Relación de muestras para estudios de serología.

Tipo / Especie	Condición	Procedencia ¹	No. muestras
Animales domésticos Gato (<i>Felis catus</i>)	Callejero	DEFSAL, FMVZ, México DF	1
	Callejero	CEIEPA-DEFSAL, FMVZ, México DF	8
	Feral	ZF, Amacuzac, Morelos	6
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	Casa y callejero	UABJO-CCAO, Oaxaca, Oaxaca	168
	Casa, callejero, feral y de ranchería	CSI-UG-CCAI, 11 municipios, Guanajuato	336
	Callejero	DEFSAL, FMVZ, México DF	10
Fauna silvestre León (<i>Panthera leo</i>) Ocelote (<i>Leopardus pardalis</i>)	Cautiverio	ZF, Amacuzac, Morelos	1
	Cautiverio	ZF, Amacuzac, Morelos	1
Total			531

1. Procedencia: DEFSAL, Departamento de Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio; FMVZ, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; CEIEPA, Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola; ZF, Zoofari; UABJO-CCAO, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca – Centro de Control Canino y Antirrábico de Oaxaca; CSI-UG-CCAI, Campus Salamanca Irapuato – Universidad de Guanajuato – Centro de Control Canino y Antirrábico de Irapuato.

5.4.2 Anatomopatología

De los animales del estudio prospectivo seropositivos a *T. gondii* que fueron eutanasiados, se les realizó el estudio sistemático de necropsia con base en lo descrito por Aluja y Constantino (2002), King et al. (2005) y Cedillo-Peláez (2009), recolectándose muestras representativas de diferentes órganos incluyendo corazón, pulmón, hígado, bazo, linfonodo mesentérico y encéfalo, incluyendo corteza e hipocampo, tálamo, mesencéfalo y cerebelo.

En los casos en que fue posible, se intentó el aislamiento *in vivo*, mediante la recolección aséptica de muestras de tejido en envases de vidrio estériles. Las secciones de encéfalo, se depositaron por separado de las de los órganos de cavidades. Los tejidos se conservaron en a 4°C hasta su remisión al LIE, en un lapso no mayor de 48 horas. Para las técnicas de biología molecular, se tomaron fracciones de tejidos depositándose en bolsas o envases de plástico mismas que se mantuvieron a 4°C hasta su remisión y posterior procesamiento. Para histopatología (HP) e inmunohistoquímica (IHQ), secciones similares de tejido, se fijaron por inmersión en formalina amortiguada al 10% por un lapso mínimo de 24 horas. Una vez fijados los tejidos, se procesaron con la técnica de rutina para HP, con base en lo descrito por Heffess y Mullick (1995), en el Laboratorio de Patología Molecular (LPM, Departamento de Anatomía Patológica) del INP.

De los diferentes tejidos fijados, se cortaron secciones representativas de 0.3 a 0.5 cm de grosor, depositándose en casetes de plástico, incluyéndose en un procesador automático de tejidos (Histoquinete, Leica). Los tejidos se deshidrataron con serie ascendente de etanoles (80, 95 y 100%), alcohol absoluto-xileno (relación 1:1) y posteriormente se depositaron en dos cambios xilol y uno final en parafina. Después de la primera exposición en parafina, los tejidos se retiraron del casete y se incluyeron en el fondo de un molde metálico o en el mismo casete y se embebieron en parafina líquida, dejando solidificar a 4°C, por 15 a 40 minutos. Una vez solidificada la parafina, se cortaron secciones de 5 a 7 µm de grosor con un micrótopo estándar (Leica). Los cortes se extendieron en baño de flotación, se recuperaron y montaron en portaobjetos convencionales y se colocaron en platina caliente (37 a 40°C) para su desparafinación. Finalmente los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE), para su posterior revisión por microscopía óptica convencional.

Para la identificación específica y morfológica de taquizoítos, pseudoquistes o quistes tisulares de *T. gondii* en los tejidos afectados, se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica con el método de detección complejo peroxidasa, con

base en lo referido por Lindsay y Dubey (1989), Heffess y Mullick (1995), Ramos-Vara (2005) y Cedillo-Peláez (2009).

Como testigo positivo se empleó una sección de pulmón de mono ardilla (*Saimiri* sp), en cuyo tejido se identificaron previamente taquizoítos de *T. gondii* con una técnica similar. Como testigo negativo se empleó una sección del mismo pulmón, sustituyendo el anticuerpo primario por amortiguador PBS o agua destilada. De cada tejido a evaluar, se realizaron de 2 a 3 cortes seriados de 5 µm de grosor con un micrótopo estándar. Los cortes se colocaron en laminillas electrocargadas (ProbeOn Plus, Fisher Scientific, USA, Cat. 22-230-900 o Kling-On Hier Slides, Biocare Medical, USA, Ref. SFH1103A) y posteriormente se desparafinaron con calor seguido de dos lavados de xilol. Los residuos de xilol se eliminaron con tres cambios de alcohol absoluto, se inhibió la peroxidasa de las secciones de tejido con peróxido de hidrógeno al 30% en metanol absoluto (relación 1:8). Los tejidos se rehidrataron con serie descendente de etanoles (96, 80 y 70%) y agua destilada por tres minutos cada tiempo.

Para la recuperación antigénica los tejidos se trataron con pronasa (Sigma-Aldrich) al 1.0% por 10 minutos a 37°C, lavándose con agua destilada y solución amortiguadora PBS (pH 7.6, 0.05 M). Se bloquearon la avidina y biotina endógenas con soluciones comerciales (Zymed, Cat.: 95-6543B) aplicando 20 µl de solución a cada tejido, dejando incubar en cámara húmeda a 37°C por 15 minutos. De igual forma, se bloquearon los sitios de adherencia inespecífica de los anticuerpos 1^{ro} y 2^{ro} con suero de conejo no inmune (Sigma-Aldrich) al 5%, aplicando 50 µl de solución para cada corte de tejido, incubando en cámara húmeda a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, se utilizó como anticuerpo 1^{ro}, un suero de cabra positiva a *T. gondii* probado previamente por ELISA indirecto y comparándose a la par con un antisuero policlonal comercial anti-*Toxoplasma gondii* de origen caprino (VMRD Cat.210-70-TOXO), y como anticuerpo 2^{ro}, se empleó un conjugado comercial anti-IgG caprino acoplado a peroxidasa (Sigma-Aldrich). De cada anticuerpo se aplicaron 50µl, incubando en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos. Transcurrido cada tiempo se lavaran con PBS por 5 minutos.

Para determinar la presencia o ausencia de antígeno en los tejidos, a cada corte se agregó solución comercial de revelado compuesta por cromógeno (aminoetilcarbazol) (3B, AEC chromogen solution, Zymed 95-6143), solución amortiguadora de la reacción (3A, AEC substrate buffer, Zymed 95-6143) y peróxido de hidrógeno (3C, AEC substrate solution, Zymed 95-6143) al 0.6%, mezclando una gota de cada reactivo en un ml de agua destilada. Una vez preparada la solución reveladora, se aplicaron 50 µl en cada sección de tejido, observando la reacción del colorante por microscopía óptica (de 2 a 3 minutos) hasta que viró, y se detuvo la reacción colocando la laminilla en agua destilada. Los cortes se contrastaron con hematoxilina de Meyer aplicando 50 µl en cada corte por 4 minutos, se lavaron con agua destilada y posteriormente con PBS, cubriéndose con cubreobjetos convencionales.

Para la evaluación microscópica de los tejidos, clasificar las lesiones de acuerdo a su curso, así como identificar el tipo de estadio de *T. gondii* involucrado, tanto del estudio retrospectivo como prospectivo, los cortes histológicos se revisaron por triplicado (todos los cortes histológicos de cada caso), con base en lo descrito por Dietz et al., 1997; Juan-Salles et al., 1997; Epiphany et al., 2000; Dubey et al., 2002b; Miller et al., 2004; Spencer et al., 2004; Lindsay et al., 2005; Basso et al., 2007; McGavin y Zachary, 2007; Thomas et al., 2007; Dubey et al., 2008d; Cedillo-Peláez, 2009 y Dubey, 2010.

Una vez revisados los casos microscópicamente, se clasificaron con base en: 1) el tipo de presentación (aguda, crónica, reinfección, coinfección, congénita) y 2) la distribución de lesiones (diseminada, intestinal, neurológica, miocárdica). Los casos que no presentaron lesiones asociadas a alguna de las presentaciones y cuya historia clínica no refería antecedentes de enfermedad, se clasificaron como casos asintomáticos.

Las laminillas de HP e IHQ se revisaron en un microscopio óptico Zeiss Axiostar plus, documentándose representativamente las zonas evaluadas de cada corte con una cámara digital (Stylus Tough 8000, Olympus) adaptada al equipo.

En el cuadro 10, se describen los casos de archivo postmortem recuperados para el presente estudio, diagnosticados como toxoplasmosis, provenientes de tres Laboratorios de Patología Veterinaria (DGZVS; ZG; DP-FMVZ, UNAM). Los casos de fauna silvestre se habían estudiado y corroborado en un estudio previo (Cedillo-Peláez, 2009). De cada caso, se registraron los datos del animal estudiado incluyendo nombre común y científico, género, edad, material recuperado (secciones histológicas, tejido fijado y bloques de parafina), lugar de procedencia, historia clínica y la fecha (año) en que se realizó el estudio postmortem. Conforme se recuperaba cada caso, estos se fueron numerando consecutivamente (#1, 2, 3, etc.) para su identificación y evitar que las muestras se confundieran, debido a que varios casos correspondían a la misma especie.

Cuadro 10. Relación de casos clínicos de archivo del estudio retrospectivo.

Tipo / Especie	Procedencia ¹	Casos ²		Año mortalidad
		N	#	
Animales domésticos				
Gato (<i>F. catus</i>)	DP-FMVZ, México DF	1	1	2007
Ovino (<i>Ovis aries</i>)	DP-FMVZ, México DF	1	2	2010
Fauna silvestre				
Canguro rojo (<i>M. rufus</i>)	ZG, Guadalajara, Jalisco	7	3-9	2007
Canguro gris (<i>M.s giganteus</i>)	DGZVS, México DF	2	10,11	1999 y 2008
Wallaby de Bennet (<i>M. rufogriseus</i>)	DGZVS, México DF	3	12,16,18	2002, 2003
Wallaby de Tammar (<i>M. eugenii</i>)	DGZVS, México DF	1	14	2008
Wallaby (<i>Macropus</i> spp)	DGZVS, México DF	5	13,15,17, 19,20	2000, 2001 (2), 2005, 2007, 2008
Mono ardilla (<i>S. scireus</i>)	DP-FMVZ, México DF	2	21,22	2006
	ZG, Guadalajara, Jalisco	3	23-25	2000, 2006
Mono zaraguato (<i>Alouatta</i> spp)	ZG, Guadalajara, Jalisco	1	26	2000
Lemur de cola anillada (<i>L. lemur</i>)	ZG, Guadalajara, Jalisco	2	27, 28	2008
León africano (<i>P. leo</i>)	DGZVS, México DF	1	29	2008
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	DGZVS, México DF	1	30	2008
Ocelote (<i>L. pardalis</i>)	DGZVS, México DF	1	31	2008
Oso negro americano (<i>U. americanus</i>)	DGZVS, México DF	1	32	2008
Delfín común (<i>T. truncatus</i>)	DP-FMVZ, México DF	1	33	2003
Total		33	---	1999-2010

1. Procedencia: DP-FMVZ, Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; ZG, Zoológico de Guadalajara; DGZVS, Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre.

2. Casos: n, número de casos de la especie; #, número asignado a cada caso.

Los casos obtenidos del estudio prospectivo, se presentan en el cuadro 11, registrando los datos de cada animal así como asignando su número de identificación, de forma similar a las muestras del estudio retrospectivo.

Cuadro 11. Relación de muestras para estudios de anatomopatología y biología molecular.

Tipo / Especie	Condición	Procedencia ¹	Casos ²		Muestras
			n	#	
Animales domésticos					
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	Casa y callejero	UABJO-CCAO, Oaxaca, Oaxaca	10	37-46	Tejidos
	Casa, callejero, feral y ranchería	CSI-UG CCAI, 11 municipios, Guanajuato	22	47-68	Tejidos
Gato (<i>Felis catus</i>)	Callejero	CEIEPA-DEFSAL, FMVZ, México DF	8	69-76	Sangre y tejidos
	Feral	ZF, Amacuzac, Morelos	1	36	Sangre
Fauna silvestre					
León (<i>Panthera leo</i>)	Cautiverio	ZF, Amacuzac, Morelos	1	34	Sangre
Ocelote (<i>L. pardalis</i>)	Cautiverio	ZF, Amacuzac, Morelos	1	35	Sangre
Total			43	---	---

1. Procedencia: UABJO-CCAO, Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca – Centro de Control Canino y Antirrábico de Oaxaca; CSI-UG-CCAI, Campus Salamanca Irapuato – Universidad de Guanajuato – Centro de Control Canino y Antirrábico de Irapuato; CEIEPA, Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, DEFSAL, Departamento de Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio; FMVZ, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; ZF, Zoofari.

2. Casos: n, número de casos de la especie; #, número asignado a cada caso.

5.4.3 Aislamiento *in vivo*

Para el bioensayo, se llevó a cabo la metodología descrita por Dubey (2010) con modificaciones, empleando ratones BALB/c adultos, de 20 a 25 g de peso, manteniéndose previo y posterior a su inoculación en cajas separadas por caso clínico, con administración de agua y alimento *ad libitum*, el manejo se basó en el manual de ética y manejo de animales de laboratorio del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del INP y del Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales de Experimentación (SICUAE) de la FMVZ, UNAM.

De cada caso, se inocularon intraperitonealmente de uno a dos ratones con 10 a 20 mg de diferentes tejidos, los cuales se maceraron y resuspendieron en 1.0 ml de PBS (pH 7.2, 0.01M) estéril, tomándose de cada tejido 200 µl de la suspensión como volumen final de inoculación. Posteriormente, a los días 7, 14 y 20, se lavó el peritoneo de cada ratón con 3.0 ml solución de PBS estéril, recuperando después 50 µl del exudado. Dicho material se empleó para determinar la presencia, cantidad, viabilidad y pureza de taquizoítos, mediante microscopía óptica convencional utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad de los taquizoítos se determinó tiñéndolos con azul de tripano al 0.4%. Los animales que murieron postinoculación, se revisaron postmortem para la detección de taquizoítos o quistes tisulares (bradizoítos), mediante impresiones en portaobjetos de secciones de pulmón, hígado y encéfalo, considerándose como animales positivos aquellos donde se evidenciara la presencia de estructuras parasitarias en cualquiera de los dos estadios infectantes. Los animales que sobrevivieron, se eutanasiaron a los 4 meses postinoculación, estudiándose bajo la metodología antes referida.

5.4.4 Biología molecular

Para la extracción de DNA de muestras del estudio retrospectivo, prospectivo, de los aislamientos realizados en el LIE y de las cepas de referencia, se llevó a cabo la metodología descrita por Rico-Torres (2005) para taquizoítos (cepas de referencia y aislamientos), o de Gillis (2003) y Cedillo-Peláez (2009) para tejidos refrigerados/congelados y fijados en formalina amortiguada al 10%, empleando un kit comercial (Gentra-QIAGEN). Así mismo, se estandarizaron los protocolos para extracción de DNA para muestras en bloque de parafina con base en lo descrito por Hyman et al. (1995), Fan y Gulley (2001), Cao et al. (2003) y Coura et al. (2005) con modificaciones; y de sangre con anticoagulante con discretas modificaciones, según las instrucciones del kit comercial (Gentra-QIAGEN).

- **Tejidos refrigerados/congelados:** De los órganos recolectados durante el estudio postmortem, se cortaron 200 mg de cada tejido, se maceraron en mortero con 1300 µl de solución comercial de lisis celular (Gentra-QIAGEN, cat. 158908) y posteriormente el tejido macerado se transfirió a microtubo de 1.5 ml. Se calentó en termoblock (Boekel Scientific) por una hora a 65°C y transcurrido el tiempo se agregaron 15 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma, cat. 39450-01-6), dejándose incubar a 55°C por toda la noche. Una vez lisado el tejido, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se transfirió el contenido a un tubo tipo Corning de 15 ml, agregando 1 ml de solución comercial de precipitación de proteínas (Gentra-QIAGEN, cat. 158912), se mezcló en vortex y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se recuperó el líquido sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo de 15 ml. Para la precipitación de DNA se agregaron 2 ml de isopropanol (Sigma, cat. I9516-500ML) y se mezcló generosamente por inversión 20 veces. El tubo se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, se eliminó la solución por decantación y se agregaron 2 ml de etanol (Sigma, cat. E7023-500ML) frío al 70%, se mezcló en vortex y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Se decantó el etanol y el tubo se invirtió dejándolo secar sobre papel absorbente por un lapso de 30 a 40 minutos. Una vez evaporado el etanol, el botón de material formado en el fondo del tubo se hidrató con 100 µl de solución de hidratación comercial (Gentra-QIAGEN, cat. 158916), transfiriendo posteriormente el DNA hidratado a microtubo de 1.5 ml, almacenándose a -20°C hasta su empleo.
- **Tejidos en formalina amortiguada al 10% y en bloque de parafina:** Para los tejidos en fijación, de cada órgano se cortaron 200 mg de tejido, se maceraron en mortero con 1 ml de solución PBS y después el material se transfirió a un microtubo de 1.5 ml para lavarse con la misma solución repetidamente (5 lavados con 1 ml de solución PBS en cada lavado) para eliminar los residuos de fijador. Posteriormente el tejido se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se eliminó la solución PBS y se agregó 1300 µl de

solución comercial de lisis celular. El tejido se calentó en termoblock por una hora a 65°C y transcurrido el tiempo se agregó 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml), dejándose incubar a 55°C durante toda la noche. En el caso de los tejidos embebidos en bloque de parafina, con una hoja de bisturí caliente se cortaron los fragmentos seleccionados hasta obtener de 50 a 70 mg de tejido, después se lavaron repetidamente con una mezcla de xilo/etanol a una relación 2:1 (4 lavados con 1 ml de la solución en cada lavado) mezclando en vortex y centrifugando a 4000 rpm por 10 min, llevando a cabo un último lavado con etanol bajo las mismas condiciones. Una vez centrifugada la muestra, se decantó el etanol, el tejido se dejó secar por 20 minutos y se hidrato con 1 ml de PBS por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se eliminó el PBS por centrifugación (3000 rpm por 5 minutos) y el tejido se resuspendió en 1300 µl de solución comercial de lisis celular, calentándose en termoblock por una hora a 65°C y transcurrido el tiempo se agregó 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml), dejándose incubar a 55°C durante toda la noche. Una vez lisado el tejido de ambos procedimientos, se calentó el microtubo a 95°C por 10 minutos para inactivación de la proteinasa K y reactivación antigénica, dejándose enfriar a temperatura ambiente. El resto del proceso fue similar al llevado a cabo en tejidos refrigerados/congelados, siendo la otra modificación del protocolo, mantener a -20°C por 48 horas las muestras mezcladas con isopropanol para mejorar la precipitación del DNA.

- **Taquizoítos de cepas de referencia y aislamientos:** Se procesaron de uno a doce millones de taquizoítos dependiendo de la disponibilidad obtenida en lavados peritoneales. Los taquizoítos contenidos en PBS fueron centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, eliminando el sobrenadante y el material se resuspendió con 1300 µl de solución comercial de lisis celular. Posteriormente los taquizoítos resuspendidos se transfirieron a un tubo de 1.5 ml, se calentaron en termoblock por una hora

a 65°C y se continuo su procesamiento de forma similar a los tejidos refrigerados/congelados.

- **Muestras de sangre con anticoagulante:** Se procesaron de uno a cuatro ml de sangre, transfiriendo la muestra a un tubo cónico de 15 ml y se agregó solución comercial de lisis de glóbulos rojos (Gentra-QIAGEN, cat. 158904) en relación de 1:3 (sangre: solución), mezclando generosamente por inversión cinco veces y dejando incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se mezclo en vortex y se centrifugo la muestra a 4000 rpm por 10 minutos, se descarto el líquido sobrenadante y se repitio el procedimiento (ya sin incubar) de tres a cuatro veces hasta eliminar el total de eritrocitos de la muestra, agregando a la primera repetición cinco ml de la solución precipitadora, posteriormente tres y en las ultimas repeticiones un ml. Así mismo, entre cada repetición, se eliminó con micropipeta el anillo de residuos (eritrocitos, fibrina y proteínas) que se formo alrededor y por encima del botón de leucocitos, al final de cada paso de centrifugación. Al final de las repeticiones y quedando solo el botón de leucocitos, se agregaron 1300 µl de solución comercial de lisis celular, se resuspendió el boton y posteriormente se transfirió a un microtubo de 1.5 ml, calentando la muestra en termoblock por una hora a 65°C y se continuo su procesamiento de forma similar a los tejidos refrigerados/congelados.

Una vez extraído el DNA, se cuantificó y determino su pureza por espectrofotometría (Nanodrop), determinando las longitudes de onda a 260 nm (absorbancia para ácidos nucleicos) y 280 nm (absorbancia para proteínas). La pureza del DNA extraído se calculó con base en la siguiente fórmula: pureza de DNA= $OD_{260}:OD_{280}$. El radio de pureza de DNA se estableció entre 1.7 a 2.0, valores por debajo de 1.7 se consideraron como contaminación con proteínas, mientras que valores por encima de 2.0 se consideraron como contaminación por RNA.

Para la detección de *T. gondii*, las muestras se evaluaron por PCR en punto final (PCR en un tiempo o reamplificación), para los genes B1, SAG2, SAG3, GRA6 y BTUB, empleando la metodología descrita por Rico-Torres (2005), Su et al., (2006) y Cedillo-Peláez (2009). Los iniciadores empleados se sintetizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (LBM-IFC) de la UNAM.

Primeramente, las muestras se evaluaron mediante una PCR semianidada, empleando los iniciadores TM1, TM2 y TM3 (Cuadro 12), del gen B1, los cuales amplifican una región de 619 y 362 pb respectivamente.

Cuadro 12. Iniciadores empleados para amplificación del gen B1 mediante PCR semianidada.

Cromosoma	Iniciador	Producto de PCR	Referencia
IX	TM1: 5'-GAGAGGTCCGCCCCACAAG	619 pb	Rico-Torres, 2005
	TM2: 5'-CTGCTGGTGCACGGGAGTG		
	TM2: 5'-CTGCTGGTGCACGGGAGTG	362 pb	
	TM3: 5'-CAGGAGTTGGATTTGTAGA		

Posteriormente, las muestras se analizaron con una segunda ronda de PCR utilizando marcadores para los genes SAG2, SAG3, GRA6 y BTUB, con base en lo descrito en la literatura para cada gen (Su et al., 2006, 2010). En los casos donde se obtuvieron bandas claras y definidas después de los ensayos de PCR, se llevó a cabo su digestión con las enzimas correspondientes para cada marcador (PCR-RFLP). Los productos de PCR de cada gen y de PCR-RFLP se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 y 3.5%, respectivamente, revelados con bromuro de etidio en cámara de electroforesis horizontal, observándose en un transiluminador UV y obteniéndose imagen digital con equipo comercial.

En el cuadro 13 se describen los iniciadores empleados para los ensayos de PCR-RFLP, el tamaño del producto de amplificación y las enzimas de restricción para la digestión de cada marcador. Como control positivo de *T. gondii* se empleó diluciones de DNA de las cepas de referencia RH, Me49, VEG y Wlk. Como controles negativos se utilizó agua desionizada.

Cuadro 13. Iniciadores empleados para PCR punto final y genotipificación por PCR-RFLP.

Marcador	Iniciadores	Tamaño (pb)	Enzimas de restricción	Referencia
SAG2	SAG2-Fa: ACCCATCTGCGAAGAA AACG SAG2-Ra: ATTTGACCCAGCGGGAGCAC	546	<i>Hinf</i> I, <i>Taq</i> I	Su et al., 2000
SAG3	P43SS1: CAACTCTCACCATTCCACCCC P43AS1: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	311	<i>Nci</i> I	Grigg et al., 2001
GRA6	GRA6-F1: TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6-R1x: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	<i>Mse</i> I	Su et al., 2000
BTUB	Btb-F: GAGGTCATCTCGGACGAACA Btb-R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	<i>Bs</i> IE I, <i>Taq</i> I	Khan et al., 2005

Se consideró como muestra positiva por PCR, aquel tejido del que amplificaran bandas definidas o tenues en el peso esperado, para uno o más loci; como caso positivo, se consideró la amplificación de por lo menos un tejido, con cualquiera de los genes evaluados (Cedillo-Peláez, 2009).

En los casos donde se observaron bandas claras y definidas, se procedió a la genotipificación por PCR-RFLP (Su et al., 2006, 2010). Así mismo, cuando fue posible obtener abundante cantidad de DNA, se remitieron para secuenciación, amplicones de regiones extensas (region codificante) de los genes GRA6 y GRA7, que permitieran la amplificación de regiones polimórficas, con cambios suficientes para diferenciar genotipos clonales de cepas recombinantes o atípicas (no clonales).

Para el gen GRA6, se usaron los iniciadores descritos por Fazaeli et al. (2000), que amplifican un producto de 773 pb. Así mismo, también se utilizó el iniciador sentido descrito por Sundar et al. (2008), que en combinación con el antisentido del primer juego, genera un producto de 546 pb, amplificando un producto alterno de los dos últimos tercios del gen, donde se encuentra la mayor cantidad de polimorfismos entre las diferentes cepas de *T. gondii*. Para el gen GRA7, se utilizaron los iniciadores descritos por Dubey et al. (2011), los cuales permiten amplificar un producto de 806 pb de la región codificante. Los iniciadores empleados se sintetizaron comercialmente en el LBM-IFC de la UNAM.

Una vez obtenidos y seleccionados los productos de PCR, estos se remitieron para su purificación y secuenciación comercial a la empresa McLab (San Francisco, CA, EU; <http://www.mclab.com>), empleando un secuenciador ABI-3739XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, EU).

5.5 Bioinformática

5.5.1 Banco de información de genotipos de *T. gondii*

Para comparar la diversidad genética de *T. gondii* a partir de los genotipos determinados en el presente trabajo de investigación, se revisó la literatura en los sistemas de información electrónicos de libre acceso Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) y Redalyc (<http://www.redalyc.org/>), particularizando en los genotipos de *T. gondii* descritos en las especies animales correspondientes a las de las muestras analizadas en el presente trabajo de investigación. Adicionalmente, se consultaron artículos científicos, incluyendo publicaciones con diferentes métodos de genotipificación (PCR-RFLP, microsatélites, secuenciación, etc), indistintamente del tipo y cantidad de marcadores genéticos empleados, del país en el que se llevó a cabo o el tipo de clasificación adoptada (# genotipo, haplogrupos, etc.).

5.5.2 Banco de información de secuencias de *T. gondii*

Para la comparación de los resultados de las muestras remitidas a secuenciar para los genes GRA6 y GRA7, se llevó a cabo la búsqueda bioinformática de las secuencias de nucleótidos de dichos genes, descritos en la literatura. Primeramente, se revisaron los bancos de información Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) y ToxoDB versión 8.2 (www.toxodb.org/) para la búsqueda de secuencias de nucleótidos de genotipos clásicos, recombinantes y atípicos, completas o parciales que incluyeran las regiones codificantes, excluyendo las secuencias de intrones o las secuencias parciales que tuvieran menos del 50% de la región codificante.

Las secuencias descritas en ToxoDB correspondieron a las secuencias completas de cada gen (incluyendo las regiones codificantes) para tres cepas representativas de los genotipos predominantes (clonales): GT1, genotipo I; Me49, genotipo II y VEG, genotipo III. En Nucleotide, predominaron las secuencias de las regiones codificantes de los diferentes genes, incluyendo secuencias de genotipos predominantes, recombinantes y atípicos. Una vez seleccionados los genes blanco, las secuencias se descargaron en formato FASTA y se analizaron por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar el porcentaje de similitud, refinar la búsqueda de secuencias representativas de cada gen y comparar la similitud con otros parásitos Apicomplexa como *Neospora* spp y *Sarcocystis* spp, entre otros.

5.5.3 Comparación de secuencias

Una vez que los amplificados de PCR de los genes GRA6 y GRA7 se secuenciaron comercialmente, estos se descargaron electrónicamente de la página de la empresa, tanto los cromatogramas como las secuencias en formato FASTA (<http://www.mclab.com/home.php>). Los cromatogramas se revisaron y analizaron usando el programa Finch TV v. 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/ftvdlinfo.html>), mientras que las secuencias en formato FASTA se compararon con

las almacenadas en el banco de información creado, empleando los programas Clustal W y MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Posterior a una primera comparación, las secuencias de nucleótidos se editaron, se determinaron secuencias consenso con base en los genotipos predominantes y finalmente se realizó una última alineación y comparación. Para determinar la ubicación de las secuencias de estudio con los genotipos y haplogrupos descritos en la literatura científica, se generaron árboles filogenéticos utilizando las aplicaciones de los mismos programas empleados.

6.0 RESULTADOS

6.1 Serología (estudio prospectivo)

6.1.1 Serología en felinos domésticos y silvestres

De las 15 muestras de suero de gatos callejeros y ferales, se detectaron anticuerpos IgG contra *T. gondii* en 11 animales (73.3%); uno de DEFSAL-FMVZ, cinco de CEIEPA y seis de ZF. Así mismo, los dos felinos silvestres (león y ocelote) de ZF, también resultaron positivos.

6.1.2 Serología en caninos

Se analizó un total de 514 muestras de perros de diferentes entidades federativas, resumiéndose las frecuencias globales en el cuadro 14.

Los estados donde se recolectó la mayor cantidad de muestras de esta especie correspondieron a Oaxaca y Guanajuato. Las muestras del DF no fueron suficientes para considerarlas representativas de una población. Sin embargo se tomaron en cuenta los resultados para fines de comparación de datos y como muestras control para los ensayos serológicos.

Cuadro 14. Detección de anticuerpos contra *T. gondii* en muestras de suero de caninos de tres estados de la República Mexicana

Procedencia ¹	Condición	Cantidad de muestras	Positivos	
			n	%
UABJO-CCAO, Oaxaca, Oaxaca	Casa y callejero	168	99	58.9
CSI-UG-CCAI, 11 municipios, Guanajuato	Casa, callejero, feral y de ranchería	336	109	32.4
DEFSAL, FMVZ, México DF	Callejero	10	7	70.0
Total		514	215	41.8

1. Procedencia: UABJO-CCAO, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca – Centro de Control Canino y Antirrábico de Oaxaca; CSI-UG-CCAI, Campus Salamanca Irapuato – Universidad de Guanajuato – Centro de Control Canino y Antirrábico de Irapuato; DEFSAL, FMVZ, Departamento de Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Del estado de Oaxaca se analizaron en un principio 168 muestras, resultando 99 (58.9%) positivas a la detección de anticuerpos contra *T. gondii*. Sin embargo, solamente de 154 animales se tenían sus datos biométricos, los cuales fueron tomados en cuenta para la comparación de las frecuencias por género y estrato de edad, sin observarse diferencia estadística. Conforme aumentaba la edad, la frecuencia se incrementó hasta el 84.0% (grupo de animales mayores de 7 años), siendo mayor que la frecuencia general (61.7%) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en perros del Estado de Oaxaca, por género y estrato de edad

Grupo	Total de animales	Seropositivos	
		N	%
Genero			
Macho	65	45	69.2
Hembra	89	50	56.2
Edad (años)			
<1	20	4	20.0
1-2	7	4	57.1
2-5	71	46	64.8
5-7	31	20	64.5
>7	25	21	84.0
Total	154	95	61.7

Del estado de Guanajuato, se estudiaron un total de 336 animales procedentes de 11 municipios diferentes. Sin embargo, se descartaron 84 animales por no contar con alguno de los datos biométricos o por no tener suficiente cantidad de muestra para continuar con los ensayos serológicos de *N. caninum*. Una vez depuradas las muestras, 252 fueron estudiadas para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*, determinándose 73 (29.0%) animales positivos al ensayo. De este mismo lote de animales, 74 resultaron positivos para *T. gondii* (29.4%), 52 (20.6%) tuvieron anticuerpos para ambos parásitos.

De los 252 animales estudiados por medio de ambos ensayos, se analizaron los resultados por género, estrato de edad, ambiente, raza, hábitat, convivencia y municipio de procedencia, resumiéndose las frecuencias en los cuadros 16, 17 y 18.

Por género y edad, no se observó diferencia estadística (Cuadro 16). Sin embargo, al comparar las medias de los IE del rubro de raza (raza vs criollo), se apreció diferencia estadística significativa para *T. gondii*, *N. caninum* y para ambos parásitos. Para el rubro de ambiente (urbano vs rural), solo se observó diferencia significativa para ambos parásitos; mientras que para el hábitat (exterior vs interior) y convivencia con otros animales (no convivencia vs convivencia con perros y gatos), sólo se observó diferencia significativa para *T. gondii* (Cuadro 17).

Cuando se compararon las frecuencias por municipio, se determinó la mayor frecuencia de anticuerpos para *T. gondii* en Celaya, seguido de Guanajuato y San Miguel Allende; para *N. caninum*, se determinaron las mayores frecuencias en San Miguel Allende, Irapuato y León (Cuadro 18). No se observó diferencia estadística entre municipios, para ambos parásitos.

Cuadro 16. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* y *N. caninum* en perros del Estado de Guanajuato, por género y estratos de edad.

Grupo	Total de animales	Positivos a <i>T. gondii</i>		Positivos a <i>N. caninum</i>		Positivos a ambos parásitos	
		n	%	n	%	n	%
Genero							
Machos	113	31	27.4	32	28.3	23	20.4
Hembras	139	43	30.9	41	29.5	29	20.9
Edad (meses)							
3 a 12	36	13	36.1	12	33.3	9	25.0
13 a 24	62	17	27.4	15	24.2	13	20.9
25 a 36	47	11	23.4	10	21.3	7	14.9
37 a 48	36	9	25.0	13	36.1	6	16.6
49 a 60	16	7	43.7	8	50.0	6	37.5
> 60	55	17	30.9	15	27.3	11	20.0
Total	252	74	29.4	73	29.0	52	20.6

Cuadro 17. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* y *N. caninum* en perros del Estado de Guanajuato, con relación al ambiente, raza, habitat y convivencia con otros animales.

Grupo	Total de animales	Positivos a <i>T. gondii</i>		Positivos a <i>N. caninum</i>		Positivos a ambos parásitos		
		n	%	n	%	n	%	
Ambiente								
Urbano	191	61	31.9	60	31.4	45	23.6*	
Rural	61	13	21.3	13	21.3	7	11.5	
Raza								
Pura	125	50	40.0*	49	39.2*	37	29.6*	
Mixta	127	24	18.9	24	18.9	15	11.8	
Habitat ¹								
Exterior	178	44	24.7	47	26.4	32	18.0	
Interior	74	30	40.5	26	35.1	20	27.0	
Convivencia ²								
CPG	219	59	26.9	61	27.9	41	18.7	
NCPG	33	15	45.5	12	36.4	11	33.3	

1. Habitat: condición donde se encontraban los animales la mayor parte del tiempo.

2. Convivencia con perros y gatos, CPG; no convivencia con perros y gatos, NCPG.

* $P < 0.05$, significancia estadística.

Cuadro 18. Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* y *N. caninum* en perros del Estado de Guanajuato, con relación al municipio.

Municipio	Total de animales	Positivos a <i>T. gondii</i>		Positivos a <i>N. caninum</i>		Positivos a ambos parásitos	
		n	%	n	%	N	%
Celaya	44	16	36.3	13	29.5	11	25.0
Cueramaro	10	2	20.0	2	20.0	1	10.0
Guanajuato	16	5	31.2	4	25.0	2	12.5
Irapuato	84	23	27.4	29	34.5	20	23.8
Juventino R*	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
León	31	7	22.6	10	32.2	6	19.3
SM Allende	9	3	33.3	4	44.4	2	22.2
Salamanca	55	8	14.5	12	21.8	6	10.9
Total	252	74	29.4	73	29.0	52	20.6

*Juventino R: las muestras del municipio de Juventino Rosas no se consideraron para el análisis estadístico por ser discreta la población.

6.2 Anatomopatología (estudios prospectivo y retroprospectivo)

6.2.1 Estudios postmortem de gatos y perros (estudio prospectivo)

Se realizó el estudio de necropsia a los ocho gatos provenientes del CEIEPA y 22 perros del CSI-UG, sin observarse lesiones sugerentes de infección aguda o crónica por *T. gondii*. Por otra parte, los diez caninos del Estado de Oaxaca, al provenir del Centro de Control Canino, no fue posible realizar el estudio de necropsia completo, por lo que posterior a su eutanasia, se llevo cabo una incisión por línea media y se revisaron los órganos de las cavidades torácica y abdominal, sin observarse alteraciones de alguna enfermedad en particular.

6.2.2 Estudios postmortem de fauna silvestre (estudio retrospectivo)

Al revisar los casos de archivo de los diferentes Laboratorios de Patología, 12 casos contaban con un expediente completo, informe de necropsia y material fotográfico, por lo que se pudieron evaluar macroscópicamente. Para siete de los casos, las historias clínicas y los resultados de la necropsia definieron como causa de muerte otros diagnósticos diferentes a toxoplasmosis. Los diagnósticos fueron: insuficiencia renal (león africano y oso negro), leucemia (jaguar y ocelote), enterocolitis bacteriana (canguro gris y wallaby de Tammar) y ataque por congéneres (wallaby de Bennet). En los tres casos de marsupiales australianos, se referían historias clínicas de animales con signos nerviosos, depresión y anorexia, con evolución de 15 a 18 días, muriendo en el albergue. A la necropsia, el principal hallazgo que coincidió en los tres animales, fue la presencia en encéfalo de puntos multifocales de color rojo oscuro, tanto en sustancia gris como blanca y cambios congestivos con extensión a las meninges. Dos monos ardilla presentaron historia clínica de depresión, dificultad para respirar y muerte súbita con una evolución de cuatro días. A la necropsia, ambos animales tenían pelo hirsuto, emaciación, cavidad oral con líquido espumoso; al incidir las cavidades, las principales alteraciones fueron lóbulos pulmonares con edema severo, así como hepato, espleno y linfadenomegalia severas.

6.2.3 Evaluación microscopía y tipos de presentación de toxoplasmosis en animales domésticos y silvestres (estudios prospectivo y retrospectivo)

Todos los casos (73 en total), tanto los de fauna silvestre (31 casos) como de animales domésticos de ambos estudios (42 casos), se evaluaron bajo los mismos criterios y con la misma metodología, los cuales algunos presentaron diferente conjunto de lesiones, definiendo distintos patrones de enfermedad por la infección de *T. gondii*. En algunos casos, la infección se confirmó por IHQ (25 casos con tejidos inmunopositivos, 23 de fauna silvestre y dos de animales domésticos). Así mismo, se presentó un grupo de animales que no tuvieron lesiones asociadas ni presencia de estructuras parasitarias morfológicamente (47 casos, 40 de animales domésticos y siete de fauna silvestre) (Figura 6).

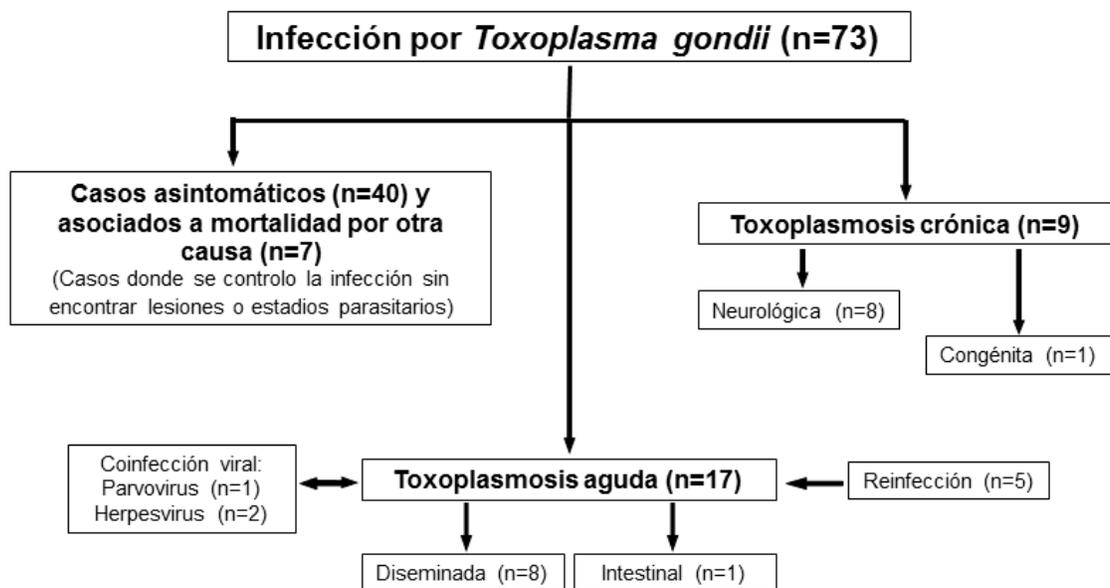


Figura 6. Presentaciones de toxoplasmosis y variantes determinadas en el presente trabajo de investigación. En negritas se describen las presentaciones principales (casos asintomáticos, toxoplasmosis aguda y crónica) y en el resto de los recuadros las presentaciones particulares de cada grupo. Entre paréntesis se indica el número de casos para cada presentación.

Las diferentes presentaciones clínico-patológicas, sus variantes y las lesiones representativas se describen a continuación.

- **Toxoplasmosis aguda diseminada.** Esta presentación se observó en primates del nuevo mundo, lémures y marsupiales australianos (canguros rojos), caracterizándose por la presencia de lesiones necróticas (indicativas de la replicación constante de taquizoítos) de moderadas a severas en órganos tubulares (estómago e intestino) y parenquimatosos (hígado, bazo, linfonodos y pulmón, principalmente), con presencia de estructuras parasitarias intra y extralesionales, de forma individual o en cúmulos. Otra lesión característica fue la neumonía intersticial con edema y congestión pulmonar, de moderada a severa, y presencia de estructuras parasitarias de forma similar a las descritas en los demás órganos afectados. La causa de muerte de los animales afectados se asoció a la insuficiencia respiratoria y la necrosis tisular diseminada (Figura 7).
- **Co-infección de *T. gondii* con un agente etiológico viral:** Los animales presentaron lesiones compatibles con toxoplasmosis aguda diseminada, sin embargo, en algunos órganos las lesiones fueron más graves y exacerbadas por la participación de un segundo agente infeccioso de tipo viral. En dos casos de canguros rojos, se observaron cuerpos de inclusión intranucleares basofílicos perilesionales en tejido pulmonar, hepático y esplénico, sugerentes de infección por herpesvirus (Figura 8). En un tercer caso, en un gato doméstico, se apreció pérdida severa de la población linfoide en linfonodos y bazo, así como linfo necrosis y apoptosis; dichas lesiones fueron compatibles con una infección de tipo viral, sugerentes de infección por parvovirus o retrovirus.

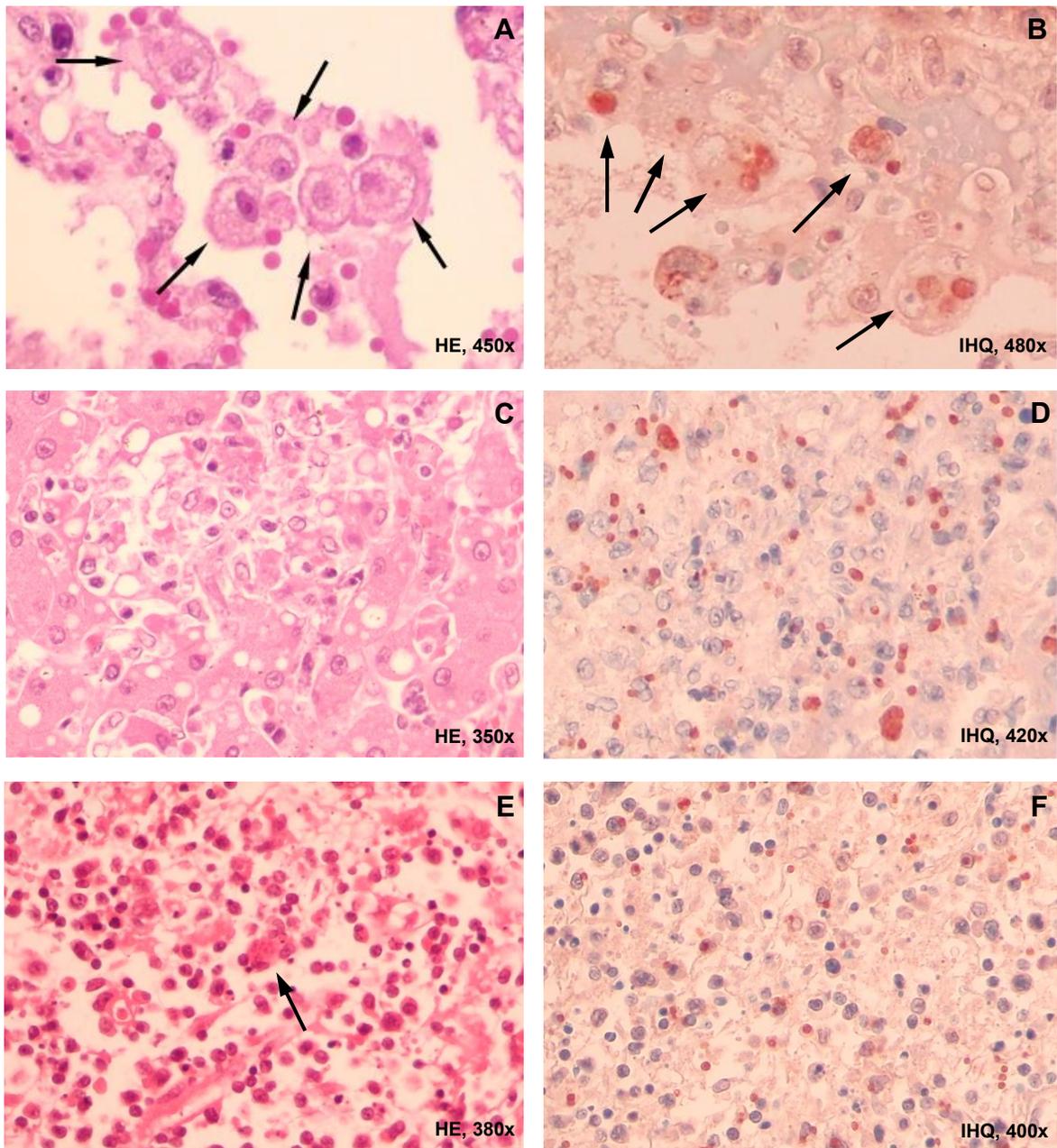


Figura 7. Toxoplasmosis aguda diseminada, lesiones microscópicas en diferentes especies de fauna silvestre. A) Sección de pulmón de lémur con neumonía intersticial, observándose en la luz alveolar varios macrófagos alveolares (flechas) de aspecto espumoso, sugerente de actividad fagocítica. B) IHQ de sección de pulmón con diferentes macrófagos alveolares (flechas) conteniendo taquizoítos inmunopositivos, de forma individual o en cúmulos. C) Hígado de mono ardilla apreciándose una extensa zona de necrosis. D) IHQ de zona de necrosis hepática con múltiples taquizoítos libres o intracelulares inmunopositivos. E) Bazo de canguro rojo con linfocitopenia y pérdida de la población linfoide, apreciándose un macrófago con múltiples taquizoítos en su interior (flecha). F) Sección similar de bazo, en la que se observan múltiples taquizoítos inmunopositivos entremezclados con los linfocitos esplénicos.

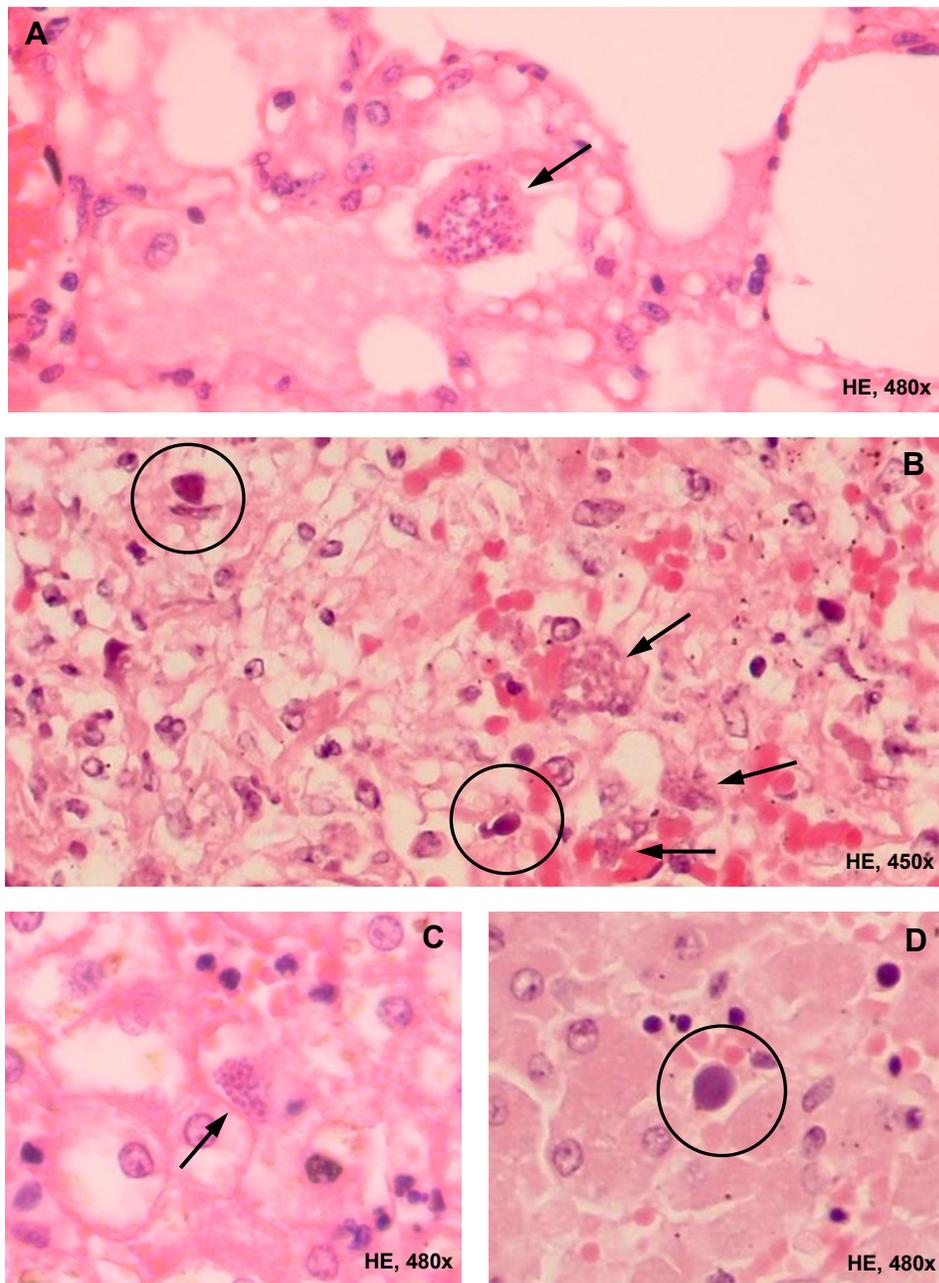


Figura 8. Co-infección de *T. gondii* con un agente etiológico viral en casos de canguros rojos. A y B) Comparación de tipos de neumonía intersticial, se aprecia en "A" el patrón clásico de toxoplasmosis aguda diseminada (con un macrófago con taquizoítos de *T. gondii* en su interior, flecha) y en "B", el tipo de neumonía intersticial con coinfección viral, prevaleciendo la pérdida de la arquitectura tisular por engrosamiento severo de las paredes alveolares, exfoliación de neumocitos y abundante material fibrilar con células inflamatorias. En "B", intraluminariamente en la pared alveolar, se observan estructuras ovales basófilicas (círculos) sugerentes de cuerpos de inclusión viral (CIV), así como macrófagos (flechas) con abundantes taquizoítos de *T. gondii*. C y D) Secciones de hígado, apreciándose en (C), hepatocito con taquizoítos de *T. gondii* intracelulares (flecha), y en (D), estructura sugerente de CIV, similar a los descritos en pulmón.

- **Re-infección por *T. gondii* con toxoplasmosis crónica (neurológica-miocárdica).** En dos casos de canguros rojos, además de presentarse las lesiones de curso agudo diseminadas, se observaron en miocardio focos de degeneración de miofibrillas, con infiltrado de células inflamatorias (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos) de grado leve a moderado. En en varios focos de degeneración de miofibrillas, se observaron varios quistes tisulares de forma enlogada a oval y de tamaño variable. Así mismo, en secciones de encéfalo se observaron quistes tisulares de tamaño discreto, sin respuesta inflamatoria adyacente. En un tercer caso de un mono ardilla, en secciones de encéfalo y miocárdico, se apreciaron quistes tisulares de tamaño discreto, sin presentar otro tipo de alteraciones adyacentes. En los tres animales, las estructuras parasitarias fueron inmunopositivas a *T. gondii* por IHQ. Con base en el patrón de lesiones, se consideró que estos animales habían presentado una infección previa por *T. gondii*, sobreviviendo a ella con desarrollo de quistes tisulares, indicativo de cuadros de curso crónico (Figura 9). Sin embargo, al exponerse a una nueva infección, desarrollaron lesiones de curso agudo diseminadas, siendo éstas la causa de la muerte.

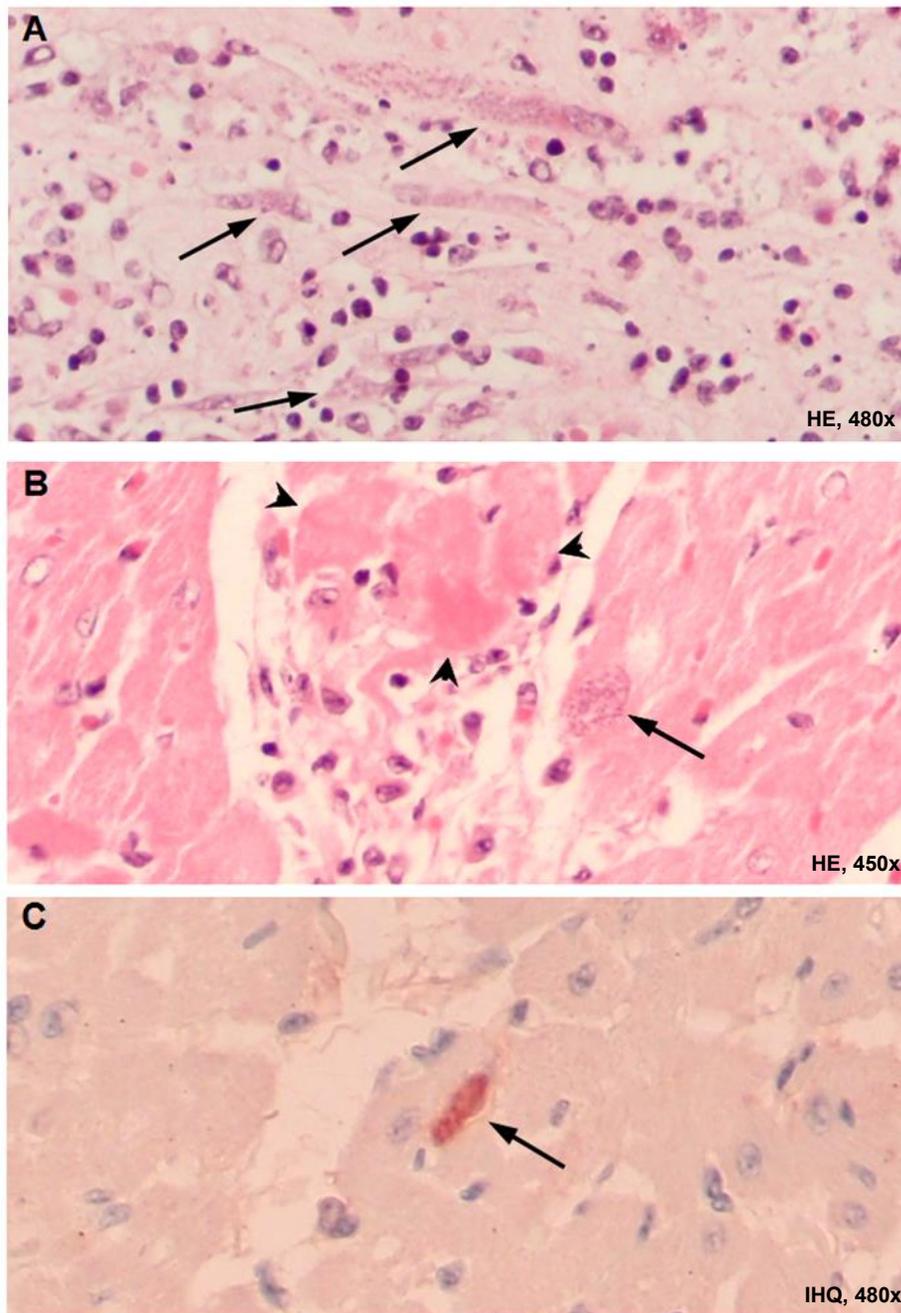


Figura 9. Re-infección de *T. gondii* con toxoplasmosis crónica miocárdica en canguro rojo y mono ardilla. A) Sección de estómago de canguro rojo apreciándose a nivel de la submucosa y muscular, zonas extensas de necrosis, edema e infiltrado de células inflamatorias mixto, con acúmulos de taquizoítos (flechas) intracelulares en células de músculo liso. B) Sección de miocardio del mismo animal, observándose miofibrillas contraídas y con degeneración hialina (cabeza de flecha), delimitada por discreto infiltrado de células inflamatorias y adyacente a ella, un quiste tisular adyacente (flecha) de pared poco definida. C) Sección de miocardio de mono ardilla apreciándose una estructura semioval de tamaño discreto inmunopositiva a *T. gondii*, sugerente de un quiste tisular (flecha); el animal murió de un cuadro de toxoplasmosis aguda diseminada.

- **Toxoplasmosis aguda intestinal:** Esta presentación se observó en un delfín del Atlántico neonato, en cuya mucosa intestinal se apreciaron lesiones necróticas severas difusas con abundantes estructuras parasitarias en diferentes estadios de división, incluyendo estadios sexuales (Figura 10). El grado y extensión de las lesiones necróticas a nivel del intestino fueron suficientes y súbitas para causar la muerte del animal afectado, sin que fuera necesario un compromiso o desarrollo de lesiones en otros órganos.

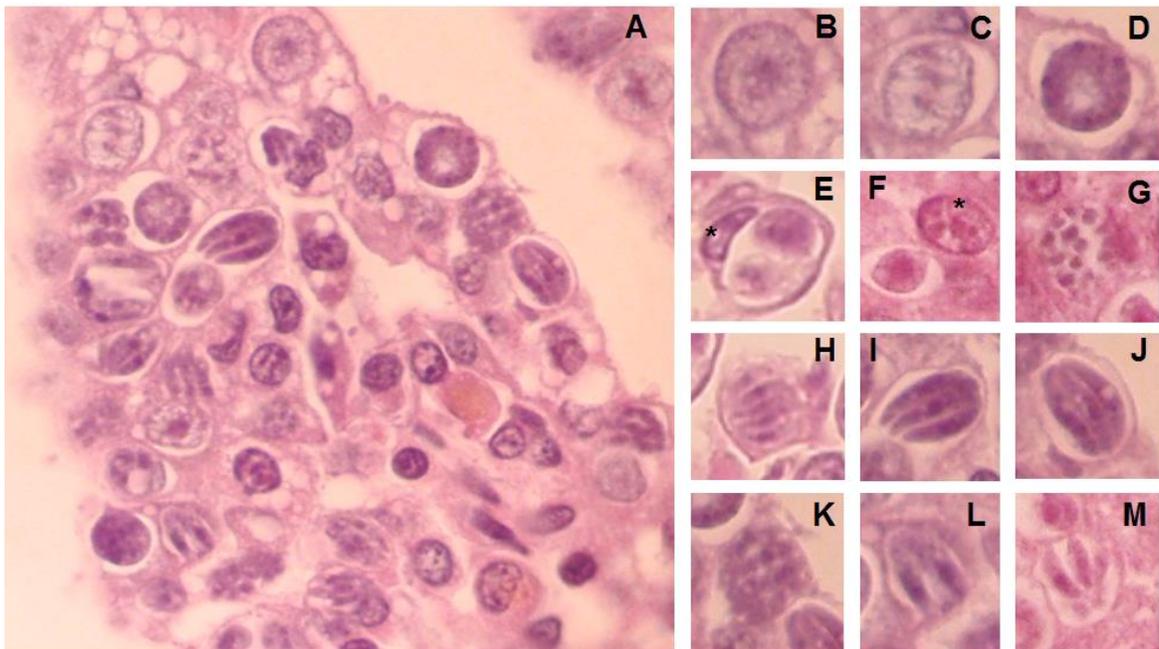


Figura 10. Toxoplasmosis aguda intestinal en delfín del Atlántico, detalle de los estadios parasitarios. A) Sección de intestino con presencia de diferentes estadios parasitarios, los cuales previamente habían resultado inmunopositivos a *T. gondii*. En los recuadros se aprecian estadios con diferentes características morfológicas correspondientes a estadios sexuales de parásitos Apicomplexa: B y C) Estructuras sugerentes de macrogamontes en diferentes etapa de maduración. D) Microgamonte en vacuola parasitófora. E y F) Esquizontes jóvenes, observándose en la vacuola parasitófora, dos y una estructuras respectivamente; (*) núcleo de la célula del hospedador. G) Esquizonte multinucleado. H-M) Diferentes tipos de esquizontes con múltiples merozoítos, corte longitudinal, presentando todos los merozoítos su núcleo en la porción media del parásito. Algunos merozoítos se apreciaron de mayor longitud y grosor, así como con mayor basofilia (I y J), mientras que otros más alargados y cortos con un aparente cuerpo residual (L y M). Imágenes: A, tinción HE, 1000x; B a M, tinción HE, 1150x.

- **Toxoplasmosis crónica neurológica:** este patrón se presentó en diferentes casos de marsupiales australianos (canguro gris y wallabys), observándose en varias secciones del encéfalo (corteza, hipocampo, tálamo y mesencéfalo, principalmente), quistes tisulares con alteraciones diversas adyacentes, sin apreciarse en otros aparatos y sistemas de las cavidades torácica y abdominal incluyendo el miocardio, lesiones asociadas a infección por *T. gondii*. Las lesiones predominantes en el parénquima nervioso consistieron en focos o zonas de infiltrado de células inflamatorias compuestas por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, en leve a moderada cantidad, con presencia de células de la glía. Los cambios necróticos fueron poco frecuentes y discretos, prevaleciendo las alteraciones degenerativas en neuronas, en la mayoría de las regiones evaluadas. En varios casos, adyacente a los focos de inflamación o gliosis, se observaron quistes tisulares de diferente tamaño, de forma redondeada a oval y con diferente grosor de la pared del quiste, siendo la causa de muerte la encefalitis no supurativa; mientras que en otros casos, los tejidos presentaron quistes tisulares sin respuesta inflamatoria o gliosis adyacente, considerados hallazgos postmortem (Figura 11).

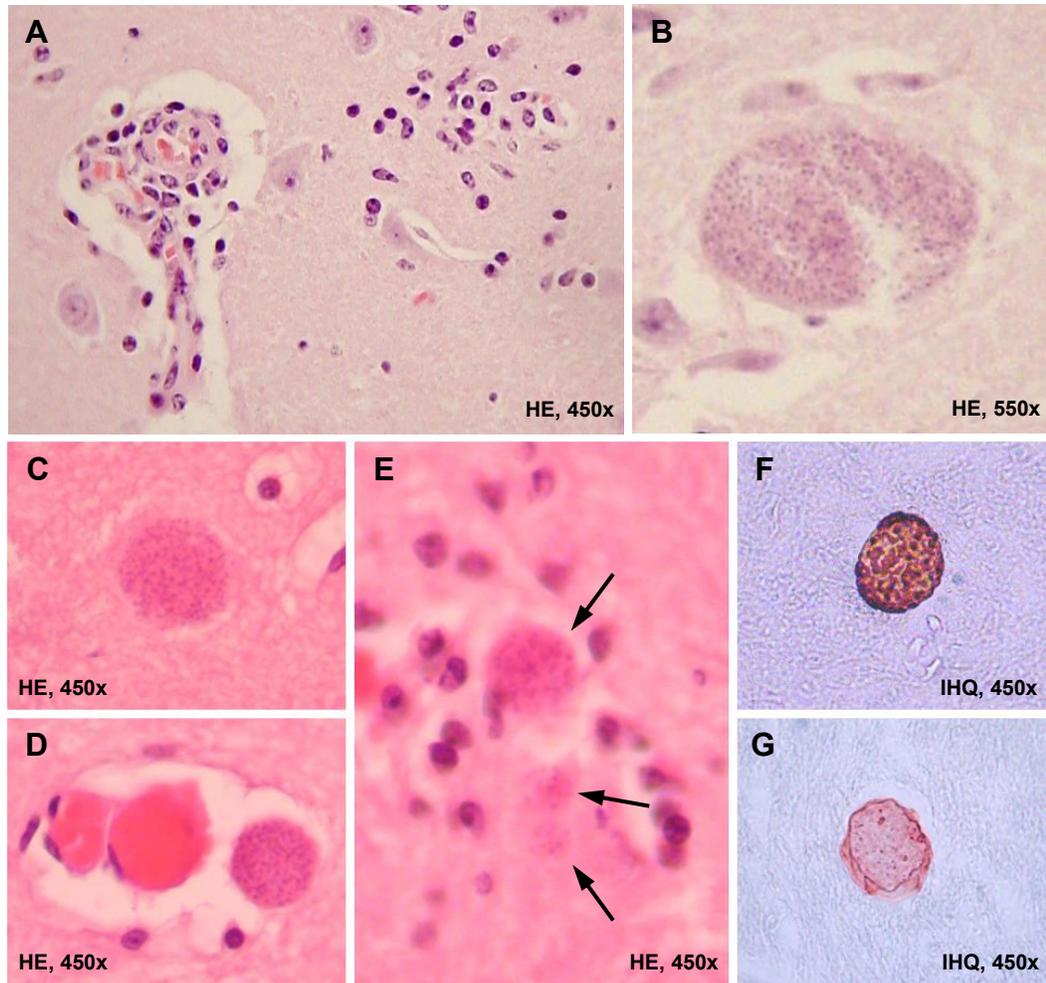


Figura 11. Toxoplasmosis crónica neurológica en marsupiales australianos. A) Sección de encéfalo de canguro gris (*M. giganteus*) apreciándose infiltrado de células inflamatorias perivasculares y un foco de gliosis adyacente. B) Diferente sección de tejido cerebral del mismo animal, donde se observa un quiste tisular de gran tamaño. C, D y E) Secciones de encéfalo de wallabys (*Macropus* spp) con quistes tisulares con y sin respuesta inflamatoria o gliosis; en E, se aprecia más de un quiste tisular (flechas). F y G) Quistes tisulares con diferente intensidad de inmunopositividad, siendo marcada en uno (F) y parcial en el otro (G), delimitándose el marcaje principalmente a la pared del quiste, considerándose como un quiste tisular en degeneración.

- **Toxoplasmosis crónica congénita:** esta presentación se observó en un caso de ovino (*O. aries*) neonato, cuya historia clínica refirió la presencia de signos clínicos nerviosos inespecíficos posterior a su nacimiento, por lo que fue eutanasiado. Al revisar las secciones de encéfalo, se observaron múltiples quistes tisulares, sin apreciarse cambios necróticos o inflamatorios adyacentes, pero con cambios degenerativos neuronales leves, focos discretos de gliosis y hemorragias. En una sola región del corte histopatológico, en la sustancia blanca se observó una zona de desmielinización de leve a moderada (Figuras 12 y 13).

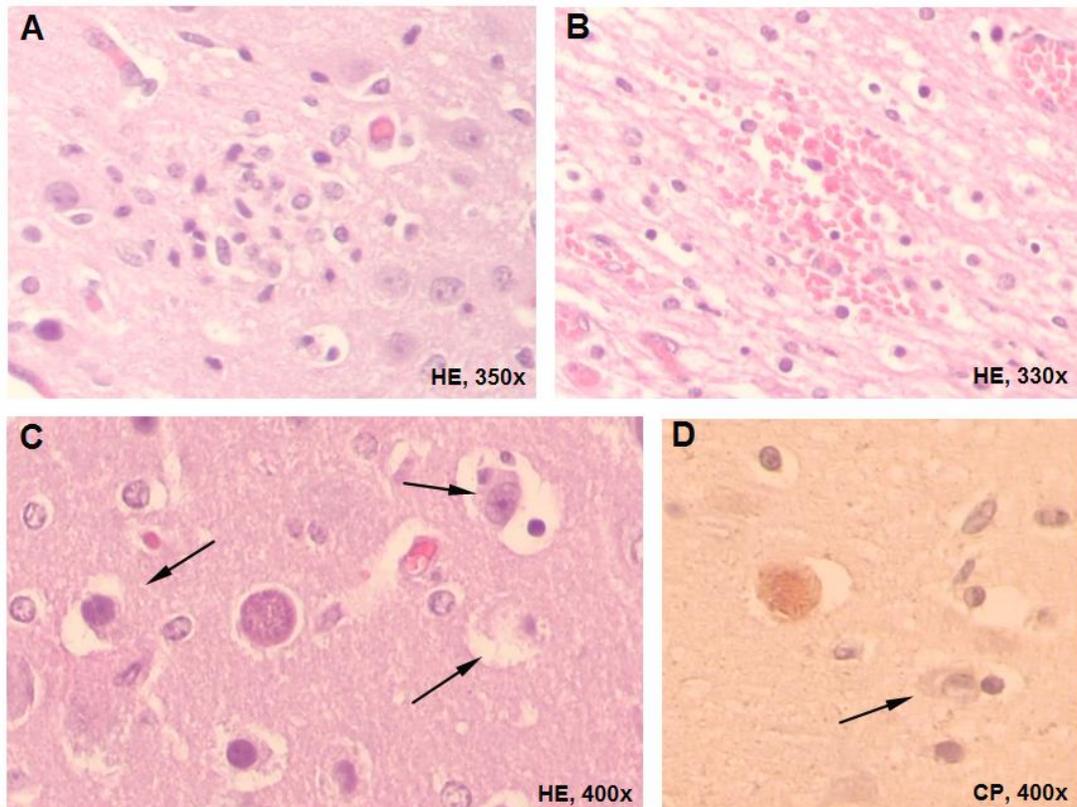


Figura 12. Toxoplasmosis crónica congénita, lesiones en encéfalo de ovino (neonato). A) Sección de tejido nervioso, apreciándose un foco de gliosis discreto sin presencia de quistes tisulares adyacentes. B) En otra sección de tejido, se observaron hemorragias discretas zonales. C y D) En algunas zonas del tejido evaluado, se llegaron a observar quistes tisulares adyacentes a neuronas con cambios degenerativos (flechas) y satellitosis, H&E (C) e IHQ (D).

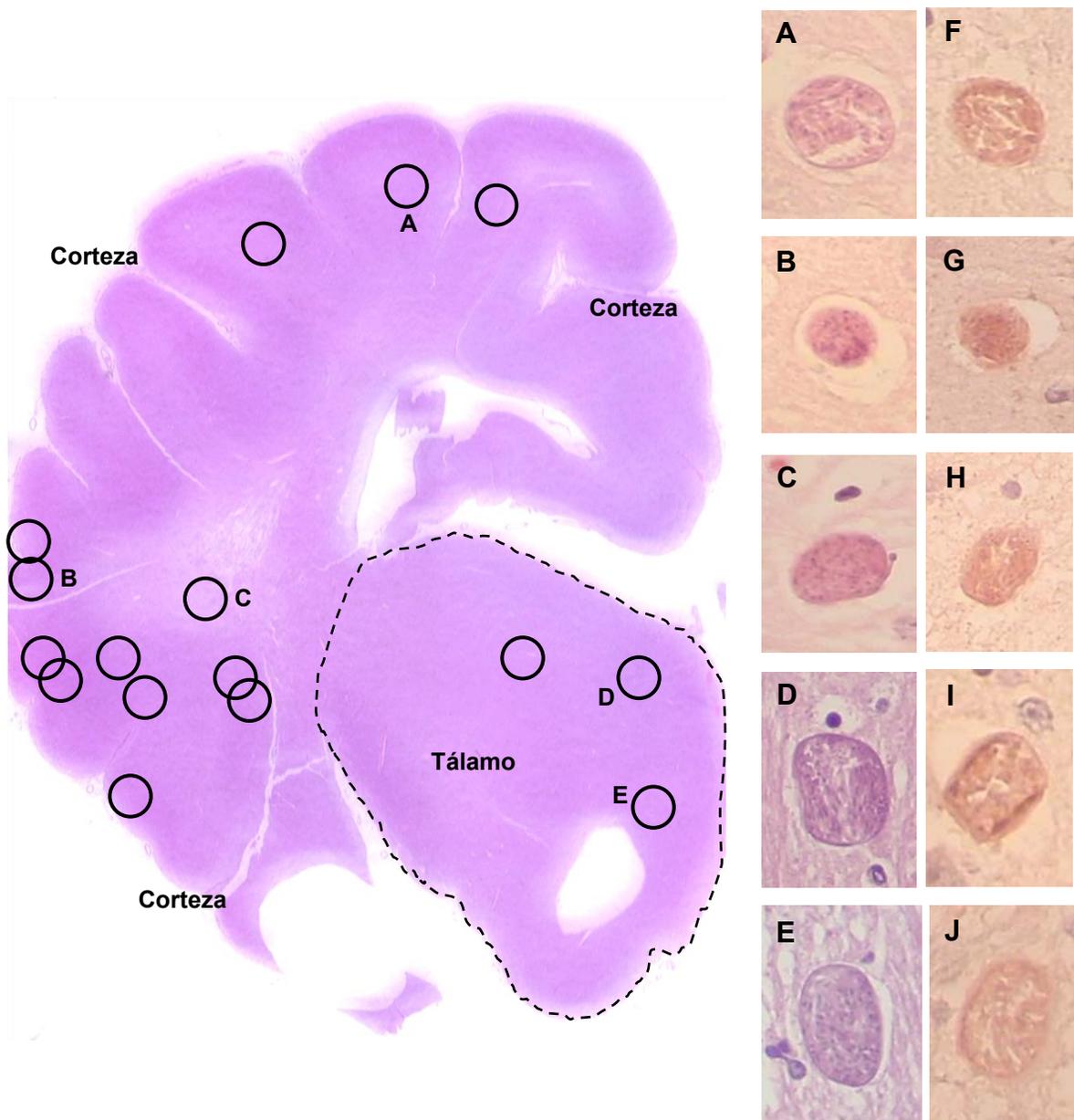


Figura 13. Toxoplasmosis crónica congénita, distribución de quistes tisulares en encéfalo de ovino (neonato). Corte coronal de encéfalo medio, abarcando corteza y tálamo, apreciándose la distribución de quistes tisulares (círculos) a lo largo del tejido. En las imágenes de la derecha, se ejemplifican diferentes quistes tisulares (H&E e IHQ) presentes en la corteza (A, B y C) y a nivel del tálamo (D y E), los cuales presentan discretos cambios en su morfología (grosor de pared, afinidad tintorial, etc.); así mismo, los quistes tisulares fueron más numerosos en la corteza, pero los presentes en el tálamo, aparentemente eran de mayor tamaño o con mayor cantidad de bradizoítos. Figuras A a E, HE, 450x; F a J, IHQ, complejo peroxidasa, 450x.

En el resto de los casos, no se observaron lesiones asociadas a algún tipo de presentación, ni tampoco la presencia de estructuras parasitarias de alguno de los estadios infecciosos. Los casos relacionados para cada presentación se enlistan en el cuadro 19.

Cuadro 19. Relación de casos de toxoplasmosis clasificados de acuerdo a su presentación y distribución de lesiones, incluyendo los casos asintomáticos

Tipo de presentación - subpresentación	Tipo de distribución	Especie	Casos	
			n	#
Aguda	Diseminada	Mono ardilla (<i>S. scireus</i>)	3	21-23
		Mono zaraguato (<i>Alouatta</i> sp)	1	26
		Lemur (<i>L. lemur</i>)	2	27-28
		Canguro rojo (<i>M. rufus</i>)	2	3, 4
Aguda / Co-infección	Diseminada	Canguro rojo (<i>M. rufus</i>)	2	6, 7
		Gato (<i>F. catus</i>)	1	1
Aguda / Re-infección	Diseminada - Neurológica-miocardica	Canguro rojo (<i>M. rufus</i>)	3	5-7
		Mono ardilla (<i>S. scireus</i>)	2	24,25
Aguda	Intestinal	Delfin del Atlántico (<i>T. truncatus</i>)	1	33
Crónica	Neurológica	Canguro gris (<i>M. giganteus</i>)	1	10
		Wallaby de Bennet (<i>M. rufogriseus</i>)	2	12,16
		Wallaby (<i>Macropus</i> spp)	5	15,17-20
Crónica - Congénita	Neurológica	Ovino (<i>O. aries</i>)	1	2
Asintomático	Sin lesiones	Canguro gris (<i>M. giganteus</i>)	1	11
		Wallaby de Bennet (<i>M. rufogriseus</i>)	1	13
		Wallaby de Tammar (<i>M. eugenii</i>)	1	14
		León (<i>P. leo</i>)	1	29
		Jaguar (<i>P. onca</i>)	1	30
		Ocelote (<i>L. pardalis</i>)	1	31
		Oso negro (<i>U. americanus</i>)	1	32
		Perro (<i>C. familiaris</i>)	32	37-68
		Gato (<i>F. catus</i>)	8	85-92
Total			73	---

6.3 Aislamiento *in vivo* del estudio prospectivo

Se intentó el bioensayo en ratón a partir de secciones de encéfalo medio de los 32 casos de perros (estudio prospectivo). Sin embargo, transcurridos los tiempos del ensayo, no se observaron estructuras parasitarias en los lavados peritoneales ni en las impresiones de tejido evaluadas. Así mismo, no se determinaron anticuerpos IgG en ninguno de los ensayos serológicos realizados durante el transcurso del presente estudio.

6.4 Biología molecular

6.4.1 PCR de muestras de sangre (estudio prospectivo)

De las muestras de los nueve gatos domésticos, tres resultaron positivas para el gen B1, dos del CEIEPA y una del ZF. Esta última muestra, amplificó una banda muy tenue del peso esperado y otra más de mayor peso bien definida (Figura 14). Para el gen GRA6, las dos muestras de gatos que habían resultado positivas para B1, fueron positivas para este marcador, pero no la muestra del ZF, la cual fue negativa. Debido a que los productos de amplificación para GRA6 fueron definidos y marcados, se realizó una nueva PCR para este mismo gen pero para el producto de 774 pb, correspondiente a la región considerada para secuenciar, sin embargo, ambas muestras presentaron además de la banda esperada (ligeramente por encima del peso estimado), se observaron múltiples bandas extras por debajo del producto considerado.

Las dos muestras de felinos silvestres del ZF, resultaron positivas para el gen B1, una de ellas (muestra del león) con la banda ligeramente por encima del peso esperado; sin embargo, también presentaron bandas extra. Para el gen GRA6, ambas muestras resultaron negativas.

Las cinco muestras de felinos con bandas extra para alguno de los genes, se tomaron con reserva, considerándose los casos como sugerentes.

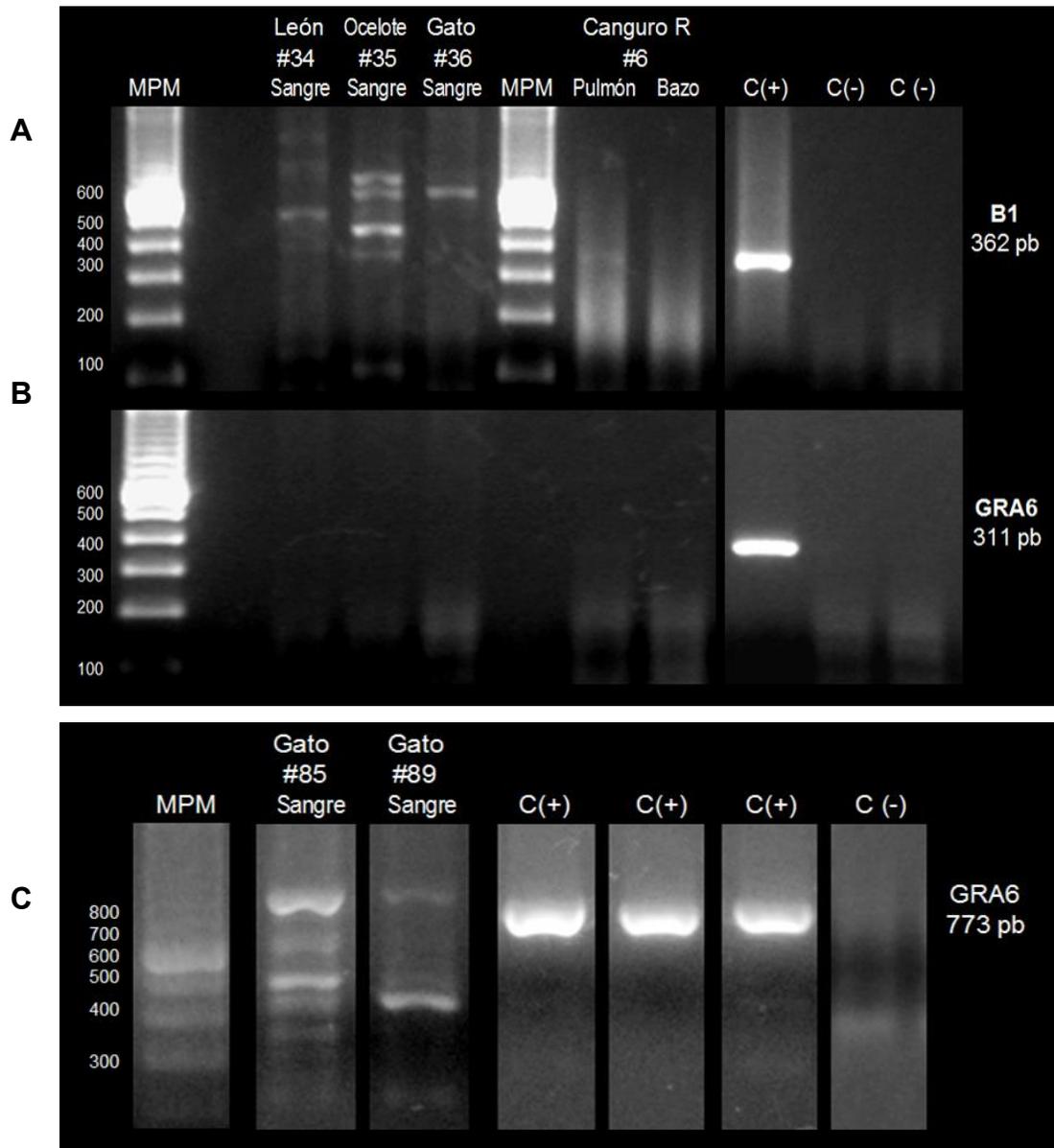


Figura 14. PCR para los genes B1 y GRA6, de muestras de sangre de felinos domésticos y silvestres. En los geles A y B, se observan los resultados de las PCR de las muestras de sangre de león, ocelote y gato (#34, 35 y 36) del ZF, comparándose con muestras de canguro rojo (#6) y controles positivo (+) y negativo (-). Para B1, las tres muestras de felinos presentaron bandas extras por encima del peso esperado con diferentes patrones, mientras que para el gen GRA6, no se obtuvieron productos de amplificación. En el gel C, se observan los amplicones de dos muestras de gatos (#85 y 89) del CEIEPA, que además de observarse la banda esperada (por encima del peso esperado), se aprecian varias bandas extras, con diferente patrón entre sí; el control positivo amplificó en el peso esperado (773 pb). Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

6.4.2 PCR de muestras de tejido (estudio prospectivo y retrospectivo)

Del estudio prospectivo, en dos de los ocho gatos del CEIEPA, por lo menos una muestra de tejido, resulto positiva en la PCR del gen B1, apreciándose la banda en el peso esperado, pero al evaluarlas para el gen GRA6, todas las muestras resultaron negativas. Las muestras de encéfalo de los 32 caninos incluidos en el estudio, resultaron negativas para los genes B1 y GRA6, por lo que ya no se evaluaron para los otros marcadores.

En el estudio retrospectivo, se estudiaron 33 casos, analizando diferentes tejidos (corazón, pulmón, estómago, intestino, linfonodo, bazo y encéfalo), resultando 30 casos con por lo menos una muestra de tejido positiva por PCR. La mayoría de las muestras fueron positivas para el gen SAG3, independientemente de la especie de la que se tratara o su procedencia (DP-FMVZ, ZG, DGZVS). Para el gen B1, amplificaron muestras de 10 casos, para GRA6 de 18 casos, para SAG3 de 28 casos, tres para SAG2 y uno para BTUB.

Con base en el tipo de tejido estudiado, muestras de corazón y encéfalo (órganos considerados de etapa crónica) de 12 casos resultaron positivas (PCR positivo en por lo menos un tejido de alguno de los dos evaluados). Mientras que en muestras de pulmón, hígado o bazo (órganos considerados de etapa aguda), 24 casos resultaron positivos (PCR positivo en por lo menos dos de los tres tejidos evaluados). En dos de los casos de canguros rojos (*M. rufus*), se analizaron muestras de estómago, resultando positivas al gen SAG3.

De los 30 casos del estudio retrospectivo, en donde por lo menos una de las muestras resultó positiva para alguno de los marcadores, la mayoría de los productos de amplificación por PCR (directa o por reamplificación) resultaron con bandas tenues y poco definidas (Figuras 15 y 16). De estos casos, solamente en 13 de ellos, se obtuvieron bandas claras y definidas, considerándose los productos de PCR adecuados para intentar su genotipificación por PCR-RFLP

En seis de los casos (todos de la DGZVS), tanto en la primera ronda del PCR (2 casos) y posterior a la reamplificación de las muestras (4 casos), se observaron bandas extra por encima y debajo del producto esperado, de forma

similar a las muestras de sangre de felinos del estudio prospectivo (Figura 16), considerándose dichos resultados como sugerentes.

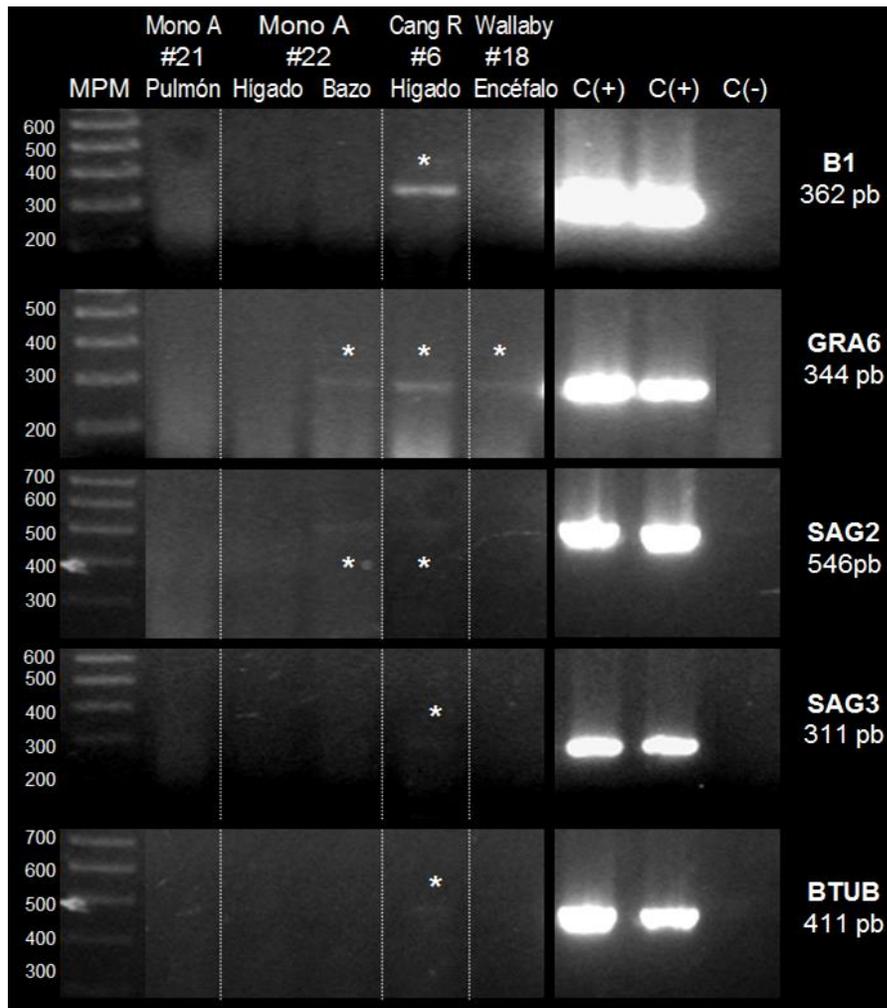


Figura 15. PCR del gen B1 y reamplificación de PCR para los genes GRA6, SAG2, SAG3 y BTUB de muestras representativas de tejidos de fauna silvestre, obteniéndose bandas tenues en el peso esperado. Se observan productos de amplificación de PCR (diferentes marcadores), de muestras de tejidos (fijados en formaldehído o de bloque de parafina) de dos monos ardilla (#21 y 22), canguro rojo (#43) y Wallaby (#16), comparándose con controles (C + y -). Aunque se evaluaron las mismas muestras, se obtuvieron diferente cantidad de bandas tenues (*) para cada marcador. En esta imagen, para el gen GRA6 se obtuvo la mayor cantidad de tejidos positivos. Especies: “Mono A”, mono ardilla; “Cang R”, canguro rojo; “Wallaby”, wallaby. Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

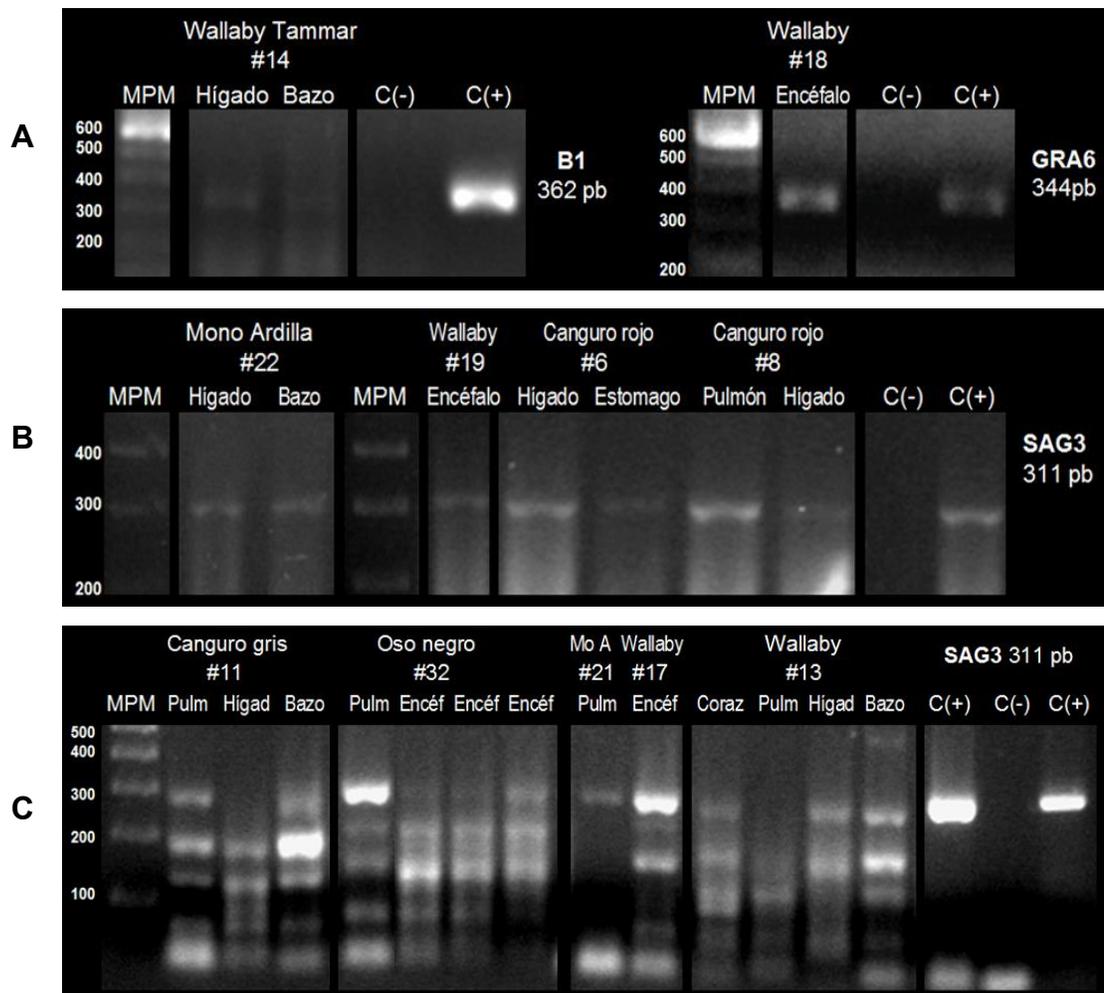


Figura 16. PCR del gen B1 y reamplificación de PCR para los genes GRA6 y SAG3 de muestras de tejidos de fauna silvestre. A) Se observan productos de amplificación de PCR para los marcadores B1 y GRA6, a partir de muestras de tejidos (fijados en formaldehído) de dos wallabys (#14 y 18), para ambos marcadores, son notorias las bandas obtenidas, siendo más evidente la del gen GRA6. B) PCR para el marcador SAG3, a partir de muestra de tejidos (fijados en formaldehído o de bloque de parafina) de un mono ardilla (#22), un wallaby (#19) y dos canguros rojos (#6 y 8). De todas las muestras, se obtuvieron bandas definidas, variando discretamente su intensidad. C) Productos de reamplificación para el gen SAG3, de diferentes tejidos congelados de un canguro gris (#11), un oso negro (#32) y un wallaby (#13), así como de tejidos fijados en formaldehído de un mono ardilla (Mo A, #21) y de un wallaby (#17). En el caso del canguro gris, el oso negro y el wallaby #13, los diferentes tejidos analizados tiene bandas extras con diferentes patrones entre si y entre cada animal. Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

6.4.3 PCR-RFLP de muestras de tejido (estudio prospectivo y retrospectivo)

En muestras de 13 casos se obtuvieron bandas claras y definidas para su genotipificación, las cuales correspondieron a tejidos de diferentes animales de fauna silvestre: cuatro casos de canguros rojos (#4, 5, 6 y 9), dos canguros grises (#10 y 11), tres wallabys (#12, 13 y 18), dos monos ardilla (#21 y 22), un jaguar (#30) y un oso negro (#32). Dichos casos correspondieron a nueve casos clínicos con diagnóstico previo de toxoplasmosis y cuatro sin signología asociada a infección por *T. gondii*.

Doce de los casos fueron genotipificados mediante la digestión de amplicones del gen SAG3, resultando en genotipo I (siete casos) o genotipo I con bandas extras (cinco casos). Dos casos pudieron ser genotipificados mediante el gen GRA6, resultando uno tipo I y el otro tipo I con bandas extra. Un solo caso, se pudo genotipificar por dos marcadores (GRA6 y SAG3), resultando tipo I con bandas extra y tipo I, respectivamente. Los resultados se resumen en el cuadro 20 y se ejemplifican en las figuras 17 y 18.

Cuadro 20. Relación de genotipos de *T. gondii* determinados.

Especie	# Caso	PCR					PCR-RFLP	
		B1	GRA6	SAG3	SAG2	BTUB	GRA6	SAG3
Canguro rojo (<i>M. rufus</i>)	4	(-)	(-)	(+)	Nd	nd	---	I/u-1
	5	(-)	(-)	(+)	Nd	nd	---	I/u-1
	6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	---	I/u-1
	9	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	---	I/u-1
Canguro gris (<i>M. giganteus</i>)	10	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	---	I
	11	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	---	I
Wallaby de Bennet (<i>M. rufogriseus</i>)	12	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	I	---
	18	(+)	(+)	(+)	Nd	nd	---	I/u-1
Wallaby (<i>Macropus</i> spp)	13	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	---	I
Mono ardilla (<i>S. sciureus</i>)	21	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	---	I
	22	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	---	I
Jaguar (<i>P.onca</i>)	30	(-)	(-)	(+)	Nd	nd	---	I
Oso negro (<i>U. americanus</i>)	32	(-)	(+)	(+)	Nd	nd	I/u-1	I

Resultados PCR: (+), positivo; (-), negativo; nd, no determinado.
Resultados PCR-RFLP: I, tipo I ; I/u-1, tipo I con bandas extra.

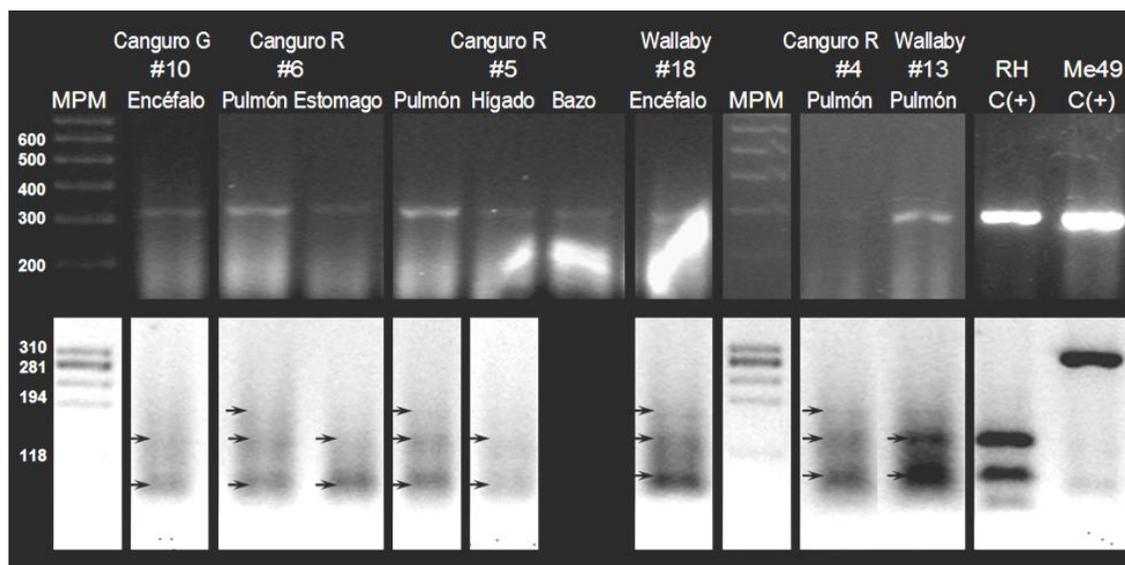


Figura 17. PCR-RFLP de amplicones del gen SAG3, a partir de muestras de marsupiales australianos. En el gel superior se observan los productos de amplificación de PCR para el gen SAG3 (311pb), de diferentes tejidos fijados en formaldehído y parafina de un canguro gris (#10), tres canguros rojos (#4, 5 y 6) y de dos wallaby (#13), comparándose con los controles (+) y (-). En el segundo gel, se aprecian las digestiones de los amplicones de cada tejido, que al compararse con los patrones de banda de los controles positivos tipo (RH) y II (Me49), se observan que en cuatro tejidos, las bandas obtenidas son similares a las obtenidas para tipo I y diferentes para tipo II, mientras que el restante (4 muestras de 4 casos) presentan una banda extra por encima del peso esperado, designándose como tipo I/u-1. PCR: Geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PCR-RFLP: Ncil, NEB4, BSA, 37°C; gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio.

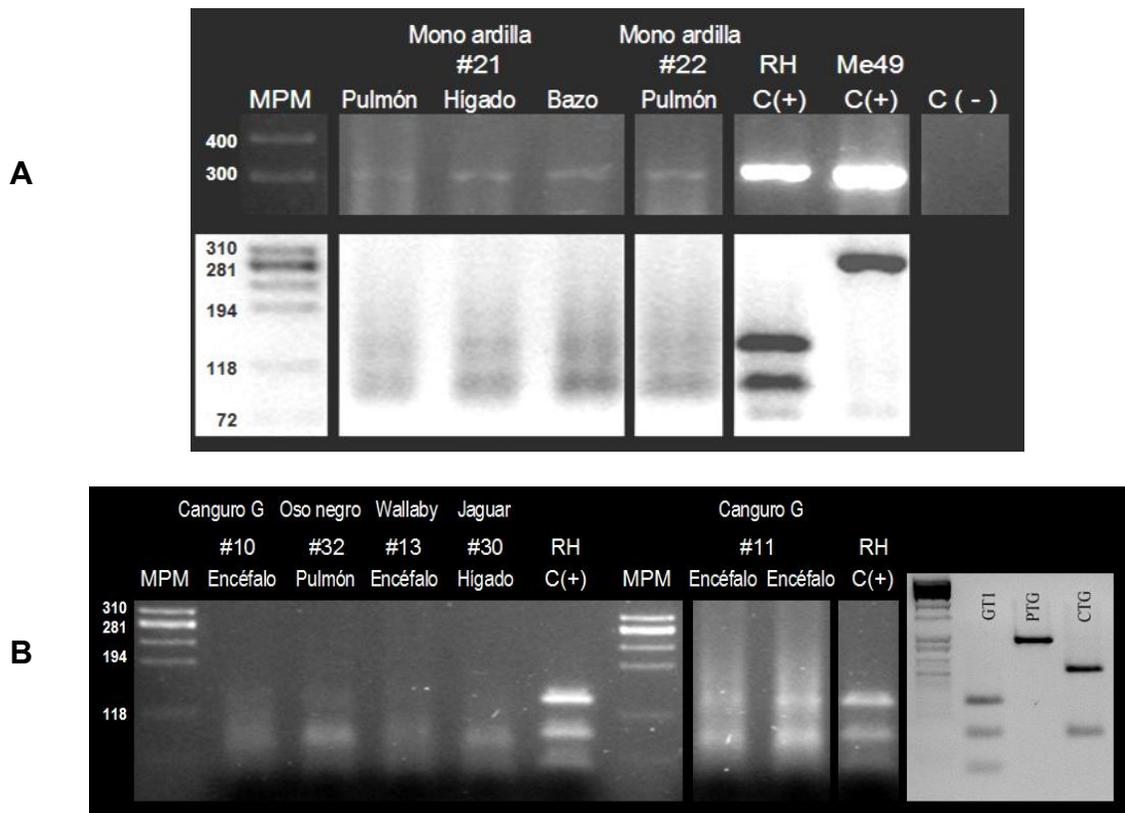


Figura 18. PCR-RFLP de amplicones del gen SAG3, a partir de muestras de monos ardilla, marsupiales australianos y carnívoros. A) En el gel superior se observan los productos de amplificación de PCR para el gen SAG3 (311pb), de diferentes tejidos fijados en formaldehído de dos monos ardilla (#21 y 22), comparándose con los controles (+) y (-). En el segundo gel, se aprecian las digestiones de los amplicones de cada tejido, que al compararse con los patrones de banda de los controles positivos tipo I (RH) y II (Me49), se observan que las bandas obtenidas son similares para tipo I y diferentes para tipo II. B) PCR-RFLP para SAG3, a partir de muestras de diferentes animales, tanto de formaldehído (canguro gris #10), como congeladas (osos negro #32, Wallaby #13 y jaguar #30), apreciándose bandas tenues, similares a las bandas del control positivo genotipo I (RH). Así mismo, los resultados se compararon con patrones descritos en la literatura (Su et al., 2006, 2010), siendo similares para GT1 (genotipo I) y diferentes para PTG (genotipo II) y CTG (genotipo III). PCR: Geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PCR-RFLP: NciI, NEB4, BSA, 37°C; gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio.

6.4.4 PCR y PCR-RFLP de aislamientos previos

De los aislamientos con los que se contaba, se obtuvieron de forma clara y definida productos de amplificación de PCR para todos los genes evaluados (B1, SAG2, SAG3, GRA6, BTUB), incluyendo las regiones de GRA6 y GRA7 seleccionadas para secuenciar (Figura 19).

Al realizar la PCR-RFLP de los marcadores SAG2, SAG3, GRA6 y BTUB, los productos de digestión de los tres aislamientos para todos los marcadores presentaron bandas similares a las de la cepa de referencia RH (genotipo I) y diferentes a las cepas de referencia Me49 (genotipo II) y VEG (genotipo III) (Figura 19).

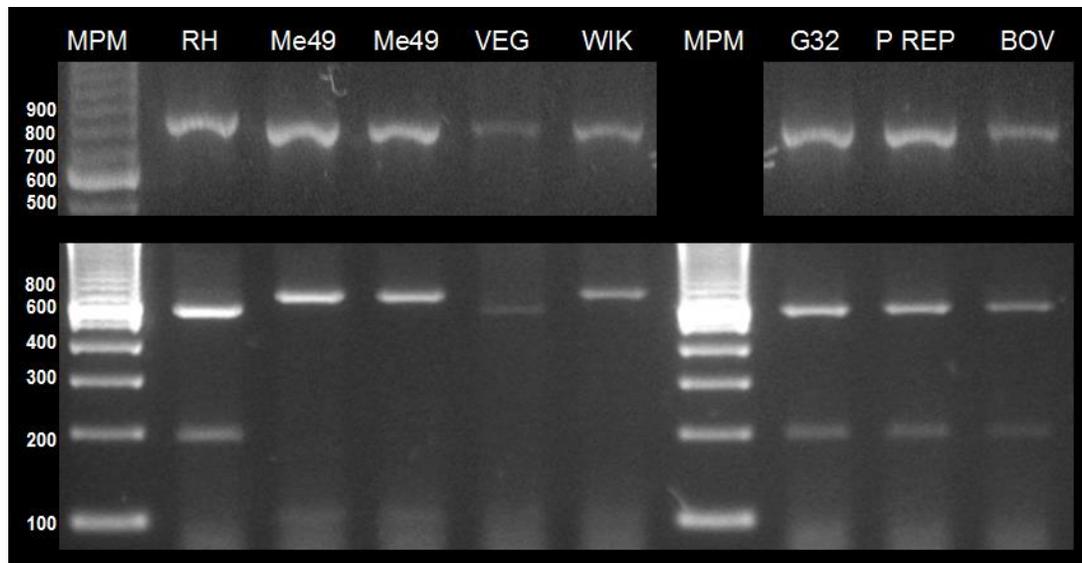


Figura 19. PCR y PCR-RFLP de amplicones del gen GRA6, a partir de aislamientos obtenidos previamente. En el gel superior se observan los productos de amplificación de PCR para el gen GRA6 (773 pb), de tres aislamientos obtenidos en el LIE, identificados como G32, P REP y BOV, comparándose con controles (+) de cepas de referencia, RH (genotipo I), Me49 (II), VEG (III) y Wik (genotipo recombinante). En el segundo gel, se aprecian las digestiones de los amplicones de cada aislamiento y cepas de referencia, que al comparar con los patrones de banda de los controles positivos, se observa que las bandas obtenidas de los tres aislamientos previos (G32, P REP y BOV), son similares al patrón de bandas para el genotipo I y diferentes para las demás cepas de referencia. PCR: Geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PCR-RFLP: NciI, NEB4, BSA, 37°C; gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio.

6.5 Secuenciación y análisis bioinformático

Del total de muestras estudiadas por PCR para los diferentes marcadores, solamente se obtuvieron productos de amplificación en abundante cantidad para su secuenciación, de los tres aislamientos obtenidos previamente en el LIE (G32, P REP, BOV) y de dos muestras de sangre de gatos (#85 y 89) del CEIEPA.

En un primer lote, se remitieron los productos de amplificación del gen GRA6 (773 pb) de dichas muestras, así como de las cepas de referencia RH (genotipo I), Me49 (genotipo II), VEG (genotipo III) y Wiktor (genotipo recombinante). Sin embargo, solamente una parte de las secuencias fueron adecuadas para su análisis, correspondiendo a las secuencias de las cepas de referencias RH, Me49, VEG y Wiktor; y los aislamientos del LIE, G32 y P REP. El resto de las secuencias no fueron legibles, estaban incompletas o superpuestas para su adecuada interpretación.

Posterior a su análisis bioinformático y al comparar con el banco de secuencias generado, se obtuvieron los siguientes resultados: 1) las cepas de referencia RH, Me49 y VEG presentaron el 100% de similitud con las respectivas secuencias descritas en la literatura; 2) la cepa Wiktor presentó 100% de similitud con las cepas de referencia Wik, FOU, P89, TgCkBr5, correspondiendo al haplogrupo 6; 3) el aislamiento P REP tuvo 100% de similitud con el aislamiento OkiTp-123-GB (haplogrupo 1); y 4) el aislamiento G 32 presentó 99% de similitud con cepas del haplogrupo 1 (RH, GT1, etc.) (Figuras 20, 21 y 22).

Las secuencias consenso generadas fueron a partir de las secuencias sentido y antisentido de lote de muestras remitido. Con el fin de reforzar los resultados obtenidos, se remitió un segundo lote, enviándose las mismas muestras para el amplificado de GRA6, así como del gen GRA7 (806 pb), desafortunadamente, todas las secuencias descargadas resultaron ilegibles para su análisis e interpretación.

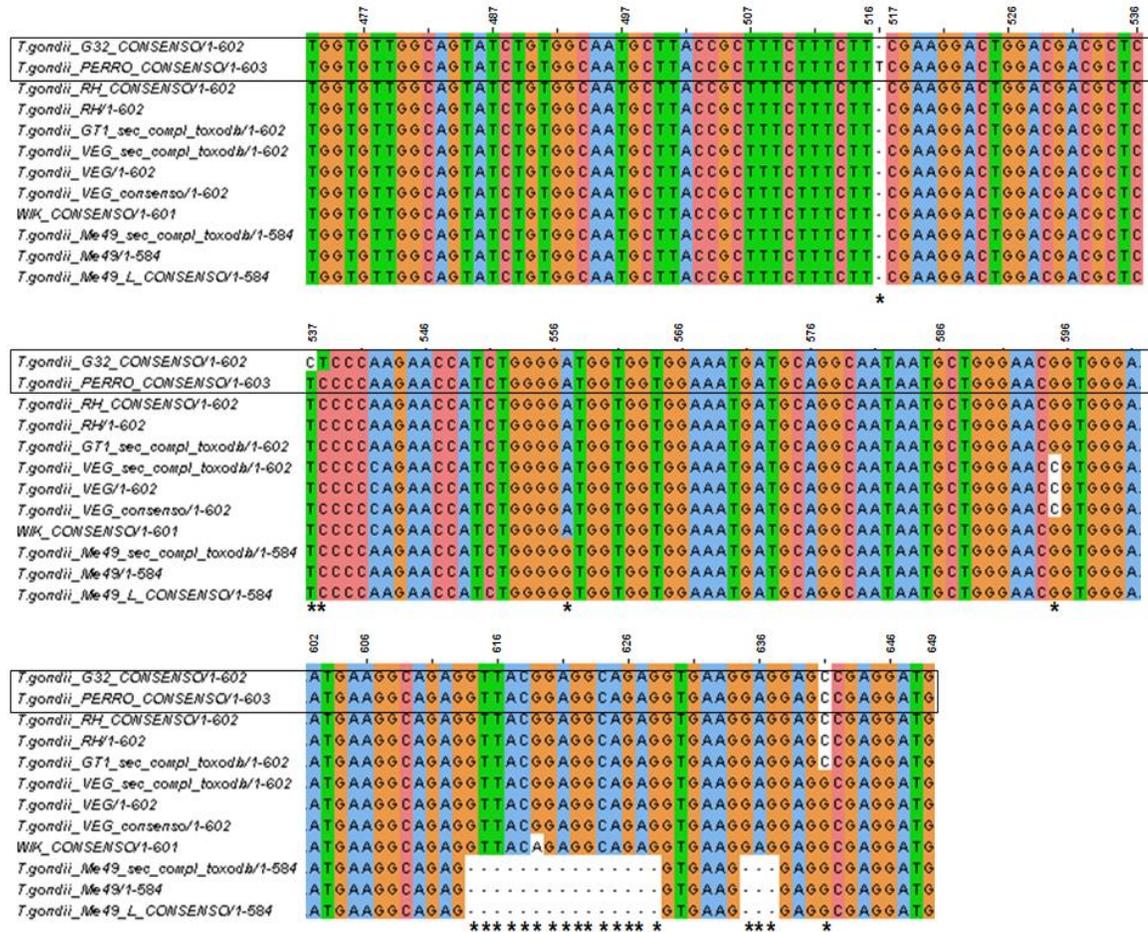


Figura 20. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de la región final del gen GRA6 (región codificante) de *T. gondii* de los aislamientos G32 y P REP, así como cepas de referencia del LIE, comparados con las secuencias de genotipos clonales descritas en la literatura. Se observa el alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los aislamientos previos G32 y PERRO (P REP), de las cepas de referencia (del LIE) RH, Me49, VEG y WIK (marcadas como CONSENSO), y de genotipos clonales (RH, GT1, Me49, VEG) de referencia obtenidos de NUCLEOTIDE y ToxoDB. El alineamiento se generó utilizando MUSCLE, abarcando la última porción de la región codificante (473-649) del gen, ubicándose en las dos primeras filas las secuencias de los aislamientos previos (recuadro) y posteriormente las de referencia. Los cambios detectados se encuentran marcados (*) en la parte inferior de los alineamientos. Las secuencias del G32 y P REP, son similares a las de RH y GT1 (genotipo I), con cambios mínimos, incluyendo en la secuencia del G32 una aparente sustitución por transición (C-T, nucleótidos 537-538) y en la secuencia del P REP una aparente inserción (T, nucleótidos 516-517).

H*	#G**	C/A***	Nucleótidos																											
			49	73	84	148	173	240	257	285	317	384	516	537	538	542	557	595	616	619	620	621	635	639	641					
3	2	CTG	T	G	T	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	C	A	C	T	G	G	A	G	A	G					
3	2	VEG	T	G	T	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	C	A	C	T	G	G	A	G	A	G					
3	2	VEG ^{LIE}	T	G	T	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	C	A	C	T	G	G	A	G	A	G					
2	1	DEG	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	G	G	-	-	-	-	-	A	G					
2	1	ME49	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	G	G	-	-	-	-	-	A	G					
2	1	Me49 ^{LIE}	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	G	G	-	-	-	-	-	A	G					
1	10	GT1	G	G	C	A	C	T	T	A	T	C	T	T	C	A	A	G	T	G	G	A	G	A	C					
1	10	RH	G	G	C	A	C	T	T	A	T	C	T	T	C	A	A	G	T	G	G	A	G	A	C					
1	10	RH ^{LIE}	G	G	C	A	C	T	T	A	T	C	T	T	C	A	A	G	T	G	G	A	G	A	C					
1	---	G32	G	G	C	A	C	N	C	A	T	C	T	C	T	A	A	G	T	G	G	A	G	A	C					
1	---	P REP	G	G	C	A	C	T	C	A	T	C	T	T	C	A	A	G	T	G	G	A	G	A	C					
4	17	MAS	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	G	G	T	G	G	A	G	-	-					
4	15	CASTELLS	T	G	C	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
4	11	TgCatBr1	T	G	C	A	C	T	T	T	T	T	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
4	119	TgCaTBr18	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	G	T	-	-	-	G	-	-	-					
5	95	GUY-MAT	T	G	C	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
5	98	RUB	T	G	C	A	T	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	G	G	A	G	A	G	A	C				
6	6	FOU	T	G	C	C	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
6	42	TgCatBr9	T	G	C	C	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
6	---	Wiktor ^{LIE}	T	-	C	C	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	G				
7	28	CAST	G	G	C	A	C	T	C	A	T	G	T	T	C	A	A	G	T	G	G	A	G	A	G	A	C			
8	19	TgCatBr6	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	G	T	G	G	A	G	A	G	-	-				
9	8	P89	T	G	C	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	-	-	-	-	G	A	G	A	C				
9	---	TgCatBr3	T	G	C	A	C	T	T	T	T	T	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
10	97	GUY-DOS	T	G	C	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
10	60	VAND	T	G	C	A	C	T	T	T	T	C	T	T	C	A	G	T	A	G	A	G	A	G	A	C				
11	66	COUGAR	T	G	A	G	G	-	C	T	T	C	T	T	C	A	G	G	G	G	G	A	G	A	G	A	C			
12	197	GUY-JAG(X)	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	C	G	C	A	C	G	G	A	A	G	A	C			
12	39	TgSoUs32(A)	T	G	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	C	G	C	A	-	-	-	-	A	G	A	C			

*H, Haplogrupo; **#G, numero de genotipo PCR-RFLP ToxoDb; ***C/A, cepa o aislamiento. (-) deleción; () inserción.

Haplogrupos / genotipos clonales: III, verde; II, azul; I, morado; 12, azul cielo.

Aislamientos previos del LIE: G32 y P REP, negritas; cambios en los nucleótidos, rojo.

Haplogrupos / genotipos no clonales: 4, 5, 6, 8, 9 y 10, café; 7 y 11 (atípicos clásicos), naranja.

Figura 21. Resumen de secuencias de nucleótidos del gen GRA6 (región codificante) de *T. gondii* de los aislamientos G32 y P REP comparados con aislamientos representativos de 12 haplogrupos. Los aislamientos G32 y P REP fueron similares a las secuencias de aislamientos haplogrupo 1 (RH, GT1), con cambios mínimos ("N" nucleótido no determinado, sustitución por transición y una inserción, respectivamente).

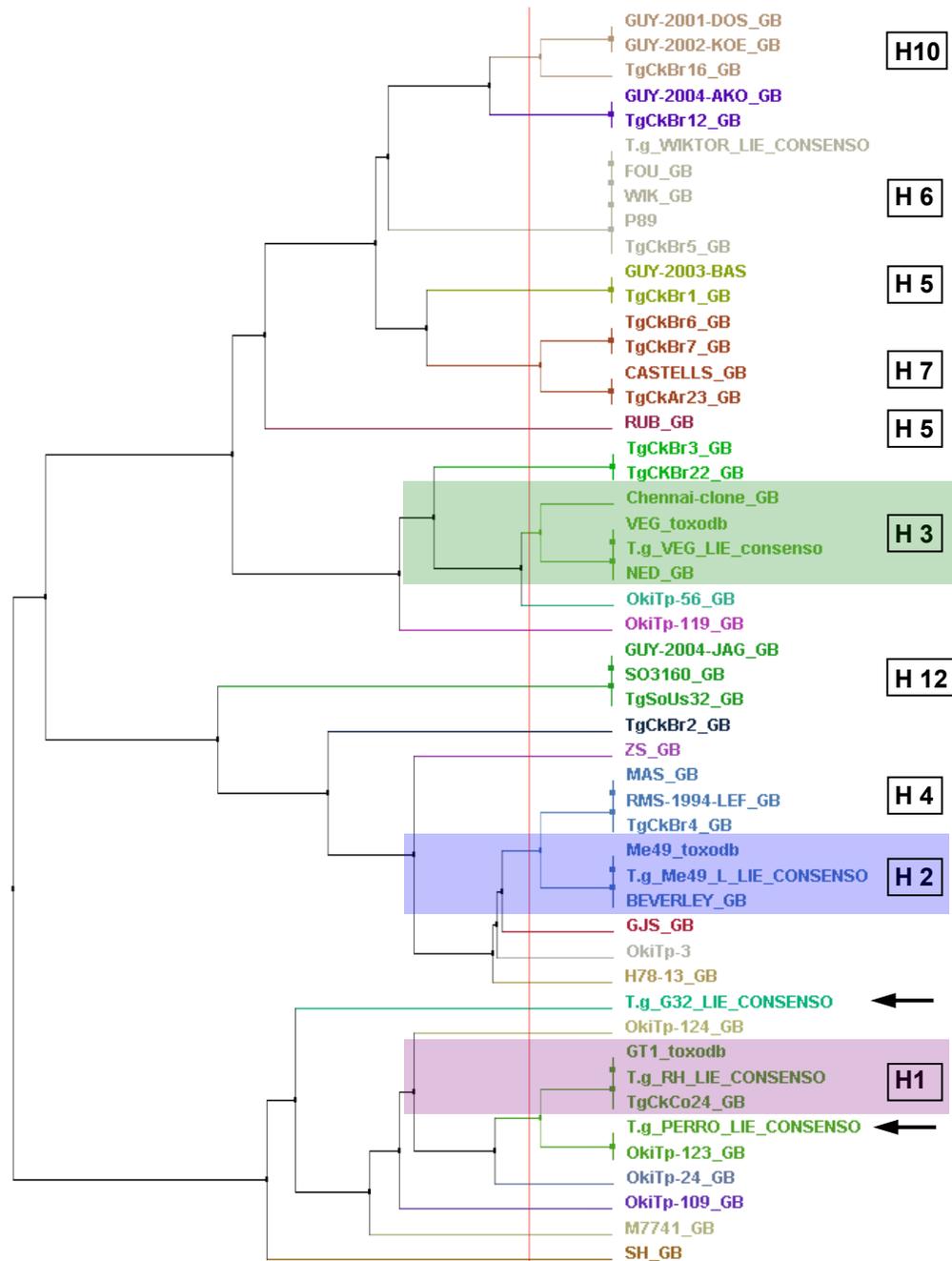


Figura 22. Cladograma basado en la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen *GRA6* de *Toxoplasma gondii* de 50 aislamientos y cepas de referencia, incluyendo las secuencias determinadas en el presente estudio. Los haplogrupos clonales 1, 2 y 3 se encuentran sombreados, mientras que el resto de los aislamientos se distribuyen y diferencian en distintas ramas con diferente color. A la derecha, de algunos conjuntos de aislamientos, se indica el haplogrupo al que pertenecen (recuadro con “H” y número correspondiente). El cladograma se generó a partir del alineamiento de secuencias de MUSCLE, resaltando la ubicación de los aislamientos G32 y PERRO (P REP) (flechas) cercanos a los aislamientos del haplogrupo 1.

6.6 Correlación de las presentaciones de toxoplasmosis y genotipo de *T. gondii* determinado

6.6.1 Casos con lesiones agudas y crónicas

En seis casos de curso agudo, se pudo identificar el genotipo de *T. gondii* involucrado. En dos casos de monos ardilla provenientes del DF (DP), empleando el marcador SAG3, se determinó el genotipo I a partir de tejidos con lesiones asociadas a cuadros de toxoplasmosis aguda diseminada. En cuatro casos de canguros rojos provenientes de Guadalajara (ZG), se identificó el genotipo I con una banda extra (I/u-1), utilizando el marcador SAG3. Uno de los casos correspondió a un cuadro de toxoplasmosis aguda diseminada, similar al de los monos ardilla; otros dos fueron casos de reinfección y el último caso, asociado a un cuadro de coinfección con un agente infeccioso de tipo viral, presentándose lesiones más severas en comparación con el resto de los casos de tipo agudo (Cuadro 21). En el resto de los animales con lesiones de curso agudo no fue posible determinar el genotipo de *T. gondii* asociado.

En los casos de curso crónico, se logró identificar genotipos I y I/u-1 en tres casos de toxoplasmosis crónica neurológica, utilizando los marcadores GRA6 (un caso) y SAG3 (dos casos) (Cuadro 21). Los casos para genotipo I correspondieron a un canguro gris y un wallaby de Bennet, mientras que para el genotipo atípico se presentó en un segundo wallaby de Bennet. Los tres marsupiales provenían del mismo zoológico en la Ciudad de México (DGZVS), pero murieron en diferentes años (1999, 2002 y 2003).

6.6.2 Casos sin lesiones o asintomáticos

En cuatro animales (canguro gris, wallaby, jaguar y un oso negro) de un tercer grupo de animales que no presentó lesiones de curso agudo o crónico asociadas a infección por *T. gondii*, ni quistes tisulares u otros estadios y que murieron por diversas causas, se determinó genotipo I utilizando el marcador SAG3 (Cuadro 21). En el caso del oso negro, también se logró la genotipificación

utilizando el marcador GRA6, resultando en tipo I con bandas extra (I/u-1). De igual forma que los casos de marsupiales con lesiones crónicas, los animales provenían del mismo zoológico en la Ciudad de México (DGZVS), muriendo los cuatro animales en la misma época (2008), dentro de un periodo de seis meses aproximadamente. Los tres animales de donde se obtuvieron los aislamientos previos del LIE (G32, P REP, BOV), que por PCR-RFLP resultaron genotipo I, no tenían antecedentes de signos clínicos ni evidencia de lesiones o estadios parasitarios, por lo que se consideraron como casos asintomáticos.

Cuadro 21. Relación del tipo de presentación de toxoplasmosis y el genotipo de *T. gondii* identificados en el presente trabajo de investigación.

Presentación	Especie (# de caso)	Tejidos o muestra	Genotipo PCR-RFLP	
			GRA6	SAG3
Toxoplasmosis aguda diseminada	Mono ardilla (#21)	Pulmón	---	I
		Hígado	---	I
		Bazo	---	I
	Mono ardilla (#22)	Pulmón	---	I
Re-infección	Canguro rojo (#4)	Pulmón	---	I/u-1
	Canguro rojo (#5)	Pulmón	---	I/u-1
		Hígado	---	I/u-1
	Canguro rojo (#6)	Pulmón	---	I/u-1
		Estomago	---	I/u-1
	Canguro rojo (#9)	Pulmón	---	I/u-1
Toxoplasmosis crónica neurológica	Canguro gris (#10)	Encéfalo	---	I
	Canguro gris (#11)	Encéfalo	---	I
	Wallaby de Bennet (#12)	Encéfalo	I	---
	Wallaby (#13)	Encéfalo	---	I
	Wallaby (#18)	Encéfalo	---	I/u-1
Asintomático	Jaguar (#30)	Hígado	---	I
	Oso negro (#32)	Pulmón	---	I
		Encéfalo	I/u-1	---
---	Perro (P REP)	Aislamiento	I	---
	Gato (G32)	Aislamiento	I	---

7. DISCUSIÓN

7.1 Frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* y *N. caninum* en animales domésticos y fauna silvestre (estudio prospectivo)

Las frecuencias de *T. gondii* determinadas en las especies domésticas y en fauna silvestre fueron similares a lo descrito en otros países, con discretas variaciones. Así mismo, también fue posible determinar la frecuencia de anticuerpos contra *N. caninum*, evidenciando coinfección en los caninos del estado de Guanajuato.

7.1.1 Frecuencia de T. gondii en gatos

De las muestras de gatos callejeros y ferales estudiadas, se determinó una frecuencia general del 73.3% (11 de 15), la cual es mayor al compararla con la mayoría de los datos referidos por otros autores en diferentes partes de la República Mexicana.

En el Distrito Federal, Aparicio et al. (1987) determinaron una frecuencia del 63.0% a partir del estudio de 46 felinos, mientras que Besné-Mérida et al. (2008) analizaron 169 muestras de felinos domésticos, observándose una frecuencia del 21.8%. En el Estado de Durango, se han descrito dos estudios en esta especie (Alvarado-Esquivel et al., 2007b; Dubey et al., 2009c), informándose frecuencias del 21.0 y 9.3%, a partir de muestras de gatos domésticos y ferales, respectivamente.

Mundialmente se han documentado frecuencias altas de *T. gondii* (mayores al 65%) en gatos, tanto en Suramérica como en Europa, empleando diferentes técnicas (Dubey, 2010). Las causas de estos porcentajes pueden ser variables, incluyendo el tipo de población de gatos de donde se tomó la muestra, la región donde habitan, las costumbres de los propietarios, o la técnica de laboratorio empleada, entre otras (Dubey, 2010).

7.1.2 Frecuencia de *T. gondii* y *N. caninum* en perros

La participación de los caninos en la epidemiología de la enfermedad ha llamado la atención en la última década, al ser considerados como centinelas e indicadores de contaminación ambiental por ooquistes, favoreciendo la determinación de la presión infectiva de la región de estudio a la que están expuestos otros hospedadores incluyendo los humanos (Sedlak y Bartova, 2006; Lindsay y Dubey, 2014).

Los porcentajes obtenidos en los caninos estudiados, se encontraron dentro de los rangos descritos en la literatura internacional. Al compararse las frecuencias de los estados de Oaxaca y Guanajuato, 61.7% (96 de 154) y 29.4% (74 de 252) respectivamente, con lo informado por otros autores en el país, estas fueron diferentes.

Martínez-Maya (1986) determinó una frecuencia general del 46.3% en una población de 300 perros callejeros y de casa del D.F., al analizar por separado los resultados de cada grupos, la frecuencia en los perros callejeros (52.5%) fue mayor, que las de los animales de casa (34.0%). Dubey et al. (2007a, 2009c) determinaron la frecuencia de *T. gondii* en el estado de Durango en dos ocasiones, analizando primero 101 animales y 150 después, resultando en 51.5 y 45.3% respectivamente.

En el Estado de Oaxaca no se contaba con información sobre la frecuencia de *T. gondii* en esta especie, siendo la frecuencia determinada mayor que lo descrito en el D.F y el estado de Durango; contrastando lo encontrado en Guanajuato, la cual fue de menor porcentaje. Estos rangos de presentación, posiblemente, están asociados a diferentes factores propios de cada Estado e inherentes a la especie que fue estudiada, incluyendo el tipo de alimento y agua, condiciones ambientales, y factores agropecuarios, que pudieran estar favoreciendo el mantenimiento del ciclo biológico de *T. gondii* (Dubey, 2010).

En el caso del Estado de Guanajuato, la información obtenida se complementó al poder determinar la frecuencia de *N. caninum* (29.0%) en el mismo grupo de animales y del 20.6% para los casos de coinfección. Los datos

obtenidos son los primeros de este tipo descritos en el país e indicando coinfección asintomática. Solamente existe una referencia (Dubey et al., 2007a) donde se determinaron anticuerpos contra estos dos agentes: en caninos del Estado de Durango. Sin embargo, los animales seropositivos para *T. gondii* no fueron los mismos que para *N. caninum*, por lo que no pudo establecerse la presencia de co-infección.

7.1.3 Serología en felinos silvestres

En el caso de los dos felinos silvestres estudiados, ambos eran adultos y fueron seropositivos a la detección de anticuerpos contra *T. gondii*, teniendo antecedentes de problemas reproductivos (abortos, infertilidad, etc.) de igual forma que los observado en los otros animales con los que convivían, sugiriendo la probabilidad de cuadros de toxoplasmosis crónica congénita.

Dicha información hace notar la importancia en el estudio de *T. gondii* en estas especies en felinos silvestres en cautiverio, existiendo la posibilidad de que pudieran actuar como diseminadores de ooquistes, con un impacto directo en las poblaciones de diferentes animales pertenecientes a estas colecciones o zoológicos, ya sean particulares o públicos.

La seroprevalencia de *T. gondii* ha sido descrita prácticamente en casi todas las especies de felinos silvestres, incluyendo los 15 géneros y 41 especies de felinos agrupados en las subfamilias Felinae y Pantherinae, resultando todas positivas a la detección de anticuerpos. Los porcentajes han sido mayores en animales en cautiverio en comparación con los de vida libre. La toxoplasmosis clínica ha sido diagnosticada raramente en felinos de vida libre, presentándose la mayoría de los casos en cautiverio con cuadros de toxoplasmosis aguda (desarrollo de neumonía, hepatitis, peritonitis, miocarditis, encefalitis y toxoplasmosis diseminada), en animales jóvenes de zoológicos o colecciones particulares (Hill et al., 2004; Dubey, 2010; Cañón-Franco et al. 2013).

7.2 Presentaciones anatomopatológicas de toxoplasmosis

Las diferentes presentaciones clínico-patológicas de la infección por *T. gondii* han sido documentadas tanto en humanos como en varias especies de animales domésticos y fauna silvestre, siendo variables dichas presentaciones, llamando la atención la capacidad del parásito, de adaptarse y persistir por tiempos prolongados en varios hospedadores, incluso de por vida, generando infección asintomática crónica. Varios autores coinciden en que el grado de patogenicidad se asocia directamente con el tipo de *T. gondii* involucrado y el hospedador afectado; mientras que otros proponen que la idiosincrasia inmunológica, la genética del hospedador, la dosis infectante o el estadio de *T. gondii* participante, podrían ser factores que tienen una mayor importancia en el desarrollo de la enfermedad como tal (Dubey y Jones, 2008b; Dubey, 2010; De-la-Torre et al., 2014; Pfaff et al., 2014).

En el presente trabajo de investigación, se identificaron diferentes tipos de presentaciones clínico-patológicas (de curso agudo o crónico) y subtipos particulares (toxoplasmosis aguda diseminada, crónica neurológica, etc.). Por otro lado, los casos denominados como asintomáticos (sin evidencia morfológica de lesiones o estructuras parasitarias en cualquiera de sus estadios), prevalecieron, incluso en animales considerados como susceptibles, como fue en los canguros rojos la especie en las que se observó mayor número de presentaciones como tal.

7.2.1 Casos asintomáticos de toxoplasmosis

Cita la literatura, independiente de la especie de la que se trate, que la mayoría de los casos de toxoplasmosis son asintomáticos con tendencia a la cronicidad, o bien subclínicos con síntomas o signos mínimos, representando del 80 al 95% de las infecciones por este parásito (Hill et al., 2005; Dubey, 2010; Flegr et al., 2014).

En el estudio retro y prospectivo, se lograron determinar anticuerpos IgG y DNA del agente infeccioso en muestras de sangre en animales domésticos y silvestres que no presentaron signos clínicos de toxoplasmosis o antecedentes de

alguna de sus presentaciones. Así mismo, en los que fue posible realizar el estudios postmortem, no se evidenciaron lesiones macro o microscópicas sugerentes de infección por *T. gondii*, sin haber tampoco evidencia por IHQ.

Debido a estos resultados, todos los animales estudiados con estas características fueron considerados con infección asintomática, infectándose en algún momento de su vida, sin que se comprometiera su integridad y controlándose la diseminación parasitaria de forma eficiente, lo que restringió la cantidad de parásitos en los tejidos. En los casos de fauna silvestre, todos los animales con esta presentación murieron por causa de una enfermedad diferente a toxoplasmosis.

Alvarado-Esquivel et al. (2013e), estudiaron 167 animales de tres zoológicos de la Ciudad de México para la detección de anticuerpos contra *T. gondii*, determinando una frecuencia general del 53.3% (89 animales seropositivos de diferentes familias), refiriendo que ningún animal había presentado signos clínicos de enfermedad o mortalidad asociada a toxoplasmosis, previo y posterior a la toma de muestras para el estudio.

7.2.2 Toxoplasmosis aguda diseminada

De los casos sintomáticos, los de curso agudo fueron los que comprendieron más subpresentaciones. Los casos de toxoplasmosis aguda diseminada se presentaron en primates del Nuevo Mundo, prosimios y canguros rojos, independientemente de su procedencia. En estos casos, la causa de muerte se asocio con el desarrollo de insuficiencia respiratoria (debido a la neumonía intersticial y el edema pulmonar) y la presencia de múltiples lesiones necróticas con evidencia de estructuras parasitarias en diferentes órganos de las cavidades torácica y abdominal. En dichos casos, la presencia y distribución de taquizoítos se confirmó por IHQ, resultando inmunopositivos en los diferentes tejidos afectados. Las alteraciones descritas son similares a lo referido por otros autores, con variaciones discretas en su grado y distribución (Dubey, 2010; Epiphany et al., 2003; Fernandez-Aguilar et al., 2013).

Con base en los antecedentes clínicos, las lesiones a nivel del tubo digestivo (estómago e intestino) y la distribución de alteraciones necróticas en órganos parenquimatosos, sugieren que la diseminación y replicación de los parásitos se llevó a cabo en un periodo de tiempo corto después de la infección, sin que los animales pudieran controlarla, comprometiendo su integridad, muriendo durante el curso agudo de la enfermedad. Independientemente de la especie de la que se tratara, el patrón de lesiones fue similar en todos los animales afectados. Sin embargo, el grado de lesiones necróticas fue menor en los primates del nuevo mundo y prosimios, en comparación con las alteraciones en los marsupiales australianos; por otra parte, la neumonía intersticial en los primates fue más efusiva o permeable (mayor cantidad de edema) que la observada en el resto de los animales, caracterizándose por una mayor proliferación de neumocitos. Dichos cambios sugieren, que los primates del Nuevo Mundo, son los menos eficientes en controlar la infección por *T. gondii*, así como compensar el progreso de las alteraciones y lesiones, muriendo incluso de forma sobreaguda, seguido de los prosimios y marsupiales australianos, los cuales desarrollan lesiones francas de curso agudo; esto posiblemente asociado al diversos factores como genotipo de *T. gondii* involucrado, grado de susceptibilidad del hospedador o situación de la respuesta inmune de cada especie afectada al momento de la infección.

7.2.3 Co-infección (subtipo de toxoplasmosis aguda diseminada)

La co-infección de *T. gondii* con otros agentes infecciosos ha sido principalmente descrita en animales domésticos de compañía (perros y gatos). En estos casos los animales afectados, generalmente cursan con cuadros clínicos más graves y exacerbados. La co-infección se presenta con mayor frecuencia en animales jóvenes, asociada a inmunodepresión por procesos infecciosos de origen viral, principalmente por la infección con el virus de moquillo canino en el caso de los perros y por retrovirus en el caso de los felinos, siendo probable que la inmunodepresión generada por el virus, disminuya la resistencia a la infección

preexistente por *T. gondii*, por lo que el animal sucumbe a la infección combinada. *T. gondii* se considera un agente oportunista en los perros y las principales presentaciones son cuadros respiratorios, gastrointestinales y neuromusculares, en los que los signos clínicos usualmente se caracterizan por la presencia de ataxia, diarrea y diestres respiratorio (Ahmed et al., 1983; Silva et al., 1997; Dubey et al., 2008b, 2009b; Dubey, 2010; Headley et al., 2013; Lindsay y Dubey, 2014).

Dentro de la relación de los casos estudiados en el presente trabajo de investigación, en tres de ellos se pudieron identificar lesiones sugerentes de coinfección viral, además de presentar lesiones de curso agudo.

El primer caso correspondió a un felino doméstico, apreciándose lesiones en órganos linfoides compatibles con replicación viral (enteritis necrótica, atrofia linfoide, linfonecrosis y apoptosis, entre otras), sugerente de infección por parvovirus felino. Con base en el grado y distribución de las lesiones, las alteraciones asociadas a la infección por *T. gondii* fueron más leves que las virales, así como el número de parásitos que se observaron (que fue de leve a moderada cantidad), indicando que la infección parasitaria fue posterior a la viral, pero concomitante para causar la muerte del animal.

Los otros dos casos correspondieron a dos canguros rojos (diferentes a los de reinfección), cuyas lesiones fueron más severas, exacerbadas y con mayor extensión en comparación con el resto de los animales con lesiones de curso agudo. En estos casos se encontraron estructuras compatibles con cuerpos de inclusión intranucleares intralesionales sugerentes de herpesvirus, los cuales estaban adyacentes a las zonas donde también se observaron taquizoítos de *T. gondii* intralesionales, en por lo menos tres órganos afectados (pulmón, hígado y bazo). Es posible que los agentes infecciosos involucrados actuaran sinérgicamente, causando la muerte por la extensión de las lesiones necróticas y la afección a los órganos linfoides. Este tipo de sinergia entre la infección por *T. gondii* y un herpesvirus, no ha sido descrita en la literatura científica en estas especies.

A la fecha, a partir de macropodos, se han identificado cuatro diferentes tipos de herpesvirus: tres alfaherpesvirus, herpesvirus-macropodido 1, 2 y 4 (MaHV-1, MaHV-2, MaHV-4) (Johnson et al., 1985; Vaz et al., 2013) y un gammaherpesvirus, herpesvirus macropodido-3 (MaHV-3) (Smith et al., 2008; Wilcox et al., 2011); los cuales pueden desencadenar diferentes tipos de cuadros clínicos, tanto en canguros como en wallabys, causando lesiones en órganos similares a los afectados por *T. gondii*, apoyando la posibilidad del desarrollo de coinfección entre dichos agentes, bajo las condiciones ambientales adecuadas.

En el caso de los canguros rojos, con el fin de reforzar el planteamiento de co-infección, posterior al término de la parte experimental del presente trabajo de investigación, se evaluaron por inmunohistoquímica para el diagnóstico de herpes simple 1 y 2, secciones de pulmón, hígado y bazo de ambos animales. En hígado, se apreció a nivel del citoplasma de los hepatocitos, cúmulos inmunopositivos bien definidos para ambos marcajes, considerándose los tejidos como positivos para herpesvirus. Independiente de este resultado, se continuara la confirmación del agente viral por medio de técnicas moleculares, para generar la mayor cantidad de información y respaldar los resultados previos.

7.2.4 Re-infección (subtipo de toxoplasmosis aguda diseminada)

Los casos de reinfección por *T. gondii* están poco documentados en la literatura científica, siendo la mayoría de la información generada a partir de casos en humanos y escasos informes en animales domésticos y fauna silvestre (Elbez-Rubinstein et al, 2009). Sin embargo, en estas últimas especies, se han descrito diferentes datos que permiten sugerir que la reinfección ocurre con mayor frecuencia de lo estimado o descrito.

Por una parte, varios autores han referido la presencia de anticuerpos contra *T. gondii* en animales clínicamente sanos (los cuales a su vez también han sido considerados como susceptibles al desarrollo de enfermedad por *T. gondii*), encontrándose prevalencias de 3.3% en wallabys (*Macropus rufogriseus*), 15.5% en canguro gris del oeste (*Macropus fuliginosus*), 17.7% en demonios de Tasmania

(*Thylogale billardieri*) y hasta del 26.15% en wombats (*Vombatus ursinus*). Dichos datos, son indicativos de una primera exposición a *T. gondii*, sugiriendo que la diseminación parasitaria pudo haber sido controlada, evitando la mortalidad de los animales (Dubey y Beattie, 1988; Basso et al., 2007; Parameswaran et al., 2009; Pan et al., 2012). En otro conjunto de publicaciones, se proveen datos para corroborar cuadros de reinfección, en los que, si bien se describen casos con lesiones de curso agudo causando mortalidad en los animales afectados, éstos a su vez presentaban quistes tisulares en encéfalo, miocardio o músculo esquelético, sin respuesta celular (o esta es mínima). Dichos hallazgos, son los que se pueden llegar a presentar en cuadros de curso crónico (Dubey y Crutchley, 2008; More et al., 2010; Parameswaran et al., 2010).

En el presente trabajo de investigación, tres casos (dos de canguros rojos y uno de mono ardilla) presentaron lesiones de curso agudo diseminadas, aunado a la presencia de quistes tisulares en miocardio y encéfalo, sugiriendo que los animales sobrevivieron a la primo infección, pero murieron al exponerse a una siguiente infección con el desarrollo de lesiones agudas. Las causas por las cuales fueron más severas las lesiones en la reinfección pueden ser diversas, entre las que se incluyen la cantidad del inóculo ingerido, el tipo de estadio o el genotipo de *T. gondii* involucrado.

7.2.5 Toxoplasmosis aguda intestinal

Otro subtipo de presentación fue la de toxoplasmosis aguda intestinal, la cual se observó en una cría de delfín del Atlántico que nació en cautiverio, la cual murió por un cuadro de gastroenteritis aguda. Microscópicamente se revisaron secciones de pulmón e intestino, observándose las lesiones más graves y extensas en el último órgano, con una gran cantidad de estructuras parasitarias en diferentes estadios de división en el interior de los enterocitos, las cuales resultaron inmunopositivas a *T. gondii*. Dichos estadios fueron similares a los descritos en la fase sexual del ciclo biológico de *T. gondii*, observándose esquizontes en maduración y en división, con diferentes tipos de merozoítos, así

como estructuras compatibles con macro y microgametos. Al revisar las secciones de pulmón, no se apreciaron alteraciones sugerentes de replicación parasitaria como en los casos de toxoplasmosis aguda diseminada, detectándose por inmunohistoquímica, taquizoítos libres en escasa cantidad. Al comparar el grado de lesión y extensión de dichos cambios con los presentes a nivel de tubo digestivo, la causa de muerte se asoció a las extensas zonas de necrosis a nivel intestinal por la continua replicación parasitaria, generando un cuadro hiperagudo con afección regional y escasa parasitemia diseminada. Los hallazgos microscópicos del presente caso son particularmente interesantes ya que presentan elementos característicos de estadios de reproducción sexual de tipo coccidia, similares a los descritos en los hospedadores definitivos del ciclo biológico de *T. gondii*, que son los felinos domésticos y silvestres. Algunas referencias en la literatura plantean casos similares en mamíferos marinos en los que, se identificarón otros parásitos Apicomplexa, o bien, sin poder asociar de forma contundente a *T. gondii* en las alteraciones intestinales descritas en cada caso (Dubey, 2010).

Dubey y colaboradores (2002a) describieron un caso de coccidiosis intestinal en una cría de delfín listado (*Stenella longirostris*) de vida libre en las costas de Hawaii, E.U. Microscópicamente se apreció neumonía intersticial subaguda y enteritis necrótica multifocal a lo largo de toda la mucosa, con numerosas estructuras parasitarias intracelulares compatibles con protozoarios Apicomplexa en diferentes estadios de maduración incluyendo esquizontes (uninucleados a multinucleados), gametocitos femeninos y ooquistes. Los hallazgos se confirmaron por microscopía electrónica de transmisión, observándose aspectos morfológicos y organelos propios de la familia (conoide, micronemas, roptrias, etc). La causa de muerte del animal se asoció a debilidad por inanición, enteritis por coccidias y la neumonía intersticial moderada. Morfológicamente, los protozoarios estudiados se describieron como coccidias, debido a que no se pudo identificar el género al que correspondía.

Colegrove et al. (2011) estudiaron en 5 leones marinos de California (*Zalophus californianus*) y en una foca vitulina (*Phoca vitulina*), con lesiones intestinales asociadas a infección por protozoarios Apicomplexa. En este informe, se observaron múltiples estadios de parásitos intracelulares, incluyendo esquizontes con merozoitos así como gametocitos esféricos (micro y macrogamontes), cuya morfología era compatible con coccidias. La presencia de parásitos se confirmó por microscopia electrónica de transmisión. Serológicamente, los animales resultaron negativos a la detección de anticuerpos IgG contra *T. gondii*, *S. neurona* y *N. caninum*. Por inmunohistoquímica, las estructuras parasitarias resultaron inmunopositivas contra *T. gondii* utilizando tres diferentes antisueros policlonales. Sin embargo, al utilizar anticuerpos monoclonales, sólo se detectó marcaje parcial para enolasa, por lo que el diagnóstico de *T. gondii* se consideró no concluyente y el marcaje para *S. neurona* y *N. caninum* resultó negativo. Por PCR, las muestras de tejido intestinal resultaron negativas para el gen B1, el cual es específico de *T. gondii*.

El presente caso del delfín del Atlántico tiene que ser tomado con reserva pero considerando su relevancia biológica, ya que al haberse identificado estadios correspondientes del ciclo sexual de *T. gondii* y otras coccidias, los hallazgos sugieren que el delfín afectado podría considerarse como un hospedador definitivo dentro del ciclo de vida de *T. gondii*, como lo han planteado otros autores para diversas especies acuáticas. Esto podría dar la pauta para la descripción del mecanismo por el cual *T. gondii* afecta a diferentes mamíferos marinos, tanto cetáceos como pinnípedos, con desarrollo de diferentes cuadros de toxoplasmosis, incluyendo cuadros de curso agudo y crónicos, así como la potencial presencia de co-infecciones. Sin embargo, aunque los estadios identificados intestinalmente fueron inmunopositivos por dos técnicas, los antisueros empleados fueron policlonales, y por lo tanto, existiendo la posibilidad de que crucen y marquen otros parásitos Apicomplexa.

De forma similar a los casos de co-infección en canguros rojos, posterior al término de la parte experimental del presente trabajo de investigación, el DNA

extraído de la sección de intestino delgado del delfín fue evaluada por PCR en tiempo real, utilizando como blanco al gen multicopia B1 específico de *T. gondii*, resultando la muestra positiva al ensayo, la cual se corrió por triplicado. Independiente del resultado, el caso se continuara analizando por técnicas moleculares para otros marcadores de *T. gondii* multicopia en punto final, marcadores para PCR-RFLP e intentar su genotipificación, así como montar una PCR punto final para actina u otro componente del citoesqueleto, específico de tejido de delfín, que respalde la información generada a la fecha.

7.2.6 Toxoplasmosis crónica neurológica

A diferencia de los casos considerados “asintomáticos”, por la ausencia de estructuras parasitarias, en este tipo de presentación predominó la presencia de quistes tisulares como alteración principal, con leve a moderada cantidad de estructuras en la mayoría de los casos, siendo todos en marsupiales australianos, así como dos casos de monos ardilla, clasificados previamente como reinfección.

Esta presentación y la toxoplasmosis aguda diseminada, son las que más se han documentado en la literatura en una amplia variedad de especies (Dubey y Jones, 2008; Dubey, 2010; Lindsay y Dubey, 2014).

El quiste tisular es una parte integral del ciclo de vida de *T. gondii* y puede ser formado a partir de los tres días postinfección. Además de sistema nervioso, ojo y músculo esquelético, los quistes tisulares se pueden desarrollar en prácticamente cualquier órgano visceral. La distribución y cantidad de dichas estructuras, es controlada en parte por el hospedador infectado, siendo variable entre cada especie, y en algunas de ellas, presentándose un mayor número en músculo esquelético que en el encéfalo. Dichas observaciones se han descrito tanto de forma experimental como bajo infección natural. Particularmente, en el ratón, el encéfalo es el órgano que puede llegar a contener mayor cantidad de quistes tisulares; incluso se pueden llegar a observar cúmulos de quistes tisulares en ratones infectados con cepas particulares de *T. gondii*, y en algunos casos los animales se observan clínicamente sanos. El grosor y la definición de la pared

varían dependiendo de la cronicidad de la infección y la célula parasitada. Por otra parte, la ruptura de quistes tisulares esta poco documentada, sin embargo se ha descrito que puede llegar a presentarse con subsecuente multiplicación de los zoítos y conducir a un cuadro de toxoplasmosis fulminante, incluso en ratones infectados crónicamente (Dubey y Frenkel, 1976; Ferguson et al., 1991; Dubey, 1997a, 1997b, 2010; Knoll, Tomita y Weiss, 2014).

En algunos de los animales estudiados, la presencia de quistes tisulares se acompañó de respuesta celular (gliosis o inflamatoria), sugiriendo su exposición, o reactivación con la subsecuente invasión del parénquima nervioso, estimulando la consecuente respuesta del hospedador afectado. Así mismo, dichos hallazgos coincidieron con algunas de las historias clínicas, en las que se refirió manifestación de signos nerviosos previos a la muerte de los animales. Por otra parte, en el resto de los casos, que además no tenían antecedentes clínicos de signología nerviosa, los animales presentaron quistes tisulares sin la presencia de alguna otra alteración relacionada. Otros datos que llamarón la atención de esta presentación, fueron los siguientes:

- La distribución de los quistes tisulares prevaleció a nivel de encéfalo medio, abarcando tanto la corteza como el tallo cerebral, de forma similar a lo descrito por otros autores en otras especies.
- En el caso de los wallabys, los quistes tisulares eran de tamaño discreto y característicamente la pared no era visible o era muy delgada, probablemente por el poco tiempo o cronicidad con que se habían desarrollado en el tejido.

7.2.7 Toxoplasmosis crónica congénita

La presentación de toxoplasmosis más frecuente en los ovinos es la asociada a transmisión congénita, siendo por lo general asintomática en la madre y con diferente efecto clínico-patológico en los productos afectados. Dependiendo del tercio de la gestación en el que se infectó la madre, las posibilidades de transmisión y posterior daño al producto pueden variar y generar diferentes

secuelas. Por ejemplo, la infección materna temprana (durante el primer y segundo tercio) puede generar lesiones en la placenta o un estímulo exagerado de la respuesta inmune, causando muerte fetal, reabsorción o aborto. En contraste, la infección materna durante el tercer trimestre usualmente resulta en toxoplasmosis subclínica en los recién nacidos. En estos últimos casos, la infección aguda tiende a la cronicidad con la formación de quistes tisulares (por efecto y control de la respuesta inmune del hospedador) con o sin posteriores secuelas en sistema nervioso y ojo, principalmente (Elbez-Rubinstein et al, 2009; Dubey, 2010; Benavides et al., 2011).

Del total de casos analizados, uno correspondió a esta presentación, coincidiendo en la mayoría con lo descrito en la literatura. El caso fue de un cordero neonato originario de Sinaloa, en el que se observaron abundantes quistes tisulares persistentes (más de 14) en una sola sección de encéfalo medio (corte coronal a nivel del tálamo). Si bien la presencia de los quistes tisulares es característica de toxoplasmosis congénita e indicativa de infección de la madre en el último tercio de la gestación, es importante destacar los siguientes hallazgos microscópicos:

- La cantidad de quistes tisulares en relación a la superficie de tejido evaluado es abundante, comparada con el resto de los casos de otras especies, en los que fue necesarios fue necesario revisar más de tres regiones neuroanatómicas por animal (toxoplasmosis neurológica), encontrando de uno a cuatro quistes tisulares.
- Los quistes tisulares encontrados a nivel del tallo cerebral aparentemente fueron de mayor tamaño y con pared más gruesa en comparación con los de la corteza. Es posible que la vascularización favorezca una diseminación más temprana en el tallo cerebral y posteriormente a la corteza, explicando a su vez un mayor grosor de la pared por una mayor longevidad o formación más temprana del quiste tisular.
- Independientemente de su localización neuroanatómica, los quistes tisulares se encontraban viables con inmunopositividad homogénea, sin

observarse adyacente a ellos, gliosis o respuesta inflamatoria no supurativa. Así mismo, tampoco se observaron focos de mineralización o distensión de ventrículos laterales, las cuales son otras lesiones frecuentes en este tipo de casos.

- La única zona con alteraciones mínimas fue en la sustancia blanca de la transición de la corteza con el tallo cerebral (con presencia de gliosis y degeneración de sustancia blanca leve zonal) sin poderse asociar a la infección por *T. gondii*, independiente de que se evaluaran tres cortes diferentes de la misma zona en. Tampoco hubo evidencia de vestigios de pared de quistes tisulares inmunopositivos.
- De forma general, las neuronas presentaron cambios degenerativos de leves a moderados, con satelitosis y neuronofagia aleatoria, sugiriendo además de la infección crónica congénita por *T. gondii*, otro posible proceso asociado de tipo nutricional, metabólico o incluso tóxico.

Los hallazgos microscópicos antes mencionados son similares a lo referido en la literatura, siendo descritos en ovinos y otras especies, tanto en infecciones naturales como experimentales (Ferguson et al., 1991; Dubey, 1997a, 1997b, 2010; Elbez-Rubinstein et al, 2009; Benavides et al., 2011; Dellacasa-Lindberg et al., 2011).

7.3 Genotipos de *T. gondii* determinados a partir de casos de animales domésticos y fauna silvestre

Los genotipos de *T. gondii* determinados en el presente estudio correspondieron a tipo I (clonal) y tipo I con bandas extra (I/u-1, no clonal), esto mediante PCR-RFLP, independientemente del tejido estudiado (Ej.: pulmón, hígado, bazo, linfonodo, corazón, encéfalo, entre otros) o de la especie involucrada (Ej.: primates, marsupiales, carnívoros, etc.). Los resultados contrastan con lo publicado en México, observándose diferencias y similitudes, que se pueden delimitar en tres aspectos principales:

- Los aislamientos provenientes del Estado de Durango corresponden a genotipos recombinantes y atípicos (Dubey et al., 2009c, 2013a; Alvarado-Esquivel et al., 2011f); de los cuales los aislamientos #9, 74 y 222 difieren al tener alelos tipo II y III para los marcadores SAG3 y GRA6. Por otra parte, los aislamientos con genotipos #73 y 155 fueron similares al presentar alelos tipo I para el marcador SAG3. Sin embargo, ninguno de los genotipos de Durango se observaron bandas extra (I/u-1) para SAG3 o GRA6.
- Un segundo grupo de aislamientos a partir de gallinas de traspatio del valle de México con genotipo III clonal (ToxoDB #2), difieren con lo determinado en los animales estudiados (Dubey et al, 2004, 2009c).
- El último grupo corresponde a genotipos determinados de casos clínicos perinatales de toxoplasmosis en humanos, del valle de México e Hidalgo (Rico-Torres et al., 2012), los cuales presentaron diferente signología y progreso. El análisis de las diferentes muestras con cuatro marcadores para PCR-RFLP (SAG2, SAG3, GRA6 y BTUB) puso en evidencia genotipos I y I/u-1, con diferente distribución en los marcadores utilizados, siendo dos casos genotipo I y los otros dos considerados atípicos, aunque con diferencias entre ellos. Los genotipos determinados a partir de los animales estudiados en el presente estudio son similares a los mencionados en estos casos perinatales. Incluso en dos de los casos de humanos, a partir de muestras de leucocitos empleando el marcador SAG3, se determinó genotipo I, siendo el mismo que se identificó en la mitad de las muestras de diferentes animales del presente estudio.

7.4 Genotipos de *T. gondii* determinados a partir de aislamientos previos

Los tres aislamientos estudiados resultaron genotipo I (ToxoDB #10) por PCR-RFLP, para los cuatro marcadores genéticos empleados (SAG2, SAG3, GRA6, BTUB), siendo diferentes a lo documentados en el país, pero similares a los genotipos determinados en otros hospedadores a nivel mundial.

Al presentar alelos tipo I para todos los marcadores, también pueden ser considerados o clasificados como genotipos pertenecientes al haplogrupo 1, de tipo clonal o clásico, con distribución en América del Norte y Europa, principalmente (Su et al., 2012; Shwab et al., 2014).

De los tres aislamientos, sólo se pudieron analizar bioinformáticamente las secuencias (GRA6) de dos de ellos, obteniéndose una mayor resolución en comparación con el PCR-RFLP, lo que generó datos relevantes y particulares:

- El aislamiento P REP presentó 100% de similitud con el genotipo OkiTp-123-GB (haplogrupo 1), descrito por Zakimi et al. (2006). En dicha publicación, se analizaron linfonodos de cerdos con lesiones necróticas o hemorrágicas sugerentes de infección por *T. gondii*. Se determinaron por secuenciación de una región del gen GRA6, genotipos II (2 aislamientos) y 9 genotipos con diferencias puntuales en la secuencia de nucleótidos en comparación con los clonales, encontrándose el genotipo OkiTp-123-GB adyacente al genotipo clonal RH, tipo I, dentro del cladograma construido. El dato más relevante implica que dichos animales eran originarios de una isla en Japón, sin tener una relación aparente con el aislamiento del presente estudio. La información obtenida correspondió a un solo gen, por lo que este dato tiene que ser tomada con reserva, ya que existe la posibilidad de que aunque estén descritos varios cambios polimórficos en dicho marcador, éste sea más conservado que lo estimado a la fecha y su distribución filogenética sea mayor a nivel mundial.
- El aislamiento G 32 presentó 99% de similitud con cepas del haplogrupo 1 (RH, GT1, etc.), teniendo diferencias discretas y puntuales en la secuencia, por lo que es posible sugerir de que se trate de un genotipo único en el país. Sin embargo, de igual manera que el aislamiento anterior, la información generada tiene que ser interpretada con reserva, ya que se requiere realizar un análisis genético más amplio, para obtener mayor información y resolución del genoma estudiado, que permitan definir y caracterizar dicho aislamiento.

7.5 Correlación anatomopatológica y molecular de casos de toxoplasmosis y aislamientos previos

7.5.1 Casos en marsupiales australianos

A la fecha, los estudios en los que se relaciona el patrón de lesiones por la infección de *T. gondii* y el genotipo involucrado son escasos. Solamente hay cuatro referencias en la literatura científica en los que se describen esta relación: en wallabys con ceguera y signos nerviosos (en Estados Unidos), con genotipo III identificado; en canguros con toxoplasmosis diseminada (en Argentina), con presencia de genotipos II y III; canguros de Australia con signología nerviosa y muerte súbita, con genotipos atípicos; y en wallabys de España, con toxoplasmosis diseminada se identificó un genotipo atípico por microsatélites (Dubey y Crutchley, 2008; More et al., 2010; Parameswaran et al., 2010; Fernández-Aguilar et al., 2013).

En el presente trabajo de investigación, los casos de toxoplasmosis en los marsupiales australianos fueron los que tuvieron una mayor variación clínico-patológica (así como subpresentaciones), incluyendo toxoplasmosis aguda diseminada, reinfección, coinfección, toxoplasmosis crónica y casos asintomáticos. Los genotipos identificados fueron I y I/u-1, sin tener alguna asociación aparente con el tipo de presentación.

Sin embargo, al analizar por separado cada especie, los canguros rojos, provenientes de Guadalajara, sólo presentaron genotipos I/u-1 asociados a cuadros de curso agudo (diseminada, reinfección y coinfección); mientras que en los canguros grises con presentación crónica neurológica y asintomática, el genotipo correspondió a tipo I. Los wallabys por otra parte, tuvieron ambos genotipos en casos de toxoplasmosis crónica neurológica, con o sin respuesta inflamatoria o glial. Todos los canguros grises y wallabys fueron procedentes de la Ciudad de México.

Los hallazgos antes mencionados en dichas especies corresponden a la primera descripción y clasificación anatomopatológica detallada en el país, y que

presenta la correlación del genotipo asociado directamente a la lesión o con evidencia de la presencia de estructuras parasitarias en cada tejido evaluado. Bajo este esquema, se observaron diferencias al compararlos con casos descritos en la literatura mundial. En varias de las referencias, la identificación o aislamientos de *T. gondii*, fue a partir de un tejido diferente (músculo o encéfalo, cuyos quistes tisulares que tuvieran podrían ser de una infección previa) de los que se encontraban afectados con lesiones necróticas y causaron la muerte en cada caso o al conjunto de animales involucrados (More et al., 2010; Parameswaran et al., 2010; Fernández-Aguilar et al., 2013). El único artículo donde se evaluaron las lesiones producidas por *T. gondii* y el genotipo asociado, es el de Dubey y Crutchley (2008), en el cual los aislamientos de *T. gondii* de wallabys con cuadros de encefalitis y ceguera, resultaron genotipo II para un solo marcador (SAG2) estudiado.

Recientemente, Pan y colaboradores (2012) describieron la genotipificación de *T. gondii* en 16 macrópodos adultos (*Macropus rufus*, *M. fulginous* y *M. robustus*) de vida libre, del oeste de Australia, los cuales no presentaban signos clínicos aparentes previo a su deceso. De cada animal, se recolectaron muestras de diferentes tejidos, extrayéndose el DNA por separado, haciendo el diagnóstico por PCR y realizando su genotipificación por secuenciación, utilizando como blanco los genes B1, SAG2 y SAG3. De las 80 muestras de tejido evaluadas, 45 resultaron positivas por lo menos para uno de los tres marcadores. Considerando al gen B1 como marcador diagnóstico, los 16 animales tuvieron por lo menos una muestra positiva, 13 macropodos tenían infección en más de un órgano y dos animales resultaron positivos en los cinco tejidos evaluados. Así mismo, se encontró evidencia de infección múltiple en los animales estudiados, al identificarse en diferentes tejidos de un mismo animal, distintos genotipos. El análisis de las secuencias de los tres marcadores permitió la identificación de 45 genotipos diferentes, siendo la gran mayoría distintos a los genotipos clonales clásicos (I, II y III).

Este último concepto de infección múltiple también se pudo evidenciar en los marsupiales del presente trabajo de investigación, correspondiendo a los casos de reinfección, que se presentaron en más de un animal. Dicha situación, apoyado por lo referido en la literatura científica, proporciona un precedente para proponer que estas especies realmente no son tan susceptibles como se ha considerado a la fecha, y que podrían ser otros los factores, los que podrían estar favoreciendo el desarrollo de enfermedad y mortalidad independiente del genotipo asociado, incluso si se tratara de genotipos considerados virulentos, como son los tipo I o atípicos.

7.5.2 Casos en primates del Nuevo Mundo

En este grupo de animales, solo se observó la presentación de toxoplasmosis aguda diseminada con lesiones menos severas que las descritas en los marsupiales australianos, pero suficientes para causar la mortalidad en estas especies. Lo anterior permite considerar a los primates del Nuevo Mundo como las especies más susceptibles de fauna silvestre, sin que sea necesario el desarrollo y progreso de lesiones más graves y extensas.

A pesar de que la gran mayoría de las muestras evaluadas por PCR resultaron positivas, solamente en dos casos de monos ardilla, se logró identificar en diferentes tejidos con lesiones de curso agudo, el genotipo de *T. gondii* asociado, el cual resulto ser de tipo I.

De forma similar que en los marsupiales australianos, los hallazgos encontrados en los primates del Nuevo Mundo son los primeros descritos en el país, y los terceros documentados en la literatura científica, con diferente genotipo involucrado, independiente del curso agudo descrito en dichas publicaciones (Salant et al., 2009; Carme et al., 2009). Cabe señalar, que independiente del genotipo involucrado, el desarrollo de lesiones es similar en estas especies.

Salant et al. (2009) estudiaron un brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla en Israel, en el que se detecto una seropositividad del 79.1% (19 de 24 animales). De estos, 7 monos ardilla murieron (5 seropositivos y dos

negativos), sin presentar alteraciones aparentes al estudio postmortem, sin embargo por histopatología se apreciaron lesiones de curso agudo con presencia de estructuras parasitarias compatibles con taquizoítos. Por PCR, muestras de pulmón e hígado de los siete animales resultaron positivas, así como de miocardio (6 de 7) y encéfalo (5/7). Las muestras de tres animales se genotipificaron por PCR-RFLP utilizando el marcador SAG2, identificando en todos los animales, un genotipo III involucrado.

En el mismo año, Carme y colaboradores (2009) describieron dos brotes de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla de un centro de investigación en la Guyana Francesa. El primer brote se presentó en el 2001, en animales que habitaban dos jaulas contiguas, con signos clínicos que incluían astenia, dificultad respiratoria y abundante descarga oronasal; muriendo un total de 22 animales. El 2do brote se presentó en el 2006 en dos episodios: en el primero cinco monos murieron 48 horas después de presentar signos similares a los del brote del 2001, conviviendo dichos animales con otros 35 en dos jaulas adyacentes. Tres semanas después, se presentó el segundo episodio, en el que enfermaron 20 de 35 animales con signos similares, muriendo todos dentro de las 36 horas posteriores a la manifestación de signos clínicos. El diagnóstico molecular se realizó mediante PCR a partir de tejidos congelados de la mortalidad de ambos brotes (2001 y 2006) y de muestras de sangre del segundo (2006); utilizando como blanco una región repetitiva de 529 pb. En ambos brotes, muestras de pulmón, hígado, bazo, corazón y sangre, de 6 de 8 animales resultaron positivas. La genotipificación se realizó empleando 12 microsatélites, identificándose dos genotipos diferentes, uno para los animales del brote del 2001 y otro para los monos de los dos episodios del 2006, presentando ambos aislamientos la mayoría de los microsatélites con alelos para genotipo II y los restantes con alelos de genotipos no clásicos o atípicos.

7.5.3 Casos en carnívoros silvestres

En el presente trabajo de investigación fue posible estudiar tres casos de carnívoros silvestres, identificando en dos de ellos el genotipo de *T. gondii* involucrado.

El primer caso correspondió a un jaguar (*Panthera onca*), el cual al no presentar lesiones asociadas a infección por *T. gondii* ni presencia de estructuras parasitarias, se incluyó en los casos asintomáticos. El animal cursaba con un cuadro de enfermedad proliferativa (leucemia), muriendo por el progreso y diseminación de la neoplasia. Después de analizar por PCR diferentes muestras de tejido con los marcadores antes mencionados, en algunas de ellas se pudieron obtener bandas tenues para el marcador SAG3. Posteriormente, mediante la digestión enzimática del producto de amplificación, se logró evidenciar un patrón de bandas genotipo I. Durante el progreso de su enfermedad, no se observaron signos clínicos de alguna otra entidad, incluyendo agentes infecciosos; así mismo, en la evaluación postmortem no hubo evidencia de lesiones agudas o crónicas de *T. gondii*, sugiriendo que a pesar de tratarse de un genotipo I, este no fue virulento para dicho hospedador, ni tampoco se reactivó independiente cursara con un condición de inmunosupresión por efecto de la enfermedad neoplásica. La única referencia sobre el genotipo de *T. gondii* documentado a la fecha a partir de un jaguar (de vida libre o en cautiverio), es la de Demar et al. (2008), quienes describen la identificación del genotipo X (haplogrupo 12), a partir del estudio de diferentes muestras de dicho animal, procedente de la Guyana Francesa. Dicha información difiere con lo documentado en el presente caso.

La toxoplasmosis clínica ha sido diagnosticada raramente en felinos de vida libre, presentándose la mayoría de los casos con cuadros de toxoplasmosis aguda diseminada o cuadro diarreicos principalmente en animales jóvenes de zoológicos o colecciones particulares (Dorny y Fransen, 1989; Lukesova y Literak, 1998; Hill et al., 2005; Dubey, 2010;). En los últimos años, la identificación de distintos genotipos de *T. gondii* en felinos con o sin signos clínicos, tanto en cautiverio como en vida libre y en diferentes partes del mundo, se ha incrementado y

caracterizado de una forma más amplia en diversas especies, identificándose genotipos clónales (I, II, III y haplogrupo 12, antes X y A), recombinantes y atípicos (haplogrupo 11, genotipo #222) (Aramini et al., 1998; Dubey et al.,; Miller et al., 2004; Alerte, 2008; Dubey et al., 2008c; 2010a; Pena et al., 2011; Vitalino, 2012; Dubey et al., 2013a, 2013b; Cañón-Franco et al., 2013; Herrmann et al., 2013).

El segundo caso correspondió a un oso negro americano (*Ursus americanus*), que de forma similar al caso anterior, no presentó lesiones asociadas a infección por *T. gondii* ni presencia de estructuras parasitarias, muriendo el animal de un cuadro de insuficiencia renal crónica. Al evaluar los tejidos por PCR y PCR-RFLP, fue el único caso donde se obtuvo información de dos marcadores, determinando con SAG3 genotipo I y con GRA6 genotipo I/u-1. Con base en estos resultados, el genotipo del caso se consideró como atípico, siendo distinto al compararlo con los genotipos determinados en las demás especies del presente estudio.

En ursidos de vida libre o de cautiverio no se han descrito cuadros clínicos de toxoplasmosis. La identificación de anticuerpos contra *T. gondii*, el aislamiento y la genotipificación, solamente se ha documentado en ursidos de Canadá, Estados Unidos y Noruega. La seroprevalencia se ha descrito en oso polar (*Ursus maritimus*) del 0.0 al 21.4%, en oso grizli (*Ursus arctos*) del 0.0 al 25% y en oso negro del 15.0 al 84.0% (*Ursus americanus*). En esta última especie, es en la única en la que se han logrado aislamientos por bioensayo en ratón y gato (a partir de muestras de corazón principalmente), genotipificándose por PCR-RFLP multilocus, identificándose los tipos clonales (I, II, III) y recombinantes (II/III y I/II/III) (Dubey et al., 2008c, 2010b, 2013b; Lindsay y Dubey, 2014).

Recientemente, Dubey y colaboradores (2013b), estudiaron 66 osos negros del estado de Maryland, EU, determinando anticuerpos contra *T. gondii* en el 25.7% (17 de 66) de los animales mediante aglutinación modificada. Posteriormente por bioensayo en ratón, se obtuvieron tres aislamientos, que al genotipificarse por PCR-RFLP multilocus, resultaron en tres genotipos diferentes: el primer aislamiento como tipo clonal II (ToxoDB #1), el segundo como

recombinante clonal (ToxoDB #4, haplogrupo 12) y el tercero también recombinante pero diferente al anterior (ToxoDB # 216).

El genotipo determinado en este caso, si bien es similar en su presentación clínica (caso asintomático) con lo descrito por otros autores, difiere con respecto al genotipo identificado. A su vez, también es el primer caso en esta especie descrito en el país.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió generar información sobre los genotipos de *T. gondii* en México, no descritos previamente, los cuales fueron tipo I clonal y atípicos, que se asociaron a diversas presentaciones clínico-patológicas de toxoplasmosis en animales domésticos y fauna silvestre.

Se generó información sobre la coexistencia de *T. gondii* con *N. caninum*; en caninos, así como de coinfección con un agente viral sugerente de herpesvirus en marsupiales australianos, cuya interacción no ha sido descrita en la literatura científica de nuestro país.

Se describió la presentación de toxoplasmosis aguda intestinal en un delfín del Atlántico, con la identificación de estadios sexuales de *T. gondii*, la confirmación de esta presentación aportará elementos para explicar la diseminación e impacto de la infección de *T. gondii* en diferentes mamíferos marinos.

La identificación de los genotipos de *T. gondii*, tanto de los casos clínico-patológicos como de los determinados a partir de aislamientos previos provenientes de animales asintomáticos, proporciona una nueva visión sobre su diversidad genética en México y en distintos hospedadores, con repercusión clínico-patológica variable, lo que generó información relevante para explicar el papel que juegan las especies domésticas y fauna silvestre, en el mantenimiento y extensión de la diversidad genética de *T. gondii* en nuestro país.

9. LITERATURA CONSULTADA

1. Adkesson MJ, Gorman ME, Hsiao V, Whittington JK, Langan JN. *Toxoplasma gondii* inclusions in peripheral blood leukocytes of a red-necked wallaby (*Macropus rufogriseus*). *Veterinary Clinical Pathology*. 2007; 36 (1): 97-100.
2. Ahmed BA, Gaafar SM, Weirich WE, Kanitz CL. Relationship of *Toxoplasma* infections to other diseases in dogs. *Veterinary Parasitology*. 1983; 12 (2): 199-203.
3. Ajioka JW, Sibley LD. Development and application of classical genetics in *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K. Editor. *Toxoplasma gondii*, the model Apicomplexan: perspectives and methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 551-573.
4. Ajzenberg D, Bañuls AL, Tibayrenc M, Darde ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*. 2002a; 32 (1): 27-38.
5. Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Fillisetti D et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002b; 186 (5): 684-689.
6. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carne B et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34 (10): 1185-1196.
7. Ajzenberg D, Dumetre A, Darde ML. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (4): 1940-1943.
8. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48 (12): 4641-5.
9. Al-Qassab S, Reichel MP, Su C, Jenkins D, Hall C, Windsor PA et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its

- biological and molecular characterization. *Veterinary Parasitology*. 2009; 164 (2-4): 335-339.
10. Alba-Hurtado F, Valdivia AG, Martínez RHA, Isita TL. Encuesta epidemiológica de la toxoplasmosis felina en la Ciudad de México. *Revista Agropecus*. 2001; 2 (1): 5-12.
 11. Alerte VM. Prevalence de *Toxoplasma gondii* sur les animaux d'un parc zoologique (Amneville): seroprevalence et isolement du parasite [Prevalence of *Toxoplasma gondii* on animals in a zoo (Amneville): seroprevalence and isolation of the parasite]. Versailles (Yvelines), France. Thesis - l'Université Paul-Sabatier de Toulouse [Paul Sabatier University of Toulouse]. 2008. 131p.
 12. Aluja AS, Constantino CF. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2ª ed. Manual Moderno. México, D.F. México. 2002.
 13. Alvarado-Esquivel C, Sifuentes-Álvarez A, Narro-Duarte SG, Estrada-Martínez S, Díaz-García JH, Liesenfeld O et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in a public hospital in northern Mexico. *BMC Infectious Diseases*. 2006a; 6: 113.
 14. Alvarado-Esquivel C, Alanis-Quiñones OP, Arreola-Valenzuela MA, Rodríguez-Briones A, Piedra-Nevarez LJ, Duran-Morales E, Estrada-Martínez S, Martínez-García SA, Liesenfeld O. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric inpatients in a northern Mexican city. *BMC Infectious Diseases*. 2006b; 6: 178.
 15. Alvarado-Esquivel C, Mercado-Suarez MF, Rodríguez-Briones A, Fallad-Torres L, Ayala-Ayala JO, Nevarez-Piedra LJ et al. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, Mexico. *BMC Infectious Diseases*. 2007a; 7: 75.
 16. Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Herrera-Flores RG, Ramírez-Sánchez BE, González-Herrera A, Martínez-García SA et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2007b; 93 (5): 1214-1216.

17. Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Márquez-Conde JA, Cisneros-Camacho A, Estrada-Martínez S, Martínez-García SA. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in waste pickers and waste workers in Durango, Mexico. *Zoonoses Public Health*. 2008a; 55 (6): 306-312.
18. Alvarado-Esquivel C, Cruz-Magallanes HM, Esquivel-Cruz R, Estrada-Martínez S, Rivas-González M, Liesenfeld O et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in human adults from three rural communities in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2008b; 94 (4): 811-816.
19. Alvarado-Esquivel C, Torres-Castorena A, Liesenfeld O, García-López CR, Estrada-Martínez S, Sifuentes-Alvarez A et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in rural Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2009; 95 (2): 271-274.
20. Alvarado-Esquivel C, Rojas-Rivera A, Estrada-Martínez S, Sifuentes-Álvarez A, Liesenfeld O, García-López CR et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in a Mennonite community in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2010a; 96 (5): 941-945.
21. Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Torres-Castorena A, Estrada-Martínez S, Urbina-Alvarez JD, Ramos-de la Rocha M et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in patients with vision and hearing impairments, cancer, HIV, or undergoing hemodialysis in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2010b; 96 (3): 505-508.
22. Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Márquez-Conde JA, Estrada-Martínez S, Dubey JP. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in workers occupationally exposed to water, sewage, and soil in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2010c; 96 (5): 847-850.
23. Alvarado-Esquivel C, Urbina-Álvarez JD, Estrada-Martínez S, Torres-Castorena A, Molotla-de-León G, Liesenfeld O et al. *Toxoplasma gondii* infection and schizophrenia: a case control study in a low *Toxoplasma* seroprevalence Mexican population. *Parasitology International*. 2011a; 60 (2):151-155.

24. Alvarado-Esquivel C, Estrada-Martínez S, Pizarro-Villalobos H, Arce-Quiñones M, Liesenfeld O, Dubey JP. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in general population in a northern Mexican city. *The Journal of Parasitology*. 2011b; 97 (1): 40-43.
25. Alvarado-Esquivel C, García-Machado C, Alvarado-Esquivel D, González-Salazar AM, Briones-Fraire C, Vitela-Corrales J et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2011c; 97 (4): 616-619.
26. Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Estrada-Martínez S, Félix-Huerta J. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to raw meat. *Occupational Medicine (Oxford, England)*. 2011d; 61 (4): 265-269.
27. Alvarado-Esquivel C, Torres-Berumen JL, Estrada-Martínez S, Liesenfeld O, Mercado-Suarez MF. *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: a case-control study in a northern Mexican population. *Parasites and Vectors*. 2011e; 4: 75.
28. Alvarado-Esquivel C, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OC, Choudhary S, Alvarado-Esquivel D et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2011f; 97 (5): 809-812.
29. Alvarado-Esquivel C, García-Machado C, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Durango State, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2011g; 183 (1-2): 43-46.
30. Alvarado-Esquivel C, Estrada-Martínez S, Liesenfeld O. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to unwashed raw fruits and vegetables: a case control seroprevalence study. *Parasites and Vectors*. 2011h; 4: 235.
31. Alvarado-Esquivel C, García-Machado C, Alvarado-Esquivel D, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2012a; 98 (2): 271-273.

32. Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Okrucky R, Dubey JP. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2012b; 184 (2-4): 321-324.
33. Alvarado-Esquivel C, González-Salazar AM, Alvarado-Esquivel D, Ontiveros-Vázquez F, Vitela-Corrales J, Villena I et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2012c; 98 (2): 431-432.
34. Alvarado-Esquivel C, Estrada-Martínez S, García-López CR, Rojas-Rivera A, Sifuentes-Álvarez A, Liesenfeld O. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in Tepehuanos in Durango, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Disease*. 2012d; 12 (2): 138-142.
35. Alvarado-Esquivel C, Torres-Castorena A, Liesenfeld O, Estrada-Martínez S, Urbina-Álvarez JD. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in a subset of Mexican patients with work accidents and low socioeconomic status. *Parasites and Vectors*. 2012e; 5: 13.
36. Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Burciaga-López BD, Ramos-Nevárez A, Estrada-Martínez S, Cerrillo-Soto SM et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in elderly people in a northern Mexican city. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012f; 12 (7): 568-574.
37. Alvarado-Esquivel C, Rodríguez-Peña S, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2012g; 98 (5): 944-945.
38. Alvarado-Esquivel C, Estrada-Malacón MA, Reyes-Hernández SO, Pérez-Ramírez JA, Trujillo-López JI, Villena I et al. High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2012h; 98 (6): 1248-1250.
39. Alvarado-Esquivel C, Estrada-Malacón MA, Reyes-Hernández SO, Pérez-Ramírez JA, Trujillo-López JI, Villena I et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic sheep in Oaxaca State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2013a; 99 (1): 151-152.

40. Alvarado-Esquivel C, Silva-Aguilar D, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy goats in Michoacán State, Mexico. *The Journal of Parasitol.* 2013b; 99 (3): 540-542.
41. Alvarado-Esquivel C, Campillo-Ruiz F, Liesenfeld O. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in migrant agricultural workers living in poverty in Durango, Mexico. *Parasites and Vectors.* 2013c; 6: 113.
42. Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic rabbits in Durango State, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine.* 2013d; 111 (3-4): 325-328.
43. Alvarado-Esquivel C, Gayosso-Dominguez EA, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in three zoos in Mexico City, Mexico. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 2013e; 44 (3): 803-806.
44. Alvarado-Esquivel C, Silva-Aguilar D, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Michoacán State, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine.* 2013f; 112 (3-4): 433-437.
45. Anfray P, Bonetti C, Fabbrini F, Magnino S, Mancianti F, Abramo F. Feline cutaneous toxoplasmosis. *Veterinary Dermatology.* 2005; 16 (2): 131-136.
46. Aparicio Fragoso DF. Correlación entre títulos serológicos y presencia de ooquistes en heces, en el diagnóstico de toxoplasmosis en gatos. (Tesis de Licenciatura). México, D.F., México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1987.
47. Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *The Journal of Parasitology.* 1998; 84 (2): 438-440.
48. Basso W, Venturini MC, More G, Quiroga A, Bacigalupe D, Unzaga JM et al. Toxoplasmosis in captive bennet's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Argentina. *Veterinary Parasitology.* 2007; 144 (1-2): 157-161.

49. Basso W, Moré G, Quiroga MA, Pardini L, Bacigalupe D, Venturini L et al. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2009; 161 (3-4): 201-206.
50. Baszler TV, Dubey JP, Löhr CV, Foreyt WJ. Toxoplasmic encephalitis in a free-ranging Rocky Mountain bighorn sheep from Washington. *Journal of Wildlife Diseases*. 2000; 36 (4): 752-754.
51. Benavides J, Maley S, Pang Y, Palarea J, Eaton S, Katzer F et al. Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*. 2011; 179 (1-3): 209-215.
52. Bermúdez R, Faílde LD, Losada AP, Nieto JM, Quiroga MI. Toxoplasmosis in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*. 2009; 160 (1-2): 155-158.
53. Berron DH. Detección de anticuerpos contra *T. gondii* mediante la prueba de fijación de complemento en una población de felinos silvestres albergada en el zoológico de Chapultepec. (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1991
54. Besné-Mérida A, Figueroa-Castillo JA, Martínez-Maya JJ, Luna-Pastén H, Calderón-Segura E, Correa D. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico city. *Veterinary Parasitology*. 2008; 157 (3-4): 310-313.
55. Besne-Merida A. Caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) de distintas regiones de México. (Tesis de Maestría). México, D.F., México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010.
56. Blackston CR, Dubey JP, Dotson E, Su C, Thulliez P, Sibley D et al. High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. *The Journal of Parasitology*. 2001; 87 (6): 1472-1475.

57. Bresciani KDS, Galvão ALV, de Vasconcellos AL, Soares JA, de Matos LVS, Pierucci JC et al. Relevant aspects of human toxoplasmosis. *Research Journal of Infectious Diseases*. 2013; 1: 7. <http://dx.doi.org/10.7243/2052-5958-1-7>.
58. Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends in Parasitology*. 2006; 22 (10): 448-452.
59. Caballero-Ortega H, Quiroz-Romero H, Olazarán-Jenkins S, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology*. 2008a; 135 (8): 897-902.
60. Caballero-Ortega H, Palma JM, García-Márquez LJ, Gildo-Cárdenas A, Correa D. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology*. 2008b; 135 (12): 1385-1389.
61. Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Peláez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H et al. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. 2012; 106 (11): 653-659.
62. Cademartori BG, Santos LM, Oliveira FC, Quevedo P, Oliveira PA, Ramos TS et al. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2014; 203 (1-2): 207-211.
63. Calero-Bernal R, Gómez-Gordo L, Saugar JM, Frontera E, Pérez-Martín JE, Reina D et al. Congenital toxoplasmosis in wild boar (*Sus scrofa*) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. *Journal of Wildlife Disease*. 2013; 49 (4): 1019-1023.
64. Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez M de L, Luna-Pastén H, Rodríguez-Pérez LR, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP et al. Congenital toxoplasmosis: specific

- IgG subclasses in mother/newborn pairs. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2008; 27 (5): 469-474.
65. Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Figueroa-Damián R, Bustos-Bahena ML, González-Henkel H, Calderón-Segura E et al. Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *Journal of Perinatology*. 2009; 29 (10): 668-672.
 66. Cañón-Franco WA, Araújo FA, López-Orozco N, Jardim MM, Keid LB, Dalla-Rosa C et al. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. *Veterinary Parasitology*. 2013; 197 (3-4): 462-469.
 67. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detection and Prevention*. 2003; 27 (5): 397-404.
 68. Carme B, Ajzenberg D, Demar M, Simon S, Dardé ML, Maubert B et al. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. *Veterinary Parasitology*. 2009; 163 (1-2): 132-135.
 69. Castaño P, Fuertes M, Ferre I, Fernández M, Ferreras M del C, Moreno-Gonzalo J et al. Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *Veterinary Research*. 2014; 45:49.
 70. Cedillo-Peláez Carlos. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México (Tesis de Maestría). México, D.F., México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009.
 71. Cedillo-Peláez C, Gutiérrez-Chávez AJ, Besné-Mérida A, Xicotencatl-García L, Badajoz-Martínez J, Luna-Pasten H et al. Frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en perros de diferentes municipios del estado de Guanajuato, México. *Biomédica*. 2011; 31 (sup.3): 317.
 72. Chávez-Crisóstomo DO. Aislamiento de *Toxoplasma gondii* de tejido cerebral de un becerro infectado naturalmente en México. Tesis de Maestría. México, D.F., México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010.

73. Colegrove KM, Grigg ME, Carlson-Bremer D, Miller RH, Gulland FM, Ferguson DJ et al. Discovery of three novel coccidian parasites infecting California sea lions (*Zalophus californianus*), with evidence of sexual replication and interspecies pathogenicity. *The Journal of Parasitology*. 2011; 97 (5): 868-877.
74. Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunology*. 2007; 29 (12): 651-660.
75. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *Journal of Clinical Pathology*. 2005; 58 (8): 894-895.
76. Da Silva AV, Pezerico SB, de Lima VY, d'Arc-Moretti L, Pinheiro JP, Tanaka EM et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127 (1): 23-27.
77. Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *The Journal of Parasitology*. 1992; 78 (5): 786-794.
78. Darde ML. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2004; 40 (1): 57-63.
79. Darde ML, Ajzenberg D, Su C. Molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K. Editor. *Toxoplasma gondii*, the model Apicomplexan: perspectives and methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 61-97.
80. De-la-Torre A, Pfaff AW, Grigg ME, Villard O, Candolfi E, Gomez-Marin JE. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine*. 2014; 68 (1): 23-31.
81. de Macedo MF, de Macedo CA, Ewald MP, Martins GF, Zulpo DL, da Cunha IA et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy

- cows (*Bos taurus*) slaughtered. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria*. 2012; 21 (1): 74-77.
82. Dellacasa-Lindberg I, Fuks JM, Arrighi RB, Lambert H, Wallin RP, Chambers BJ et al. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2011; 79 (8): 3046-3052.
 83. Demar M, Ajzenberg D, Serrurier B, Dardé ML, Carme B. Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008; 78 (2): 195-197.
 84. Di Guardo G, Di Cesare A, Otranto D, Casalone C, Iulini B, Mignone W et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningo-encephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. *Veterinary Parasitology*. 2011; 183 (1-2): 31-36.
 85. Diaz-Figueroa ID. Prevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en perros del centro de control canino y antirrabico municipal de la ciudad de Oaxaca. (Tesis de licenciatura). Oaxaca de Juarez, Oaxaca, México. Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. 2010.
 86. Dietz HH, Henriksen P, Bille-Hansen V, Henriksen SA. Toxoplasmosis in a colony of new world monkeys. *Veterinary Parasitology*. 1997; 68(4): 299-304.
 87. Dorny P, Franssen J. Toxoplasmosis in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Veterinary Record*. 1989; 125 (26-27): 647-647.
 88. Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *Journal of Protozoology*. 1976; 23 (4): 537-546.
 89. Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *American Journal of Veterinary Research*. 1988; 49 (6): 910-913.
 90. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. *CRC Press*. Boca Raton, Florida, USA. 1988.

91. Dubey JP, Ott-Joslin J, Torgerson RW, Topper MJ, Sundberg JP. Toxoplasmosis in black-faced kangaroos (*Macropus fuliginosus melanops*). *Veterinary Parasitology*. 1988; 30 (2): 97-105.
92. Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1997a; 44 (6): 592-602.
93. Dubey JP. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *The Journal of Parasitology*. 1997b; 83 (4): 755-757.
94. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 1998; 28 (7): 1019-1024.
95. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11 (2): 267-99.
96. Dubey JP, Eggers JS, Lipscomb TP. Intestinal coccidiosis in a spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *The Journal of Parasitology*. 2002a; 88 (3): 634-637.
97. Dubey JP, Lewis B, Beam K, Abbitt B. Transplacental toxoplasmosis in a reindeer (*Rangifer tarandus*) fetus. *Veterinary Parasitology*. 2002b; 110 (1-2): 131-135.
98. Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. 2004; 126 (1-2): 57-72.
99. Dubey JP, Morales ES, Lehmann T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2004; 90 (2): 411-413.
100. Dubey JP, Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Herrera-Flores RG, Ramírez-Sánchez BE, González-Herrera A, Martínez-García SA, Bandini LA, Kwok OC. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango City, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2007a; 93 (5): 1033-1035.

101. Dubey JP, Morales JA, Sundar N, Velmurugan GV, González-Barrientos CR, Hernández-Mora G et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *The Journal of Parasitology*. 2007b; 93 (3):710-1.
102. Dubey JP, Crutchley C. Toxoplasmosis in wallabies (*Macropus rufogriseus* and *Macropus eugenii*): blindness, treatment with atovaquone and isolation of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*. 2008; 94 (4): 929-933.
103. Dubey JP, Fair PA, Sundar N, Velmurugan G, Kwok OC, McFee WE et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *The Journal of Parasitology*. 2008a; 94 (4): 821-823.
104. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*. 2008b; 38 (11): 1257-1278.
105. Dubey JP, Quirk T, Pittt JA, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OC et al. 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*. 2008c; 94 (1): 42-45.
106. Dubey JP, Velmurugan GV, Ulrico V, Gill J, Carstensen M, Sundar N et al. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from fetuses of different gestational ages. *International Journal for Parasitology*. 2008d; 38 (8-9): 1057-1063.
107. Dubey JP, Mergl J, Gehring E, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OC et al. Toxoplasmosis in captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and walrus (*Odobenus rosmarus*). *The Journal of Parasitology*. 2009a; 95 (1): 82-85.
108. Dubey JP, Lappin MR, Kwok OC, Mofya S, Chikweto A, Baffa A et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and concurrent *Bartonella* spp., feline immunodeficiency virus, and feline leukemia virus infections in cats from Grenada, West Indies. *Journal of Parasitology*. 2009b; 95 (5): 1129-1133.

109. Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Martínez-García S et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2009c; 95 (2): 319-322.
110. Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and man*. 2nd ed. *CRC Press*. Boca Raton, Florida, USA. 2010.
111. Dubey JP, Pas A, Rajendran C, Kwok OC, Ferreira LR, Martins J et al. 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*. 2010a; 172 (3-4): 195-203.
112. Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OC, Sinnott D, Majumdar D et al. A new atypical highly mouse virulent *Toxoplasma gondii* genotype isolated from a wild black bear in Alaska. *The Journal of Parasitology*. 2010b; 96 (4): 713-716.
113. Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Hill DE et al. 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*. 2011; 41 (8): 827-33.
114. Dubey JP, Alvarado-Esquivel C, Herrera-Valenzuela VH, Ortiz-Diaz JJ, Oliveira S, Verma SK et al. 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*. 2013a; 197 (3-4): 674-677.
115. Dubey JP, Hill D, Zarlenga D, Choudhary S, Ferreira LR, Oliveira S et al. Isolation and characterization of new genetic types of *Toxoplasma gondii* and prevalence of *Trichinella murrelli* from black bear (*Ursus americanus*). *Veterinary Parasitology*. 2013b; 196 (1-2): 24-30.

116. Dubey JP. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K. Editor. *Toxoplasma gondii*, the model Apicomplexan: perspectives and methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 1-17.
117. Dubey JP, Dennis PM, Verma SK, Choudhary S, Ferreira LR, Oliveira S et al. Epidemiology of toxoplasmosis in white tailed deer (*Odocoileus virginianus*): occurrence, congenital transmission, correlates of infection, isolation, and genetic characterization of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*. 2014; 202 (3-4): 270-275.
118. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumétre A, Yera H et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009; 199 (2): 280-285.
119. Epiphanio S, Guimararaes MABV, Fedullo DL, Correa SHR, Catao-Dias JL. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Sanguinus imperator*) in captivity. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2000; 31 (2): 231-235.
120. Epiphanio S, Sinhorini IL, Catao-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. *Journal of Comparative Pathology*. 2003; 129 (2-3): 196-204.
121. Espinosa-Avilés D, Morales-Martínez MS. Brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio. *Veterinaria México*. 2007; 38 (3): 365-369.
122. Edwards JF, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. *Veterinary Parasitology*. 2013; 192 (1-3): 129-136.
123. Fan H, Gulley ML. DNA Extraction from paraffin-embedded tissues. En: Killeen AA. *Methods in Molecular Medicine. Molecular Pathology Protocols*. Vol 49. Human Press. USA. 2001: 1-4.

124. Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30 (5): 637-642.
125. Fazaeli A, Ebrahimzadeh A. A new perspective on and re-assessment of SAG2 locus as the tool for genetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates. *Parasitology Research*. 2007; 101 (1): 99-104.
126. Ferguson DJ, Graham DI, Hutchison WM. Pathological changes in the brains of mice infected with *Toxoplasma gondii*: a histological, immunocytochemical and ultrastructural study. *International Journal of Experimental Pathology*. 1991; 72 (4): 463-474.
127. Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34 (3): 347-360.
128. Ferguson DJP, Dubremetz JF. The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K. Editor. *Toxoplasma gondii*, the model Apicomplexan: perspectives and methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 19-59.
129. Fernández-Aguilar X, Ajzenberg D, Cabezón O, Martínez-López A, Darwich L, Dubey JP, Almería S. Fatal toxoplasmosis associated with an atypical *Toxoplasma gondii* strain in a Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*. 2013; 196 (3-4): 523-527.
130. Ferreira A de M, Vitor RW, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*. 2006; 6 (1): 22-31.
131. Figueroa-Castillo JA, Duarte-Rosas V, Juárez-Acevedo M, Luna-Pastén H, Correa D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from México. *The Journal of Parasitology*. 2006; 92 (2): 394-395.
132. Flegr J, Príplatova L, Hampl R, Biciková M, Ripova D, Mohr P. Difference of neuro- and immunomodulatory steroids and selected hormone and lipid concentrations between *Toxoplasma*-free and *Toxoplasma*-infected but not

- CMV-free and CMV-infected schizophrenia patients. *Neuro Endocrinology Letters*. 2014; 35 (1): 20-27.
133. Fowler ME, Miller RE. Editor. *Zoo and wild animal medicine*. 5th ed. Philadelphia, USA. Saunders. 2003.
 134. Fowler ME, Miller RE. Editor. *Zoo and wild animal medicine. Current therapy*. Vol. 6. St Louis, Missouri, USA. Saunders. 2008.
 135. Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, de Oliveira FC. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Veterinary Parasitology*. 2011; 175 (1-2): 33-39.
 136. Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, Gao X et al. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Research*. 2007; 1-7. (2007) gkm981v1.
 137. Galván-Ramírez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. *Toxoplasma gondii* antibodies in Mexican blood donors. *Transfusion*. 2005; 45 (2): 281-282.
 138. Galván-Ramírez ML, Flores M, Borbas V, Rodríguez R, Sayas M, Hernández SV: Prevalencia de infección por *Toxoplasma gondii* en mujeres con embarazo de alto riesgo y normal y sus recién nacidos. In *Investigaciones en Salud Materno Fetal*. 1st edition. Edited by Isabel V, Noe A. Guadalajara, Jalisco Mexico: Universidad de Guadalajara; 2007: 235-243.
 139. Galván-Ramírez ML, Orozco C, Mancilla J: Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in workers of slaughterhouse in Zapopan, Jalisco. *International Journal of Infectious Diseases*. 2008, 12: 384.
 140. Galván-Ramírez ML, Bentancourt-Sanchez D, Vela-Amieva M, Perez-Andrade M, Vazquez-Castellanos JL, Vazquez-Banda F. Congenital toxoplasmosis in Jalisco Mexico. Abstract 87. 39, 2009. p. 32,
 141. Garcia JL, Svoboda WK, Chryssafidis AL, de Souza Malanski L, Shiozawa MM, de Moraes Aguiar L et al. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis

- in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2005; 133 (4): 307-311.
142. García-Márquez LJ, Gutiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, Palma JM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2007; 93 (6): 1527-1528.
143. Gardiner CH, Fayer R, Dubey JP. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. 2nd ed. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC. USA. 1998.
144. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M *et al.* Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2008; 2(8): e277.
145. Gillis KD. Naturally occurring *Sarcocystis* infection in domestic cats (*Felis cats*). (Master of Science thesis). Florida, USA. University of Florida. 2003.
146. Grigg ME, Boothroyd JC. 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*. 2001; 39(1): 398-400.
147. Gyimesi ZS, Lappin MR, Dubey JP. Application of assays for the diagnosis of toxoplasmosis in a colony of woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2006; 37(3): 276-280.
148. Headley SA, Alfieri AA, Fritzen JT, Garcia JL, Weissenböck H, da Silva AP *et al.* Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2013; 25(1): 129-135.
149. Heffess CS, Mullick FG. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington, D.C., EU. 1995.
150. Herrmann DC, Wibbelt G, Götz M, Conraths FJ, Schares G. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from European beavers

- (*Castor fiber*) and European wildcats (*Felis silvestris silvestris*). *Veterinary Parasitology*. 2013; 191 (1-2): 108-111.
151. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmisión, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*. 2002; 8(10): 634-640.
 152. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biological and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*. 2005; 6(1): 41-61.
 153. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995; 172(6): 1561-1566.
 154. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*. 2012; 10(11): 766-778.
 155. Hyman JA, Johnson LK, Tsai MM, O'Leary TJO. Specificity of polymerase chain reaction identification of *Toxoplasma gondii* infection in paraffin-embedded animal tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1995; 7(2): 275-278.
 156. Innes EA. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1997; 20(2): 131-138.
 157. Inoue M. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 1997; 59(7): 593-595.
 158. Jardine JE, Dubey JP. Congenital toxoplasmosis in a Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). *Journal of Parasitology*. 2002; 88(1): 197-199.
 159. Jiménez-Coello M, Guzmán-Marín E, Ortega-Pacheco A, Acosta-Viana KY. Immunological status against *Toxoplasma gondii* in non-cat owners from an endemic region of Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11 (8): 1057-1061.
 160. Johnson MA, Whalley JM, Littlejohns IR, Dickson J, Smith VW, Wilks CR et al. Macropodid herpesvirus 1 and 2: two herpesvirus from Australian marsupials differentiated by restriction endonucleases, DNA composition and hybridization. Brief report. *Archives of Virology*. 1985; 85 (3-4): 313-319.

161. Juan-Sallés C, Prats N, López S, Domingo M, Marco AJ, Morán JF. Epizootic disseminated toxoplasmosis in captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricata*). *Veterinary Pathology*. 1997; 34 (1): 1-7.
162. Juárez JAM. Identificación de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero sanguíneo de bovino por la prueba de inmunofluorescencia en la cuenca lechera de Cuauhtitlan Estado de México. (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1980.
163. Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R *et al*. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33 (9): 2980-2992.
164. Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. 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*. 2007; 104 (37): 14872-14877.
165. Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology*. 2011; 41 (6): 645-655.
166. Kikuchi Y, Chomel BB, Kasten RW, Materson JS, Swift PK, O'Brien SJO. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Veterinary Parasitology*. 2004; 120 (1-2): 1-9.
167. King JM, Roth JL, Dodd DC, Newson ME. *The necropsy book*. Charles Louis Davis, DVM Foundation Publisher. Illinois USA. 2005.
168. Knoll LJ, Tomita T, Weiss LM. Bradyzoite Development. En: Weiss LM, Kim K. Editor. *Toxoplasma gondii*, the model Apicomplexan: perspectives and methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 521-549.
169. Langoni H, Matteucci G, Medici B, Camossi LG, Richini-Pereira VB, Silva RC. Detection and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora*

- caninum* from dogs with neurological disorders. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012; 45 (3): 365-8.
170. Lehmann T, Graham DH, Dahl ER, Bahia-Oliveira LM, Gennari SM, Dubey JP. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infection Genetic and Evolution*. 2004; 4 (2): 107-14.
 171. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *PNAS*. 2006; 103 (30): 11423-11428.
 172. Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research*. 1989; 50 (11): 1981-1983.
 173. Lindsay D, McKown RD, DiCristina JA, Jordan CN, Mitchell SM, Oates DW *et al*. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in adult and fetal mule deer (*Odocoileus hemionus*) from Nebraska. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(6): 1490- 1491.
 174. Lindsay DS, Dubey JP. Toxoplasmosis in wild and domestic animals. En: Weiss LM, Kim K. Editor. *Toxoplasma gondii*, the model Apicomplexan: perspectives and methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 193-216.
 175. Lukesová D, Literák I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*. 1998; 74 (1): 1-7.
 176. Luna AA. Detección de anticuerpos séricos de *Toxoplasma gondii* en equinos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1990.
 177. Luna-Pasten H, del Viento A, Pacheco-Coronel N, Chávez-Crisóstomo D, Palma JM, García-Márquez LJ *et al*. Aislamiento y fenotipificación de *Toxoplasma gondii*. *Memorias del Congreso Nacional de Parasitología (CONAPAR) 2009*. Aguascalientes, Aguascalientes, México. JC-26.

178. Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2014; 39:77-106.
179. Martínez-Maya JJ. Sondeo serológico para la detección de anticuerpos contra toxoplasmosis en perros de la Ciudad de Mexico y su importancia en salud pública. (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1986.
180. Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)? *Clinical and Developmental Immunology*. 2009; 2009: 374696. doi: 10.1155/2009/374696.
181. McFadden KW, Wade SE, Dubovi EJ, Gompper ME. A serological and fecal parasitologic survey of the critically endangered pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). *J Wildl Dis*. 2005; 41 (3): 615-617.
182. McGavin MD, Zachary JF. *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th ed. Mosby Elsevier. China. 2007.
183. Melo MB, Jensen KD, Saeij JP. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends in Parasitology*. 2011; 27 (11): 487-495.
184. Méndez-Bernal A, Martínez Ramos I, Saucedo Garnica B, Ramírez Lezama J. Toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio en Cuernavaca, Morelos, México. *Veterinaria México*. 2011; 42 (2): 115-123.
185. Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR *et al*. 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*. 2004; 34(3): 275-284.
186. Miller M, Conrad P, James ER, Packham A, Toy-Choutka S, Murray MJ *et al*. Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Veterinary Parasitology*. 2008a; 153 (1-2): 12-18.

187. Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli AC, Leutenegger CM *et al.* 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*. 2008b; 38 (11): 1319-1328.
188. Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2009; 39 (1): 23-39.
189. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363 (9425): 1965-1976.
190. Moré G, Pardini L, Basso W, Machuca M, Bacigalupe D, Villanueva MC *et al.* Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2010; 169 (1-2): 57-61.
191. Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Veterinary Parasitology*. 2012; 187 (1-2): 312-318.
192. Moretti LD, Da Silva AV, Ribeiro MG, Paes AC, Langoni H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2006; 48 (6): 359-363.
193. Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*. 2008; 121 (Pt 9): 1559-1568.
194. Olamendi-Portugal M, Caballero-Ortega H, Correa D, Sánchez-Alemán MA, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L *et al.* Serosurvey of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in white-tailed deer from Northern Mexico. *Vet Parasitol*. 2012; 189 (2-4): 369-373.

195. Ortega-Pacheco A, Acosta Viana KY, Guzmán-Marín E, Segura-Correa JC, Alvarez-Fleites M, Jiménez-Coello M. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 231497. doi: 10.1155/2013/231497.
196. Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *Journal of Parasitology.* 1999; 85 (2): 382-384.
197. Pacheco Coronel, Noé. 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). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010.
198. Pan S, Thompson RC, Grigg ME, Sundar N, Smith A, Lymbery AJ. Western Australian marsupials are multiply infected with genetically diverse strains of *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e45147. doi: 10.1371/journal.pone.0045147.
199. Parameswaran N, O'Handley RM, Grigg ME, Wayne A, Thompson RC. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in Australian marsupials. *Parasitology.* 2009; 136 (9): 939-944.
200. Parameswaran N, Thompson RC, Sundar N, Pan S, Johnson M, Smith NC, Grigg ME. Non-archetypal Type II-like and atypical strains of *Toxoplasma gondii* infecting marsupials of Australia. *International Journal for Parasitology.* 2010; 40 (6): 635-640.
201. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology.* 2008; 38 (5): 561-569.
202. Pena HF, Marvulo MF, Horta MC, Silva MA, Silva JC, Siqueira DB et al. 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.* 2011; 175 (3-4): 377-381.

203. Pfaff AW, de-la-Torre A, Rochet E, Brunet J, Sabou M, Sauer A et al. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*. 2014; 44 (2): 99-107.
204. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2005; 42: 405-426.
205. Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Könen-Waisman S et al. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathogens*. 2012; 8(3): e1002567. Doi: 10.1371/journal.ppat. 1002567.
206. Rendón-Franco E, Caso-Aguilar A, Jiménez-Sánchez NG, Hernández-Jauregui DM, Sandoval-Sánchez AL, Zepeda-López HM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in free-ranging ocelots (*Leopardus pardalis*) from Tamaulipas, Mexico. *J Wildl Dis*. 2012; 48 (3): 829-831.
207. Resendes AR, Almería S, Dubey JP, Obón E, Juan-Sallés C, Degollada E et al. Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with transplacental fetal infection. *The Journal of Parasitology*. 2002; 88 (5): 1029-1032.
208. Rico-Torres PC. Estandarización y validación a nivel de laboratorio de una prueba de PCR para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2005.
209. Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, Cedillo-Peláez C, Cañedo-Solares I et al. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31(4): 411-413.
210. Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the tree major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *TRENDS in Parasitology*. 2005; 21(10): 476-481.

211. Salant H, Weingram T, Spira DT, Eizenberg T. An outbreak of Toxoplasmosis amongst squirrel monkeys in an Israeli monkey colony. *Veterinary Parasitology*. 2009; 159(1): 24-29.
212. Sánchez JGP. Sereoprevalencia de IgG contra *Toxoplasma gondii* en los felinos salvajes del zoológico de zacango en el municipio de Calimaya, México durante el periodo de noviembre de 1996 a enero de 1997. (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1997.
213. Sedlák K, Bártoová E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*. 2006; 136 (3-4): 223-231.
214. Seeber F, Feagin JE, Parsons M. The apicoplast and mitochondrion of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K. Editor. *Toxoplasma gondii*, the model Apicomplexan: perspectives and methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 297-350.
215. Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014; 141 (4): 453-461.
216. Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992a; 359 (6390): 82-85.
217. Sibley LD, LeBlanc AJ, Pfefferkorn ER, Boothroyd JC. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics*. 1992b. 132(4); 1003-1015.
218. Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic*. 2003; 4 (9): 581-586.
219. Sibley LD, Ajioka JW. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Review of Microbiology*. 2008; 62:329-351.
220. Silva DA, Silva NM, Mineo TW, Pajuaba Neto AA, Ferro EA, Mineo JR. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune

- response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. *Veterinary Parasitology*. 2002; 107(3): 181-195.
221. Silva DA, Lobato J, Mineo TW, Mineo JR. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*. 2007; 143 (3-4): 234-244.
222. Smith KE, Fisher JR, Dubey JP. Toxoplasmosis in a bobcat (*Felis rufus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 1995; 31(4): 555-557.
223. Smith JA, Wellehan JF Jr, Pogranichniy RM, Childress AL, Landolfi JA, Terio KA. Identification and isolation of a novel herpesvirus in a captive mob of eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Veterinary Microbiology*. 2008; 129 (3-4): 236-245.
224. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35(2): 193-206.
225. Spencer JA, Joiner KS, Hilton CD, Dubey JP, Toivio-Kinnucan M, Minc JK, Blagburn BL. Disseminated toxoplasmosis in a captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *Journal of Parasitology*. 2004; 90(4): 904-906.
226. Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(16): 10753-10758.
227. Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*. 2006; 36(7): 841-848.
228. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2010; 137(1): 1-11.
229. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D et al. 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*. 2012; 109(15): 5844-5849.
230. Sundar N, Cole RA, Thomas NJ, Majumdar D, Dubey JP, Su C. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*. 2008, 151(2-4): 125-132.
231. Switaj K, Master A, Skrzypczak M y Zaborowski. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 11(3): 170-176.
232. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30(12-13): 1217-1258.
233. Thomas NJ, Dubey JP, Lindsay DS, Cole RA, Meteyer CU. Protozoal meningoencephalitis in sea otters (*Enhydra lutris*): a histopathological and immunohistochemical study of naturally occurring cases. *Journal of Comparative Pathology*. 2007; 137(2-3): 102-121.
234. Tinti M, Possenti A, Cherchi S, Barca S, Spano F. Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2003; 33(14):1605-16.
235. ToxoDB: *Toxoplasma* Genomic Resource. www.toxodb.org. V. 12.0 (10 septiembre 2014).
236. Vado-Solís IA, Suárez-Solís V, Jiménez-Delgadillo B, Zavala-Velázquez JE, Segura-Correa JC. *Toxoplasma gondii* presence in women with spontaneous abortion in Yucatan, Mexico. *J Parasitol*. 2013; 99 (2): 383-385.
237. Vargas SV. Encuesta serológica para la detección de anticuerpos contra *T. gondii*, en bovinos y caprinos procedentes del municipio de Silacayoapilla, Estado de Oaxaca. (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1985.
238. Vaz PK, Motha J, McCowan C, Ficorilli N, Whiteley PL, Wilks CR et al. Isolation and characterization of a novel herpesvirus from a free-ranging

- eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 2013; 49 (1): 143-151.
239. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, et al. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72 (2): 142-144.
240. Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C *et al*. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. *Salud Pública México*. 1992; 34(2): 222-229.
241. Vidal-Hernández E. Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero de wallabie de cuello rojo (*Macropus rufogriseus*) mediante la prueba de fijación de complemento indirecta (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1996.
242. Vitaliano SM. Isolamento e caracterizacao biologica e genotípica de *T. gondii* em animais selvagens do Brasil. Thesis (Doctorate) – São Paulo, Brasil. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2012.
243. Weidner JM, Barragan A. Tightly regulated migratory subversion of immune cells promotes the dissemination of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2014; 44(2): 85-90.
244. Wendte JM, Gibson AK, Grigg ME. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Veterinary Parasitology*. 2011; 182(1): 96-111.
245. Wilcox RS, Vaz P, Ficorilli NP, Whiteley PL, Wilks CR, Devlin JM. Gammaherpesvirus infection in a free-ranging eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*). *Australian Veterinary Journal*. 2011; 89 (1-2): 55-57.
246. Xicotencatl-García L. 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 Autónoma de México. 2010.

247. Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, Sugimoto C, Xuenan X, Fujisaki K. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. The Journal of Veterinary Medical Science. 2006; 68 (10): 1105-1107.

ANEXO. Artículos publicados, borrador de artículo y artículos donde se colaboró durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A1 Artículos publicados

A 1.1 Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Salas-Garrido CG, Correa D. 2011. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 180: 368-371.

A 1.2 Cedillo-Peláez C, Díaz-Figueroa ID, Jiménez-Seres MI, Sánchez-Hernández G, Correa D. 2012. Frequency of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stray dogs of Oaxaca, México. *Journal of Parasitology*. 98: 871-872.

A2 Borrador de artículo

A 2.1 Cedillo-Peláez C, Besné-Mérida A, Gutiérrez-Chávez AJ, Badajoz-Martínez J, Angeles-Navarro A, Lechuga-Arana AA, Correa D. Frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs of Guanajuato, Mexico. *Veterinary Parasitology*. En proceso de envío.

A3 Colaboración en artículos

A 3.1 Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, **Cedillo-Peláez C**, et al. 2012. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *Ped. Infect. Dis. J.* 31:411-413.

A 3.2 Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, **Cedillo-Peláez C**, et al. 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans Roy Soc trop Med Hyg* 106(11): 653-659.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Short communication

Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico

Carlos Cedillo-Peláez^a, Claudia Patricia Rico-Torres^a, Carlos Gerardo Salas-Garrido^b, Dolores Correa^{a,*}

^a Laboratorio de Immunología experimental, Centro de Investigación, Instituto Nacional de Medicina, Secretaría de Salud, Av. Cuernavaca 3800 C, Cuernavaca, Imagenes Cuernavaca, México, C.P. 76500 México, D.F., México

^b Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Avenida Universidad, 04510 Ciudad de México, C.P. 04510 México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2010

Received in revised form 3 March 2011

Accepted 9 March 2011

Keywords:

Acute toxoplasmosis

Genotype

Mexico

Squirrel monkeys

Toxoplasma gondii

ABSTRACT

Toxoplasma gondii causes fatal, multifocal, brain disease in New World primates, with respiratory failure and multifocal necrotic lesions. Although cases and outbreaks of toxoplasmosis have been described, there are few genotyping studies and none has included parasite load quantification. In this article, we describe two cases of lethal acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) of Mexico city. The main pathological findings included pulmonary edema, interstitial pneumonia, hepatitis and necrotizing lymphadenitis, and structures similar to *T. gondii* tachyzoites observed by histopathology in these organs. Diagnosis was confirmed by immunohistochemistry, transmission electron microscopy and both end point and real time PCR. The load was between 414 and 22 parasitising (i.u./g). Digestion of the 5403 gene amplicon showed similar bands to type I reference strains. These are the first cases of toxoplasmosis in primates studied in Mexico, with clinical features similar to others reported in Israel and French Guiana, although apparently caused by a different *T. gondii* variant.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Toxoplasma gondii is an intracellular obligate parasite which infects most homeothermic vertebrates (Wolf, 2005; Lindsay and Dubey, 2007; Dubey and Jones, 2008). New World primates are highly susceptible to develop clinical problems during the acute phase (Epiphania et al., 2003). The main organs affected are liver, spleen, lymph nodes and lungs, with multifocal necrotic lesions, interstitial pneumonia and pulmonary edema. Death is associated with respiratory failure and disseminated necrosis (Epiphania et al., 2004; Gyimesi et al., 2006).

This protozoan has a clonal population structure and low genetic diversity in North America and Western Europe, but studies in other regions of the world show greater variability (Pena et al., 2008). The relation between

genotype and virulence, as well as the relative weight of parasite type and host susceptibility on clinical outcome are still being unravelled worldwide.

In this study, we describe acute fatal toxoplasmosis in two squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) and the genotype of the infecting parasites. In February 2006 the carcasses of two squirrel monkeys (*S. sciureus*) male and female, were brought to the Department of Pathology of the Veterinary Faculty of the National Autonomous University of Mexico for postmortem diagnosis. The persons who brought them said that the animals suddenly died after having anorexia and depression. These animals belonged to a batch of eight primates showing similar signs. The owners neither gave us their data to localize them, nor they came back to get the results. Thus, the animals' origin and living conditions – including coexistence with other animals – were unknown. Even though, it is suspected that they were subjects of illegal commerce, and acquired the infection while they were in or close to Mexico city. Samples from vari-

* Corresponding author. Tel.: +52 55 1054 0900x1302; fax: +52 55 1054 1981.

E-mail address: marado@yahoo.com (D. Correa).

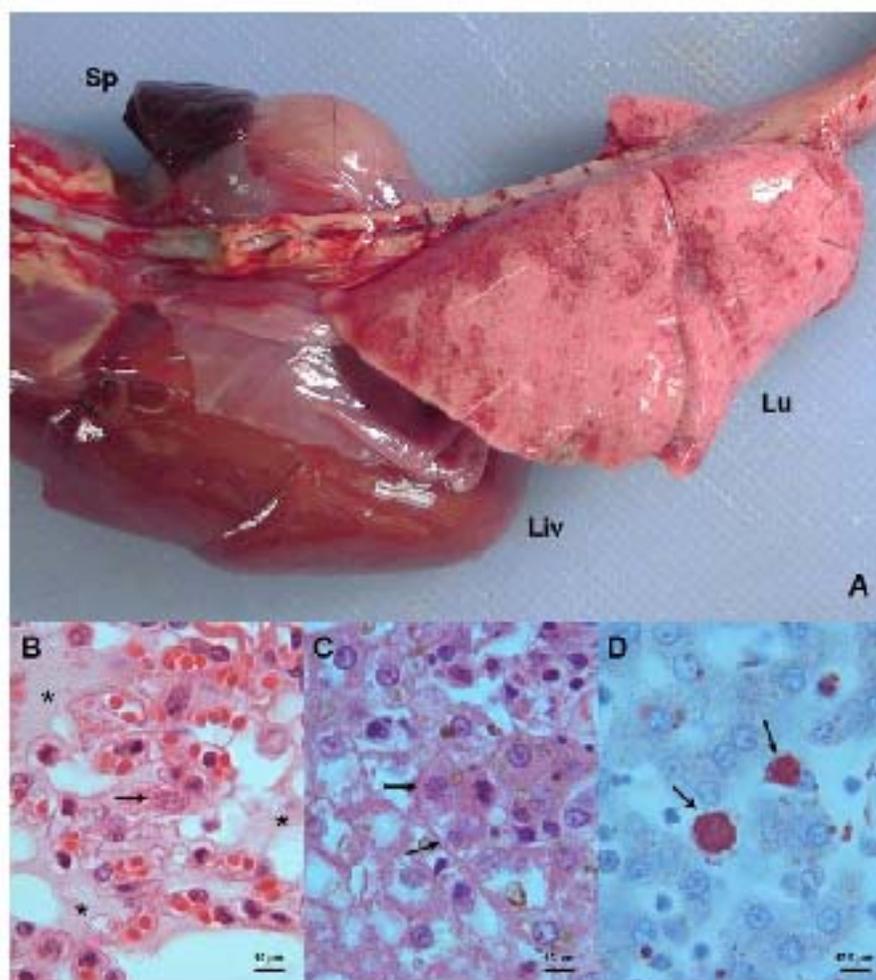


Fig. 1. Pathological changes associated with *T. gondii* infection of different tissues of a squirrel monkey. The lungs (Lu) are shown in (A). Generalized edema and congestion can be observed. The liver (Liv) and the spleen (Sp) were enlarged, and showed increased lobular and multinodular surfaces, respectively. In (B), a H&E stained histological section of the lung is shown: its walls were thickened by inflammatory cell infiltration, and generalized edema of alveolar spaces (*) & a marked suggestive of tachyzoites (arrows) were seen within a cell. (C) Liver sections stained with H&E and adjacent to an area of necrosis and inflammation. A hepatocyte with dual invasion and proliferation of tachyzoites (arrows) can be observed. (D) HRP positive tachyzoites within the cells (arrows) further supported *T. gondii* infection.

lous organs were routinely processed for histopathology and immunohistochemistry using a polyclonal antibody-based kit (VMRD Inc., Pullman, WA, USA). For transmission electron microscopy (TEM) sections were routinely pro-

cessed and examined under a Zeiss EM900 microscope (Oberkochen, Germany).

DNA was extracted from formalin-fixed samples of the lung, liver, spleen, intestine, heart and brain and processed

Table 1
Molecular diagnosis and genotyping of *T. gondii* in squirrel monkeys.

Sample	Monkey	Tissue	PCR (DT)	PCR results					Genotype (SAG2/ISGL1)
				Tachyzoites tissue	DT	GW6	SAG2	SAG3	
A		Lung	ND	–	–	–	–	–	ND
		Liver	±11*	–	+	+	–	–	I
		Spleen	ND	–	–	–	–	–	ND
B		Lung	23*	–	+	–	–	–	I

– (–): 0.90; HRP: 100.00.

I (I): 0.96; ISGL1: 98.85.

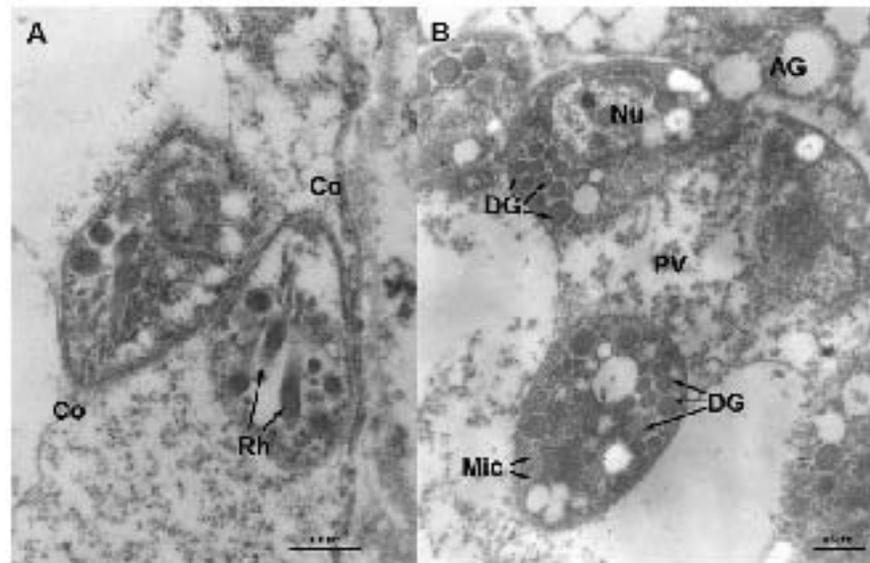


Fig. 2. Electron microscopy of lung sections stained with H&E. (A) Hemi-nested PCR-stained lung section showing trophozoites (Rh) within a parasitophorous vacuole (PV) and a parasite (Co). The trachea (Ca), trophozoites (Rh) and parasite (Co) are characteristic of the *Parvum* Apicomplexa can be observed. In (B), interstitial pneumonia tachyzoites within a parasitophorous vacuole (PV) are shown. Dense granules (DG), micronemes (Mic), apicomplexan granules (AG) and nuclei (Nu) are visible.

by the GENE A[®] commercial kit (Minneapolis, MN, USA) following manufacturer's instructions with some modifications (Cedillo-Pérez, 2009). A hemi-nested PCR to amplify the repetitive *D1* gene was performed according to Pajol-Riqué et al. (1999) with slight modifications (Rico-Torres, 2005). Genotyping was performed by PCR-RFLP of the *SAT*, *SAC2*, *GR46* and *STUB* genes, as reported by Su et al. (2006). All oligonucleotides were synthesized in the Laboratory of Molecular Biology of the Cell Physiology Institute, of the National Autonomous University of Mexico. As positive controls for PCR and PCR-RFLP, DNA samples from the reference RH and ME49 strains were used; for negatives sterile water and negative tissues were included.

In order to determine parasite load, a Taq-Man probe for the *B1* gene was designed and synthesized by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). It amplifies a 152bp fragment (Kampala-Crisa et al., 2009). The primers and probe were: GENE B1 TG-187F (5'-CTAGTATTCCTGGCCATTCG3'), GENE B1 TG-182R (5'-GGCAGCGTCTCC-TCCTT3') and GENE B1 TG-187M1 5'-(6-FAM)-TTCATTCGGCTCTTCG-(NFQ-MG4)-3'. The reactions were set up to a final volume of 20 μ l of TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), added with 1.0 μ M forward and reverse primers, 0.25 μ M fluorescently labeled probe and 5 μ l (50 ng/ μ l) of DNA sample from lung or liver DNA of the squirrel monkeys. Each sample was tested in duplicate and every PCR run included the above mentioned negative controls. Amplification was performed for 40 cycles at 60 °C annealing temperature. Standard curves were generated by spiking 50 to 5 $\times 10^6$ tachyzoites of the RH strain in lung and liver tissues of uninfected mice. Fluorescence was recorded and analyzed using the Step One software

2.0, which provides linear regression coefficients (R^2) and amplification efficiencies ($E\%$) ($100/E$).

Both monkeys' carcasses were in bad conditions. They had the hair hirsute and bloody froth in the mouth and nose, and had scarce subcutaneous adipose tissue. The lymph nodes were enlarged and were dark brown. Also the lung lobes were abnormally large and were lighter than expected; they were soft, pinkish with red mottled-like areas and discrete petechiae, the interlobular septa being visible due to accumulation of translucent material (Fig. 1A). Abundant foamy fluid filled the trachea and bronchi. The liver and spleen lobules were also enlarged, the liver showing a darkish red multinodular surface. Interstitial pneumonia was observed by histopathology. There were abundant pneumocytes and inflammatory cells, mainly neutrophils, lymphocytes and plasma cells. There was an acellular homogeneous eosinophilic material in airways and alveolar space with slight to moderate number of macrophages and fibrin. Vacuoles of different sizes, containing multiple basophilic structures suggestive of Apicomplexan parasites were observed within macrophages and pneumocytes (Fig. 1B). In the liver coagulative necrosis foci were seen, as well as parasites within Kupffer cells and hepatocytes (Fig. 1C). Scarce lymphocytes and tachyzoites were seen in the spleen and lymph nodes, which were mainly necrotic. *T. gondii* infection was supported by HC-positive structures in the alveolar macrophages, hepatocytes and Kupffer cells (Fig. 1D), as well as by electron microscopy, which showed parasitic pear-like structures 2.5–3.0 μ m long, within macrophages and pneumocytes. They presented double membrane, a conoid and other apicomplexan organelles, i.e. micronemes, trophozoites, dense granules, elec-

trophic lipid vacuoles and amylopectin granules (Fig. 2A and B).

Amplicons of the *SAG2*, *GRAC* and *SAG3* genes but not of *B1* and *E18* loci were obtained. Only the *SAG3* band was sufficiently strong to perform the RFLP (Table 1), and none to sequence. Two fragments of 150 and 95 bp, similar to those of the type I RH strain, were observed. The parasite load was <14/mg liver of one monkey and 23/mg lung of the other animal.

Total toxoplasmosis has been described in most genera of New World primates (Gyimesi et al., 2006; Lindsay and Dubey, 2007). The reasons for this susceptibility are unclear, but the clinical course is rapid and the animals die suddenly, in some cases without preceding signs; if present, they are nonspecific and include lethargy, malaise, depression, anorexia, diarrhea, hypothermia, serosanguinous nasal discharge and respiratory distress (Epiphonio et al., 2003; Gyimesi et al., 2006; Salant et al., 2009). The animals of the present report had these signs, as well as macroscopic and histological lesions consistent with acute toxoplasmosis. Diagnosis was confirmed by several methods including immunohistochemistry and PCR for *SAG2*, *GRAC* and *SAG3* although faint bands were obtained for most genes, probably due to formalin fixation, which usually results in poor DNA yield and quality. Even though the severity of the lesions are compatible with a virulent type of the parasite, toxoplasmosis in new world primates has been related to had clinical status regardless of the strain involved. Salant et al. (2009) described an outbreak of toxoplasmosis in Israel, due to *SAG2* locus-type III parasites. The strains involved in two outbreaks during 2001 and 2006 in French Guiana were genotype II and recombinant/atypical, respectively, as assessed by 6 microsatellite markers (Carme et al., 2009a,b).

T. gondii has only been genotyped in isolates from chickens of the central region of Mexico, as well as from dogs and cats of the Northern State of Durango (Dubey et al., 2004, 2008). Five genotypes (one type II, three recombinants and one atypical) have been identified. Although there is a report about an outbreak in a colony of 25 captive squirrel monkeys in Jalisco (Western State), the genotype of the infecting strains was not determined (Espinoza-Aviles and Morales-Martinez, 2007). At least for one locus, the genotype of the infecting strains in the outbreak reported herein is different from those reported for New World monkeys of other regions.

References

- Carme, B., Bumar, M., Ajzenberg, D., Dwork, M.J., 2009a. Strains acquired through sexual contact by wild rapt of *Toxoplasma gondii* from French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 656–658.
- Carme, B., Ajzenberg, D., Demas, M., Simon, S., Dwork, M.J., Mouton, R., Dubey, J.P., 2009b. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. *Vet. Parasitol.* 163, 132–133.
- Cedillo-Pérez, C., 2009. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* in wildlife in Mexico (determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México). Thesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 138 pp.
- Dubey, J.P., Morales, E.S., Lehmann, T., 2004. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J. Parasitol.* 90, 411–417.
- Dubey, J.P., Jones, J.L., 2005. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 35, 1257–1278.
- Dubey, J.P., Ashmurgun, G.V., Alvarado Espinoza, L., Alvarado Espinoza, D., Rodríguez Peña, S., Martínez García, S., Lorañez Herrera, A., Ferrer, A., Le, K., Kim, O.G., Su, C., 2008. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *J. Parasitol.* 98, 119–122.
- Epiphonio, S., Sulbarán, H., Galán-Díaz, J.L., 2003. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. *J. Comp. Pathol.* 134, 194–200.
- Epinoza-Aviles, J., Morales-Martinez, M.S., 2007. Brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio. *Vet. Méx.* 58, 365–368.
- Gyimesi, Z.S., Lappin, M.R., Dubey, J.P., 2006. Application of assays for the diagnosis of toxoplasmosis in a colony of woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*). *J. Zoo Wildl. Med.* 37, 278–280.
- Kompoliti-Chelou, A., Pinar, I., Savaş, M.S., M., Sarıgözü, O., İzzet, F., 2007. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive *B1* gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol. Res.* 101, 619–625.
- Lindsay, Z.S., Dubey, J.P., 2007. Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In: Wiersa, J.G., Barr, K. (Eds.), *Toxoplasma gondii: The Great Apicomplexan: Perspectives and Methods*. Academic Press, Great Britain, pp. 133–152.
- Ng, H.T., Carmon, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 1671–1679.
- Papill-Supic, M., Demina, T., Gencic-Quintanilla, A., Valls, M.E., Mirkovic, M., Jimenez-Ariza, M.J., 1999. Designation of a highly sensitive nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. *J. Mol. Microbiol.* 48, 857–862.
- Rico Torres, P.C., 2006. Standardization and validation in the laboratory of a PCR test for detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples (Estándarización y validación en el laboratorio de una prueba de PCR para la detección directa de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas). Thesis, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 92 pp.
- Salant, H., Weingram, T., Spira, D.L., Eisenberg, T., 2009. An outbreak of toxoplasmosis among squirrel monkeys in an Israeli monkey colony. *Vet. Parasitol.* 159, 24–29.
- 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. *Int. J. Parasitol.* 36, 641–646.
- Walt, B.A., 2005. Toxoplasmosis. In: Fowler, M.E., Miller, R.E. (Eds.), *Zoo and Wild Animal Medicine*, 5th ed. W.B. Saunders, USA, pp. 745–746.

Frequency of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Stray Dogs of Oaxaca, México

C. Cedillo-Felices¹, I. D. Díaz-Figueroa¹, M. I. Jiménez-Borres¹, G. Sánchez-Hernández¹, and D. Correas, Laboratorio de Inmunología Experimental, Centro de Investigaciones Científicas Nacionales en Perifoneo, Secretaría de Salud, Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes Guadalupe, Delegación Cuajalajara, C.P. 34500, México, D.F., México; ²Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, Av. Universidad s/n, La Hacienda Cinco Señores, Ciudad Universitaria, C.P. 68120, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México; ³Unidad de Control Genético Anticiclónico, Calle Galindo No. 117, Centro, C.P. 68000, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México; (To whom correspondence should be addressed: cedillo_covawax@yahoo.com)

ABSTRACT. We studied the frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii* in stray dogs in the city of Oaxaca, México through the evaluation of 154 sera by indirect ELISA. A frequency of 61.7% was found; it was higher in male (45 of 65, 69.2%) than in female (9 of 39, 23.1%), although the difference was not statistically significant. An increase in frequency was observed with age, the lowest being among animals younger than 1 yr (4 of 20, 20.0%) and the highest in dogs older than 7 yr (21 of 25, 84.0%). This is the first study in dogs of this region of México and revealed high *T. gondii* transmission and evidence of early exposure in animals that are in close contact with contaminated water or raw meat, or both. Further studies are needed in order to understand the role of *T. gondii* in zoonosis in public health.

The frequency of *Toxoplasma gondii* infection in dogs has been extensively investigated worldwide. The role of canine toxoplasmosis in the epidemiology of this parasitic disease has not been clearly defined; thus, these animals can act as sentinels of environmental contamination with oocysts and can be used to demonstrate the available pressure to other hosts, including humans (Sarkis et al., 2006; Lindley and Dubey, 2007). Prevalence varies according to the geographical region and increases with age because *T. gondii* is a lifelong chronic infection (de Silva et al., 2005; Zhang et al., 2006). Serological studies of *T. gondii* in dogs of México have only been performed in the northern zone; thus, no information is available for the southern and southeastern regions, including the state of Oaxaca, where higher frequencies are expected due to warmer conditions (Dubey et al., 2002, 2009). The aim of the present paper was to describe the frequency of specific IgG antibodies in stray dogs from a city located in southeastern México.

The study was conducted in the city of Oaxaca de Juárez (17°42'N, 97°03'W), located at an altitude of 1,550 m above sea level, with an annual average temperature of 22.5°C, an average annual rainfall of 724.9 mm, and a population of >260,000 inhabitants (INEGI, 2010). Municipio De Oaxaca, 30.9% One-breed and nine-four dogs were randomly selected from the municipal canine and amniotic control center. The dogs had been captured in different parts of the city during a 4-mo period. Gender and age (estimated on the basis of dental analysis) of each animal were registered (Blaxter, 1969). Animals were grouped by age into 5 categories: younger than 1 yr, 1 to 2 yr, 2 to 5 yr, 5 to 7 yr, and 7 yr-old.

A blood sample without anticoagulant was collected from each animal by puncturing the cephalic vein; the serum was separated, dispensed, and frozen at -20°C until use. IgG antibody detection was carried out by indirect ELISA following the methodology described by Figueroa-Lirio et al. (2006). The samples were tested on polystyrene 96 well plates previously covered with 5 µl/ml of crude extract prepared from *T. gondii* RH strain tachyzoites. Each serum was diluted 1:40 in PBS 0.05% Tween® 20 and incubated at 37°C for 2 hr; subsequently, plates were washed six times with phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS, St. Louis, Missouri), diluted 1:40, was added and incubated as before. After washing, the chromogen substrate solution (H₂O₂/phenylenediamine) was added and incubated in the dark until color development, stopping the reaction with 0.1 M of 0.1 N citric acid/well. The absorbance (opt) values at 450 nm were obtained with an ELISA reader (Turner Biosystems, Sunnyvale, California). Negative and positive control sera from dogs previously confirmed by western blot were included in each plate. An ELISA index (EI) was calculated as described by Silva et al. (2007), with modifications by the following formula: EI = Abs (sample)

TABLE 1. Frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii* in relation to gender and age strata.

Variables/age	Total of animals	Seropositive	
		n	%
Gender			
Male	65	45	69.2
Female	39	9	23.1
Age (yr)			
<1	20	4	20.0
1-2	7	4	57.1
2-5	4	4	100.0
5-7	31	26	84.0
>7	25	21	84.0
Total	156	92	59.0

Abs (control). Samples with an EI >1.2 were considered positive. Differences in anti-*T. gondii* antibody frequencies among age groups and sexes were statistically tested using a Chi square test, while differences in mean EI were proved by an ANOVA, followed by a Mann-Whitney U-test, using JMP software (Version 5.0.1, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina).

Anti-*T. gondii* IgG antibodies were found in 95 of 154 dogs (61.7%). The frequency of antibodies in males was 69.2% and in females was 23.1%, although the difference was not significant. Increasing trends of antibody frequency and absorbance mean were observed along age strata, the lowest being found in animals younger than 1 yr (20.0%), and the highest among those older than 7 yr (84.0%) (Table 1). This increasing trend was statistically significant ($P<0.05$ for both variables).

The results obtained in the present study differ from those previously published in our country for this species being much higher than those in the state of Durango. Dubey et al. (2007) assessed dog fecal sludges of the city of Durango using a modified agglutination test (MAT) and found 91.9% (97 of 107) of the animals to be seropositive for *T. gondii*. Later, they evaluated samples of different animals, including a puppy by MAT as a serum dilution of 1:25, detecting antibodies against *T. gondii* in 68 (65.9%) of 103 animals tested (Dubey et al., 2008). No statistically significant difference was observed between genders, but a significant age-related increase was found, from 20% in young dogs to 54.0% in animals older than 7 yr. These results are similar to those described in other regions of the world (de Silva et al., 2005; Zhang et al., 2006).

This study is the first in this host in Oaxaca, México. We found a high frequency of infected dogs, higher than previously described for other regions, and evidence of early exposure which suggests environmental contamination with oocysts. This research is aimed this type of study to gain a better understanding of the epidemiology of *T. gondii* in México and its impact on public health.

The authors thank Héctor Lema-Pascón and Rafael López-Rubio for excellent technical support.

LITERATURE CITED

- de Silva, C. N., J. A. Harris, J. D. Watkins, and A. A. Attwood. 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Veterinary Parasitology* 113: 179–187.

DOI: 10.1645/08-395.1

- DE SILVA, A. V., S. R. FERRER, V. Y. DE LIMA, L. D'AMORIM, J. P. FERREIRA, F. M. TEIXEIRA, M. G. BUSTO, AND H. LAMOSO. 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Veterinary Parasitology* 127:21-26.
- DEWY, J. P., C. ALVARADO-ESQUEVEL, O. LINDENBERG, R. O. HERRERA-FERRAS, R. T. RAMÍREZ-SÁNCHEZ, A. GONZÁLEZ-HERRERA, S. A. MARTÍNEZ-GARCÍA, L. A. BARRERA, AND O. C. H. KOTEL. 2007. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in dogs from Durango city, Mexico. *Journal of Parasitology* 93: 1013-1016.
- , F. G. VALDEZMÁN, C. ALVARADO-ESQUEVEL, D. ALVARADO-ESQUEVEL, S. KOTELIN-OLIVERA, S. MARTÍNEZ-GARCÍA, A. GONZÁLEZ-HERRERA, L. R. FERRER, O. C. H. KOTEL, AND C. S. 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *Journal of Parasitology* 95: 319-322.
- DEWEES, C. S. 1953. Digestive system of carnivores. In *Anatomy of domestic animals*, S. Sisson and J. D. Grossman (eds.), Salvat Ciencia y Cultura Latinoamericana, Mexico City, Mexico, p. 1688-1709.
- FIGUEROA CASTILLO, J. A., V. DEARTE ROSAS, M. JIMÉNEZ ARRIAGA, H. LÓPEZ-PASTOR, AND D. CHAVEZ. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *Journal of Parasitology* 92: 394-395.
- INEGI. 2010. [Online]. Available at: <http://www.inegi.org.mx/datos/mexico-demografico/estadisticas/aspecto=70>. Accessed 4 May 2012.
- LINDENBERG, D. S., AND J. P. DEWY. 2007. *Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In Toxoplasma gondii: The eternal apicomplexan: Perspectives and methods*, L. M. Weiss and E. Kimbrell, Academic Press, London, U.K., p.133-150.
- MUNICIPIO DE DURANGO. 2010. Portal del Gobierno Municipal del Ayuntamiento de Durango de Durango. [Online]. Available at: <http://www.municipiodedurango.gob.mx/>. Accessed 10 December 2011.
- SERIAL, K., AND E. BARRERA. 2005. The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies in dogs and cats from the Czech Republic. *Veterinari Medicina* 10: 555-558.
- SHAN, D. A., J. LONER, T. W. P. MOYSE, AND J. R. MOYSE. 2007. Evaluation of sand grain tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off times and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 143: 236-264.
- ZHANG, H., D. H. ZHOU, Y. Z. CHEN, R. Q. LI, Z. G. YUAN, H. Q. SHAO, S. J. LI, AND X. Q. ZHOU. 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in stray and household dogs in Guangzhou, China. *Journal of Parasitology* 96: 671-672.

FREQUENCY OF ANTIBODIES AGAINST *Toxoplasma gondii* AND *Neospora caninum* IN DOGS OF GUANAJUATO, MEXICO

Carlos Cedillo-Peláez^a, Alejandro Besné-Mérida^a, Abner Josué Gutiérrez-Chávez^b, Jaime Badajoz-Martínez^b, Alejandro Angeles-Navarro^b, Alma Arianna Lechuga-Arana^b, Dolores Correa^{a*}.

a. Laboratorio de Inmunología Experimental, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud. Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530 México, D.F., México.
b. Medicina Veterinaria y Zootecnia. División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Silao, Universidad de Guanajuato. Ex Hacienda El Copal. Km. 9 Carretera Irapuato-Silao, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

*Corresponding author: Tel.: +52 (55) 1084 0900, ext. 1873; fax.: 1084 3883, E-mail address: mariadol@yahoo.com

Abstract

The aim of this paper is to describe the frequency of IgG antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* in dogs from different municipalities of the state of Guanajuato. We studied 252 serum samples from dogs of 8 different municipalities of the state, each animal provided data like gender, age, whether the animals were purebred or mixed, if they lived in rural or urban, in the inside or outside of the house and if they lived with dogs or cats. For *T. gondii*, determined a general frequency of 29.4% (74 of 252) and 29.0% (73 of 252) for *N. caninum*, while 52 animals (20.6%) were positive for both parasites. Twenty two animals (23.1%) had antibodies only against *T. gondii* and 21 (22.1%) only for *N. caninum*. The results by gender, no statistical difference was observed for *T. gondii*, *N. caninum* or both parasites. For other variables, was observed significant difference for *T. gondii* in race, habitat and coexistence; for *N. caninum*, only in race, and for both parasites, in race and origin. Comparing the frequencies by age, strata and municipalities, no significant difference was observed. Based on the results described above, we consider the distribution of these two protozoa could be virtually throughout the state. Although the overall frequency close to 30% are not as high as in other studies conducted in the country, we think that the percentages obtained are indicative of a constant exposure of canines to these two infectious agents in addition noteworthy that the dogs had higher frequencies of antibodies against these parasites were those living in urban areas. Also, although achievement presented evidence that dogs exposed to either agent. It is necessary to continue this type of studies in this and other species, to determine the conditions favoring the presentation and maintenance of biological cycles of these parasites, and their impact on public health in the state of Guanajuato.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, dogs, frequency, Guanajuato, Mexico.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two Apicomplexan protozoan parasites that infect a wide variety of warm-blooded vertebrates including dogs. In these

species both parasites can be transmitted congenitally. Most cases are asymptomatic, but both agents can cause neuromuscular disorders, encephalitis, systemic disease, keratoconjunctivitis and dermatitis (de Brito et al., 2002; Dubey and Jones, 2008a; Al-Qassab et al., 2009; Plugge et al., 2011).

Some authors believe that the rate of *T. gondii* infection in the dog population is an indicator of environmental contamination and therefore it may serve to suggest risk level for humans (de Brito et al., 2002). Being dogs the definitive hosts of *N. caninum*, they represent a risk for horizontal transmission to other animals, mainly cattle (Cruz-Vázquez et al., 2008).

Both parasites are found worldwide, with a seroprevalence varying from 2 to 89% for *T. gondii* and from 0 to 100% for *N. caninum*, depending on the geographical region, the habitat (urban or rural) or the alimentary habits of the host (Dubey et al., 2007a; Dubey et al. 2007b). In Mexico, the prevalence of these parasites has been separately described in several hosts and different regions, mainly in the north and center of the country. The data indicated the presence and maintenance of the biological cycles. Studies of *T. gondii* have been conducted mainly in humans, sheep and cats while *N. caninum* has been primarily studied in bovines (Besné-Merida et al., 2008; Caballero-Ortega et al., 2008; Cruz-Vázquez et al., 2008; Alvarado-Esquivel et al., 2011).

Both parasites have been searched separately in dogs of some states of our country, and frequencies of 34.0 to 61.7% for *T. gondii* and 1.9 to 51.8% for *N. caninum* have been found (Martínez-Maya, 1986; Sánchez et al., 2003; Cruz-Vazquez et al., 2008; Dubey et al., 2007a; Dubey et al., 2009; Cedillo-Peláez et al., 2011; Cedillo-Peláez et al., 2012). There is only one study in Northern of Mexico (Durango) in which the frequency of antibodies to both parasites was determined, with no coinfection detected (Dubey et al., 2007a).

The State of Guanajuato is located in the central part of the country, with variable climate within, from dry -warm to humid-temple. It is considered one of the leading agricultural entities in the country with a diversity of crops of about 70 species. Likewise, Also, bovine and goat production is distributed throughout the State, while pigs are concentrated in the center and south, and sheep in the north and northeast (<http://sda.guanajuato.gob.mx.html>, 2012). In most of these production systems the presence of both domestic and feral cats and dogs is common, which together with the environmental aspects, suggest that there are conditions necessary for the transmission and dissemination of both parasites to others hosts throughout the state.

In a preliminary study we determined IgG antibodies to *T. gondii* in 73 dogs in three municipalities of the State of Guanajuato, obtaining an overall frequency of 42.5% (Cedillo-Pelaez et al., 2011). The results generated interest in analyzing their potential impact on human and animal health, as well as coexistence with other parasites such as *N. caninum*.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in the state of Guanajuato (21° 52' - 19° 55' N and 99° 41' - 102° 09' W) located in the central part of the country at an average altitude of 2,305 meters above sea level (Figure 1). It is an area of 30,607 km², with average annual temperature of 18.2°C (5.2 to 30°C) and rainfall of 702.4 mm. Its climate is dry and semidry mainly in the North (covering 43% of the state surface) warm humid in the South-West and East (33% of the surface). The rest of the state is tempered humid (24% of the surface). The total human population in the state is >5,486,000 inhabitants. (www.inegi.org.mx, 2012; <http://mapserver.inegi.gob.mx/2011>; <http://sda.guanajuato.gob.mx.html>, 2012).

We studied 252 serum samples taken from an existing bank collected for other research works related to parasitic infections during the vaccination campaign against rabies in 2011. For this study those samples that did not have the information described below or which amount was insufficient, were not included. Data gathered from each animal included gender, age (estimated on the basis of dentition) race type, i.e. whether they were purebred or mixed, if they lived in rural or urban zones, inside or outside the house and if they lived with other dogs or cats. The animals were from eight municipalities of the state (Figure 1).

The detection of IgG antibodies to *T. gondii* was carried out by indirect ELISA, following the methodology described before and always including negative and positive control sera from dogs previously evaluated (Cedillo-Pelaez et al., 2012). The samples were evaluated in polystyrene 96-wells plates (Nunc-Immuno™ Plates, Thermo Scientific) covered with 5 µg/ml of crude extract from *T. gondii* RH strain tachyzoites. Each serum was diluted 1:400 in PBS 0.05% Tween 20 (PBS-Tween) and incubated at 37°C for 2 hours. Subsequently, the plates were washed and added with the specific conjugate (anti-dog IgG, Sigma) coupled to peroxidase, diluted 1:2500 in PBS-Tween, and incubated as before. The plates were then washed and the chromogen-substrate solution (H₂O₂/O-phenyldiamine) was added left in the dark until color development. The reaction was stopped with 50 µL of 0.1 N sulfuric acid to each well.

For detection of antibodies against *N. caninum*, we used the antigen-covered plates of a commercial indirect ELISA kit for bovines (CIVTEST BOVIS Neospora®, HIPRA Laboratories) and performing the rest of the assay as that for *T. gondii*, including the development solution. Sera were tested at 1:100 dilution, as suggested in the kit and in two publications on the search for dog antibodies using similar kits (Sanchez et al., 2003; Cruz-Vazquez et al., 2008).

The absorbance values for both assays were obtained by reading each plate in a commercial ELISA reader (Turner Biosystems 9300-010) at 490 nm. The cutoff points were estimated based on frequency distribution of negative sample values (Wouda et al., 1999, Sanchez et al., 2003). Results were expressed as ELISA index (EI) based on that described by Silva et al. (2002), using the following formula: $EI = OD \text{ sample} / OD \text{ cutoff}$ (OD: Optical density). Samples with $IE \geq 1.0$ were considered positive. The frequencies of antibodies per age group and gender, as well as other biometric data were calculated with Excel (Microsoft Office 2003). To compare the antibody frequency among areas and the relation to climate, municipalities were grouped in dry-semidry-tempered-climate (DSDT) and warm humid (WH).

Antibody frequency differences were statistically tested by Chi square, using Epi-Info V7.0 (CDC, Atlanta, GA, USA), *P*-values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Anti-*T. gondii* and *N. caninum* antibodies were present in 29.4% (74) and 29.0% (73) of the 252 dogs, while 52 animals (20.6%) were positive for both parasites (Figure 2). Twenty two animals (23.1%) had antibodies exclusively against *T. gondii* and 21 (22.1%) only for *N. caninum*. The results by gender, are described in Table 1, no statistical difference observed for *T. gondii*, *N. caninum* or both parasites. We compared the frequencies of the areas of origin (urban vs. rural), race (pure vs. mixed), habitat (indoors vs outdoors) and coexistence with other animals (not cohabiting vs. living with dogs and cats), significant difference was observed for *T. gondii* in the variables of race, habitat and coexistence; for *N. caninum* only race, and for both parasite, race and origin (Table 1). Comparing the frequencies by age strata, no significant difference was observed.

Municipalities with highest frequency of *T. gondii* were Guanajuato (50.0%), Celaya (40.9%) and San Miguel Allende (33.3%), while for *N. caninum*, they were San Miguel Allende (44.4%), Irapuato (33.3%) and Leon (32.3%) (Table 2). No significant difference was observed between the frequencies of *T. gondii*, *N. caninum* or co-infections among municipalities.

By analyzing the frequency by type of weather, municipalities with climate DSDT showed a frequency of antibodies against *T. gondii* of 37.0%, for *N. caninum* of 31.0% and 23.0% both parasites; while municipalities with climate WH, the frequencies were 24.3, 27.6 and 19.0%, respectively. Statistical difference was observed only at frequencies for *T. gondii*, being higher for municipalities with climate DSDT.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this paper, we obtained an overall frequency of 29.4% for *T. gondii*, 29.0% for *N. caninum* and 20.6% for both parasites, confirming the presence of these two parasitic infections and coinfection in most municipalities.

In the case of *T. gondii*, the overall frequency was lower when compared with the results described previously in other states of Mexico, including those described in our previous study in three municipalities in the state (Table 3). This is probably due to the type of population studied in this work were house dogs, unlike street or feral dogs in most of the cases studied in other works, which are exposed to various environmental conditions such as consumption food waste in landfills, increasing the possibility of infection from environmental contamination by oocysts (Cedillo-Peláez et al., 2011).

For *N. caninum*, the frequency was similar to that described in Hidalgo overall frequency (35.0%) (Sanchez et al., 2003) and Aguascalientes (31.7%) (Cruz-Vázquez et al., 2008). However, when comparing the frequency of canine from urban areas of this study (31.4%), this was higher than those reported for this category than that determined in dogs of the two states mentioned above, 20.0% for both (Table 3).

These are the first results of co-infection described in this country, since the only study to detect antibodies to both parasites in the state of Durango (Dubey et al., 2007a) found a frequency of 51.5% for *T. gondii* and 1.9% for *N. caninum*, but without the latter animals had antibodies against the first parasite. The results are reinforced when correlated IE of all samples tested (252) in both studies showing a $R=0.762$, contrasting this result when correlated IE only animals that tested positive for either test, determining a $R=0.434$ indicating that more than half of the animals had antibodies for only one of the two parasites evaluated (Figure 2).

It is known that both protozoa have similar morphological and biological characteristics with several publications where reactions of cross-antigenicity are described, particularly when antibodies are determined by immunoblotting and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using crude extract or antigen; likewise with immunohistochemistry using mono and polyclonal (antisera) antibodies (Zhang et al., 2007). However in recent years, there have been various studies to characterize specific biological, genetic or molecular characteristics to each parasite such as secreted proteins of dense granules, micronemal or rhoptries or surface antigens (SAG or SRS) (Reid et al., 2012), these data plus various recent studies of antibody frequency for both parasites where differences between groups are significant, shows animals with double infection or co-infection independent of each other, for example Paulan et al. (2013), studied 93 samples from dogs in rural areas of Brazil, determining a frequency of 47.3 % for *T. gondii* and 6.5 % for *N. caninum*.

When analyzing the results by gender, there was no significant difference for any of the two parasites, which was similar to that described in the literature (Cruz-Vázquez et al., 2008, Zhang et al., 2010). However, in the case of frequencies for age, although no significant difference observed between the strata for *T. gondii*, *N. caninum* or both agents should be noted that in animals under 12 months were determined frequencies of 33.3%, 33.3% and 25.0%, respectively, possibly by transmission of maternal antibodies or early exposure to these agents (Dubey et al., 2008b; Yildiz et al., 2009). Also, as was increasing age, the frequencies obtained did not have a marked difference, except for the stratum from 49 to 60 months, which reached frequencies of 43.7%, 50.0% and 43.7% respectively. Cedillo-Peláez et al (2012), determined antibodies against *T. gondii* by indirect ELISA in 154 stray dogs in the city of Oaxaca, Mexico, noting that the animals under 1 year of age had the lowest frequencies (20.0%), increasing to reach a frequency of 84.0% in dogs over 7 years or more. Cruz-Vázquez et al. (2008), analyzed 152 samples of canine in Aguascalientes, Mexico, to detect antibodies against *N. caninum*, observing a similar phenomenon, finding a frequency range from 25.0% (animals less than 5 years) to 67.0% (dogs 11 to 15 years old). The lack of increase in the frequencies for *T. gondii*, *N. caninum* and co-infection, suggest less exposure to what may be due to environmental contamination with oocysts of *T. gondii* or vertical transmission of *N. caninum*, but enough to keep the biological cycles in the regions studied.

It is striking that in analyzing the data related to the habitat of animals, the higher frequencies for *T. gondii*, *N. caninum* and infection with both parasites were found in the categories of purebred animals that lived inside the home and those who lived with other animals (dogs and cats) that were statistically significant, plus the highest frequencies (82.4% for *T. gondii*, 82.2% for *N. caninum* and 86.5% co-infection) were also found in animals from urban areas, this suggests that probably the conditions under which these dogs are being kept favors their exposure to infection for these two parasites. Yildiz et al. (2009) studied 121 samples from dogs by indirect immunofluorescence to detect antibodies against *N. caninum*, determining an overall frequency of 28.9%. These samples were tested for Sabin and Feldman for a possible co-infection with *T. gondii*, resulting 19 dogs positive. Of these animals with co-infection, seropositivity was detected in several animals living in urban gardens. The authors report that under natural conditions, dogs easily come into contact with cat feces that contain oocysts of *T. gondii*, and that in urban areas, feral cats play an important role in the epidemiology of toxoplasmosis, increasing exposure in those who are also pet dogs fed raw or undercooked meat that could contain viable tissue cysts of *T. gondii* and / or *N. caninum*.

Comparing the frequencies of municipalities, there was no significant difference, however, some municipalities had a higher frequency of *T. gondii* (50.0% Guanajuato, Celaya 40.9% and 33.3% San Miguel Allende) and others to *N. caninum* (44.4% San Miguel Allende, Irapuato and Leon 33.3% 32.2%), the municipality that was more frequent in coinfection was Celaya (27.3%). The variation in frequencies may be related to conditions in each municipality (climatic conditions, land use, livestock activities, etc.) favoring the exposure level for each infectious agent and even coinfection. Several authors have described as one of the main risk factors for the epidemiology of *N. caninum*, canine contact with cattle, describing prevalence of 40.7 to 51.5% in dogs under these conditions (Sanchez et al., 2003; Cruz-Vázquez et al., 2008), while for *T. gondii*, exposure of stray dogs to food or water contaminated by oocysts, reaching frequencies up to 61.7% as the case of the city of Oaxaca (Cedillo-Peláez et al., 2011).

With regard to the climate, it is noteworthy that municipalities with DSDT climate had higher frequencies, expecting us to go opposite and this is presented in WH climate

zone. The cause of this behavior may be the same as for the other factors evaluated. Recently in our working group analysed the frequency of *T. gondii* in human population of the Mexican Republic, samples from two National Health Surveys in 2000 and 2006, being determined for the State of Guanajuato, frequencies of 40.0-49.9% and 30.0-39.9%, respectively (Caballero-Ortega et al., 2012). In the present study, for DSDT climate zones the frequency was 37.0%, being within the range described for the human population between both years.

Based on the results described above, we consider the distribution of these two protozoa could be virtually throughout the state. Although the overall frequency close to 30% are not as high as in other studies conducted in the country, we think that the percentages obtained are indicative of a constant exposure of canines to these two infectious agents in addition noteworthy that the dogs had higher frequencies of antibodies against these parasites were those living in urban areas.

It is necessary to continue this type of studies in this and other species, to determine the conditions favoring the presentation and maintenance of biological cycles of these parasites, and their impact on public health in the state of Guanajuato.

ACKNOWLEDGEMENTS

M en C Mario Enrique Espinosa-González for donating the comercial indirect ELISA kit for the diagnosis of *N. caninum*. Hector Luna pasten and Rafael López Reboseño for the excellent technical laboratory assistance.

REFERENCES

1. Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Su, C., Jenkins, D., Hall, C., Windsor, P.A., Dubey, J.P., Ellis, J. 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 164, 335-339.
2. Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Martínez, S., Pizarro-Villalobos, H., Arce-Quiñones, M., Liesenfeld, O., Dubey, J.P. 2011. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in general population in a northern Mexican city. *J. Parasitol.* 97,40-3.
3. Besné-Mérida, A., Figueroa-Castillo, J.A., Martínez-Maya, J.J., Luna-Pastén, H., Calderón-Segura, E., Correa D. 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Vet. Parasitol.* 157, 310-313.
4. Caballero-Ortega, H., Quiroz-Romero, H., Olazarán-Jenkins, S., Correa, D. 2008. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology.* 135,897-902.
5. Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F.J., Conde-Glez, C.J., Cedillo-Peláez, C., Vargas-Villavicencio J.A., Luna-Pasten, H., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L.B., Correa, D. 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 653-659.
6. Cedillo-Peláez, C., Gutiérrez-Chávez, A.J., Besné-Mérida, A., Xicotencatl-García, L., Badajoz-Martínez, J., Luna-Pasten, H., López-Reboseño, R., Correa, D. 2011. Frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en perros de diferentes municipios del estado de Guanajuato, México. *Biomédica.* 31 (Sup.3): 317.
7. 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. *J. Parasitol.* 98, 871-872.

8. Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Marentes, A., Morales-Salinas, E., García-Vázquez, Z. 2008. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.* 157, 139-43.
9. de Brito, A.F., de Souza, L.C., da Silva, A.V., Langoni, H. 2002. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97, 31-35.
10. Dubey, J.P., Alvarado-Esquivel, C., Liesenfeld, O., Herrera-Flores, R.G., Ramírez-Sánchez, B.E., González-Herrera, A., Martínez-García, S.A., Bandini L.A., Kwok, O.C.H. 2007a. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango city, Mexico. *J. Parasitol.* 93, 1033-1035.
11. Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M. 2007b. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews.* 20, 323-367.
12. Dubey, J.P., Jones, J.L. 2008a. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol.* 38, 1257-1278.
13. Dubey, J.P., Stone, D., Kwok, O.C.H., Sharma, R.N. 2008b. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in dogs from Grenada, West Indies. *J. Parasitol.* 94; 750-751.
14. Dubey, J.P., Velmurugan, P.G., Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., González-Herrera, A., Ferreira, L.R., Kwok, O.C., Su, C. 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *J Parasitol.* 95, 319-322.
15. INEGI. 2012. [Online]. Available at: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>.
16. Martínez-Maya, J.J. 1986. Sondeo serológico para la detección de anticuerpos contra toxoplasmosis en perros de la ciudad de México y su importancia en la salud pública. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 24 pag.
17. Paulan, S. de C., Lins, A.G., Tenorio, M. da S., Silva, D.T., Pena, H.F., Machado, R.Z., Gennari, S.M., Buzetti, W.A. 2013. Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 162-166.
18. Plugge, N.F., Ferreira, F.M., de Barros-Richartz, R.R.T., de Siqueira, A., Dittrich, R.L. 2011. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.* 20, 202-206.
19. Portal de Internet del Gobierno del Estado de Guanajuato. 2012. Available at: <http://sda.guanajuato.gob.mx.html>.
20. Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Könen-Waisman, S., Latham, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., Sanders, M., Shanmugam, D., Sohal, A., Wasmuth, J.D., Brunk. B., Grigg, M.E., Howard, J.C., Parkinson, J., Roos, D.S., Trees, A.J., Berriman, M., Pain, A., Wastling, J.M. 2012. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: *Coccidia* differing in host range and transmission strategy. *PLoS.* 8, e1002567.
21. Sánchez, G.F., Morales, S.E., Martínez, M.J., Trigo, J.F. 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 67, 142-145.
22. Silva, D.A.O., Silva, N.M., Mineo, T.W.P., Pajuaba-Neto, A.A., Ferro, E.A., Mineo,

- J.R. 2002. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH. *Vet. Parasitol.* 107, 181-195.
23. 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. *Int J Parasitol.* 29, 677-82.
24. Yildiz, K., Yasa-Duru, S., Yaggi, B.B., Babur, C., Ocal, N., Gurcan, S., Karaca, S. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* and coexistence with *Toxoplasma gondii* in dogs. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 33, 116-119.
25. Zhang, H., Zhou, D.H., Chen, Y.Z., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Song, H.Q, Zhu, X.Q. 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in stray and household dogs in Guangzhou, China. *J. Parasitol.* 96, 671-672.

Table 1. Frequency of antibodies against to *T. gondii* and *N. caninum* in relation to several variables

Variable/ group	n	<i>T. gondii</i> positive			<i>N. caninum</i> positive			Positive to both parasites		
		n	%	<i>P</i>	n	%	<i>P</i>	n	%	<i>P</i>
Gender										
Male	113	31	27.4		32	28.3		23	20.4	
Female	139	43	30.9		41	29.5		29	20.9	
Origin										
Urban	191	61	31.9		60	31.4		45	23.6	<
Rural	61	13	21.3		13	21.3		7	11.5	0.05
Race										
Pure	125	50	40.0	<0.01	49	39.2	<0.01	37	29.6	<0.01
Mixed	127	24	18.9		24	18.9		15	11.8	
Housing										
Outdoors	178	44	24.7	<0.05	47	26.4		32	18.0	
Indoors	74	30	40.5		26	35.1		20	27.0	
Coexistence*										
LDC	219	59	26.9	<0.05	61	27.9		41	18.7	
NLDC	33	15	45.5		12	36.4		11	33.3	
Total	252	74	29.4		73	29.0		52	20.6	

*Coexistence: living with dog and cat (LDC) vs no cats and dogs living together (NLDC).

Table 2. Frequency of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* by municipality.

Municipality	n	<i>T. gondii</i> positives		<i>N. caninum</i> positives		Both parasites positives	
		n	%	n	%	n	%
Guanajuato	16	8	50.0	4	25.0	3	18.7
Celaya	44	18	40.9	13	29.5	12	27.3
SM Allende	9	3	33.3	4	44.4	2	22.2
Cuerámaro	10	3	30.0	2	20.0	2	20.0
Irapuato	84	25	29.7	28	33.3	20	23.8
León	31	8	25.8	10	32.2	6	19.3
Salamanca	55	9	16.3	12	21.8	7	12.7
Juventino R	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Total	252	74	29.4	73	29.0	52	20.6

Table 3. *T. gondii* y *N. caninum* frequencies described in different States of Mexico

State	Canines Origin/type	n	Technique*	Positives				References
				<i>T. gondii</i>		<i>N. caninum</i>		
				n	%	n	%	
Distrito Federal	Urban/Stray	200	IFAT	105	52.5	---	---	Martínez-Maya, 1986
	Urban/House	100	IFAT	34	34.0	---	---	
	Total	300	---	139	46.3	---	---	
Hidalgo	Urban/House	30	ELISA	---	---	6	20.0	Sánchez et al., 2003
	Rural/Barn	27	ELISA	---	---	14	51.8	
	Total	57	---	---	---	20	35.0	
Aguascalientes	Urban/Stray	116	ELISA	---	---	23	20.0	Cruz-Vazquez et al., 2000
	Rural/Barn	152	ELISA	---	---	62	40.7	
	Total	268	---	---	---	85	31.7	
Durango	Urban/Stray and house	101	MAT IFAT-NAT	52	51.5	---	---	Dubey et al., 2007a
	Rural/feral	150	MAT	68	45.3	---	---	
Guanajuato	Urban/stray	73	ELISA	31	42.5	---	---	Cedillo-Peláez et al., 2011
	Rural/Barn							
Oaxaca	Urban/stray	154	ELISA	94	61.7	---	---	Cedillo-Peláez et al., 2012

*Technique: IFAT, indirect immunofluorescent antibody test; ELISA, ; MAT, modified agglutination test; NAT, *Neospora* sp. agglutination test.

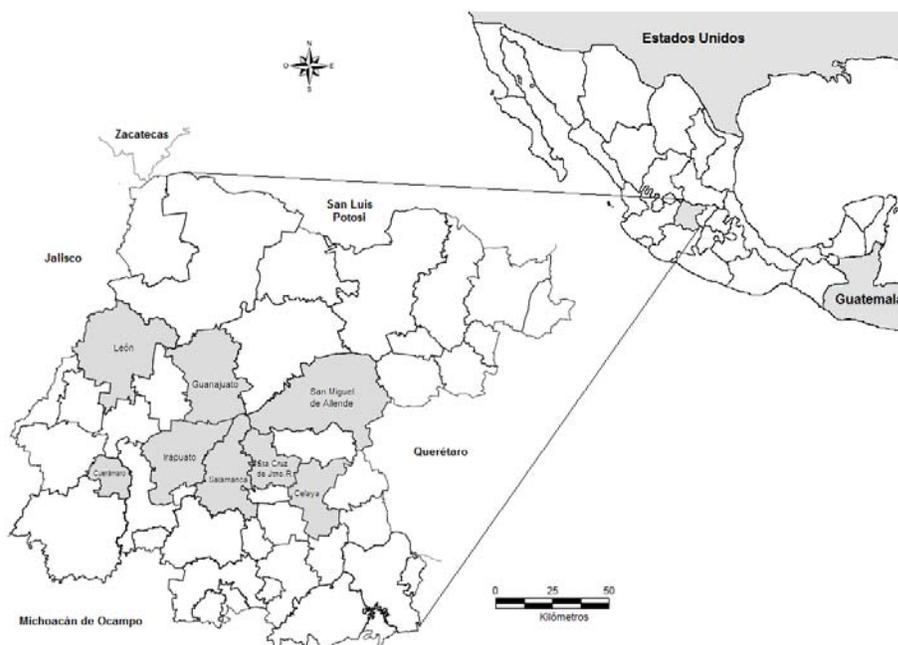


Figure 1. Map of the Mexican Republic and the State of Guanajuato, gray shading in the municipalities where the study took place.

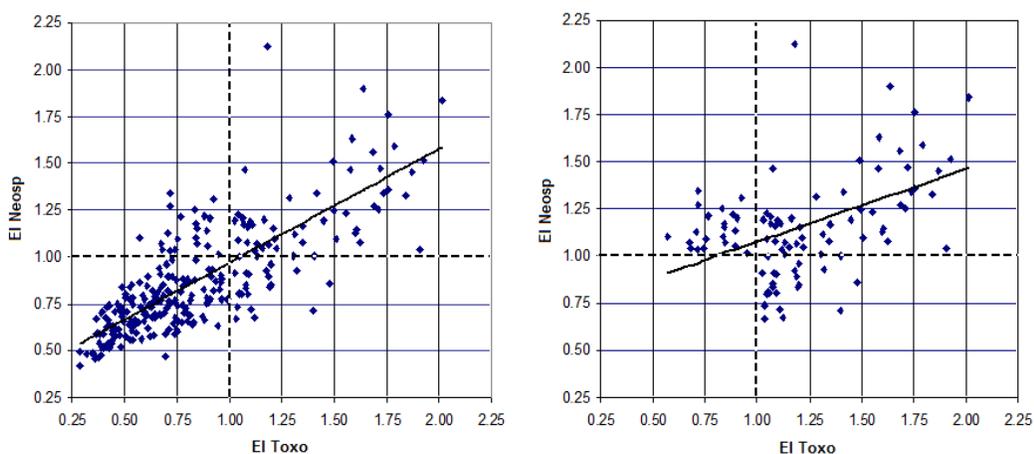


Figure 2. Scatter plot comparing the results expressed as ELISA index (EI) for both trials. Observed in all animals tested (A), a correlation of 0.762 (“R”). When analyzed only positive animals (B), the correlations is 0.434, the remainder being positives only one of the two tests (box top left and bottom right). Dotted lines delimit positive animals ($EI \geq 1.000$).

2. Liu Y, Ye X, Zhang H, et al. Characterization of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolated from children in Shanghai, China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67:355–358.
3. Morozumi M, Takahashi T, Ubukata K. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother*. 2010;16:78–86.
4. Chironna M, Sallustio A, Esposito S, et al. Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:734–737.
5. Pereyre S, Charron A, Renaudin H, et al. First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains isolated in France over 12 years. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3534–3539.
6. Wolff BJ, Thacker WL, Schwartz SB, et al. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3542–3549.
7. Li X, Atkinson TP, Hagood J, et al. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:693–696.
8. Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, et al. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1546–1553.
9. Matsubara K, Morozumi M, Okada T, et al. A comparative clinical study of macrolide-sensitive and macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infections in pediatric patients. *J Infect Chemother*. 2009;15:380–383.
10. Cao B, Zhao CJ, Yin YD, et al. High prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China. *Clin Infect Dis*. 2010;51:189–194.
11. Lu A, Wang L, Zhang X, et al. Combined treatment for refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia with Ciprofloxacin and Glucocorticoid. *Pediatr Pulmonol* 2011;46:1093–1097.
12. Lung DC, Chan YH, Kwong L, et al. Severe community-acquired pneumonia caused by macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in a 6-year-old boy. *Hong Kong Med J*. 2011;17:407–409.

Sur 3700-c, Col Insurgentes Cuicuilco, Mexico 04530, DF México. E-mail: mariadol@yahoo.com or mcorreab@pediatria.gob.mx.
 Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.pidj.com).
 Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins
 DOI: 10.1097/INF.0b013e318241f564

Transmission of *Toxoplasma gondii* occurs horizontally by ingestion of contaminated water or meals, or vertically.¹ Infection severity in humans depends on host and parasite factors, like immune response, stage, dose, and virulence of the infecting strain.² During the first weeks of gestation, vertical transmission is infrequent, but if it occurs, causes major damage, including abortions and stillbirths.³ By the end, rate of transmission increases to near 80%, but the proportion of ill newborns lowers to around 15%. However, such infections may cause eye or central nervous system sequels.³ Strain virulence seems to be one of the key factors for disease presentation and severity in humans, but it is yet unclear whether it is related to vertical transmission or fetal damage.^{4,5} Parasite variants were first classified in 3 clonal lineages according to their pathogenicity in mice, being type I strains more virulent and commonly associated to bad clinical outcome in humans with acquired or congenital infection.^{4,6–9} Prevalent strains among congenital cases in France have been type II mainly, whereas type I variants were found in lower proportion.^{6,7} Recent studies have shown a larger genetic variability worldwide.^{8,10,11} In fact, *T. gondii* is now classified in 12 haplogroups spread out in different species of the world.^{12,13} Very few reports in animals reveal a predominance of types I and III in Mexico, although recombinant and atypical variants have also been found.^{14–19} Even though a high prevalence of congenital toxoplasmosis has been found in central Mexico (0.2%, 95% confidence interval: 0.07%–1.2%), no data on frequency in other regions or about infecting genotypes are available nowadays.²⁰ The aim of this study was to determine the parasite genotype and load in cases of perinatal toxoplasmosis of Mexico.

MOLECULAR DIAGNOSIS AND GENOTYPING OF CASES OF PERINATAL TOXOPLASMOSIS IN MEXICO

Claudia Patricia Rico-Torres, MSCI,*
 Ricardo Figueroa-Damián, MD, PhD,†
 Carlos López-Candiani, MD,*
 Héctor Alberto Macías-Avilés, MD,*
 Carlos Cedillo-Peláez, MSCI,*
 Irma Cañedo-Solares, MSCI,*
 Héctor Luna-Pastén, BSCI,*
 Blanca Luz Tecuatl-Herrada, MD,*
 and Dolores Correa, PhD*

Abstract: *Toxoplasma gondii* congenital transmission depends partially on parasite load and genotype. Both factors were examined in 4 mother/newborn pairs with perinatal infection acquired in central Mexico. Type I and type I-related strains were identified. These results add information regarding *T. gondii* strains prevailing in humans, although neither the genotype nor the load were related to vertical transmission or damage.

Key Words: congenital toxoplasmosis, genotyping, *Toxoplasma gondii*, vertical transmission

Accepted for publication November 14, 2011.

From the *Instituto Nacional de Pediatría, Lab Inmunología Experimental, Secretaría de Salud, México DF, México; and †Instituto Nacional de Perinatología, Secretaría de Salud, México DF, México.

Supported partially by grant 69666 from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT). The authors have no other funding or conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Dolores Correa, PhD, Lab Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, S5a Torre de Investigación, Av. Insurgentes

MATERIALS AND METHODS

Four cases of perinatal toxoplasmosis diagnosed at the Instituto Nacional de Perinatología and Instituto Nacional de Pediatría between 2004 and 2009 are included in this report (Table, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/B16>). Two cases were identified through pre- and postnatal screening project (project approved by the Research and Ethics Committees of both institutions). The other 2 were clinical cases identified after birth because they presented signs which required etiology confirmation for clinical management. Serological tests used for diagnosis of *T. gondii* infection, demonstration of acute phase, and congenital infection were based on IgG and IgM antibody detection by indirect and capture enzyme-linked immunosorbent assays and Western blot, as well as IgG avidity by enzyme-linked immunosorbent assay.²⁰ Molecular diagnosis was done by end point polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR of the *B1* gene using various sample types (Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/INF/B17>).^{19,21} *SAG2*, *SAG3*, *GRA6*, and *BTUB* genes were analyzed to determine strain genotype by PCR-restriction fragment length polymorphism.¹⁹ In one case, the *SAG2* amplicon could be purified to sequence it at the Instituto de Biotecnología, (National Autonomous University of Mexico); sequence was aligned with those reported in GenBank, Sibley Laboratory web page (www.sibleylab.wustl.edu), Clustal W2, NCBI/BLAST, and DNAMAN.

RESULTS

Both mothers identified through prenatal screening were treated with spiramycin, until amniocentesis was performed. In

one case, vertical transmission was confirmed by PCR of spleen, lung, and brain tissues of one mouse inoculated with the same fluid (Fig. and Table, Supplemental Digital Content 3 and 2, <http://links.lww.com/INF/D18> and <http://links.lww.com/INF/D17>). Treatment was changed to diademycin alternated with pyrimethamine/sulfadiazine/folinic acid, every 21 days. The newborn was asymptomatic at birth, but 2 years later, he developed mild mental retardation. The second mother harbored an infection not transmitted to the fetus, although the parasites were circulating. Therefore, treatment with spiramycin was continued until the end of pregnancy. Two newborns with symptomatic congenital infection are also reported herein. One of them died during the second month of life due to systemic lesions, whereas the other is alive, but with hydrocephalus, chorioretinitis, and cerebral calcifications (Table, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/D16>). Multi-copy *B7* gene was a good marker to detect *T. gondii* by endpoint and especially real time PCR (Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/INF/D17>). Parasite load was variable among 3 patients diagnosed directly. All mothers were asymptomatic in spite of the fact that 2 presented circulating parasites. *B7UB* and *SAG2* restriction fragment length polymorphism patterns presented unique alleles in case 1 and case 2, which suggest that these parasites were different from, but related to type I strains. Genotype of cases 3 and 4 was classic I as shown by *SAG3* and/or *SAG2* restriction fragment length polymorphism patterns (Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/INF/D17>). Sequence of *SAG3* gene of the third newborn had 100% identity with type I strains (data not shown).

DISCUSSION

There are no studies in Mexico concerning genotype characterization of *T. gondii* in human infections in general and in congenital forms in particular. In 2 mother son pairs of the present study, the parasites were type I as determined at least for 1 gene, while the other 2 were different from but related to it. These results are consistent with most strains infecting domestic and feral animals of Mexico.^{13,15,20} Parasite load was apparently not related to either vertical transmission or pathology in the 3 congenitally infected fetuses diagnosed directly, although the number of cases was low and the type of samples gathered to analyze this parameter was quite heterogeneous. Besides, 2 mothers received treatment while the other 2 did not. In relation to vertical transmission, it was noteworthy that mother of pair 2 had circulating parasites, but her fetus did not get infected. Two aspects must be considered: first, she was diagnosed during the 10th week of gestation, when transmission is uncommon, and second the received spiramycin treatment (two sporadic cases of maternal, but not congenital, infection acquired during or after the second gestation trimester in France were due to type I strains).⁷ Clearly, transmissibility of type I strains along gestation deserves further investigation.

Two congenital cases of the present study had severe disease, 1 being fatal soon after birth. The third case was born asymptomatic and developed mild problems later on, even though it has to be emphasized that pre- and postnatal treatments were provided, possibly lowering parasite load and thus extensive damage. It has been proposed that prenatal treatment diminishes the risk of disease occurrence and its severity.²¹ Pregnancy time at the moment of the infection is the most important factor for clinical outcome in the newborn, although this conclusion comes from a majority of cases due to type II or "hemivirulent" strains.²² Moreover, no asymptomatic congenital cases due to type I strains have been found, including those 3 reported herein.²³ It is actually unclear whether or not parasite genotype is related to vertical transmission or clinical damage, but it is important to analyze this because it

could have an effect on clinical management of pregnant women and newborns.

Our results demonstrate that type I strains are circulating in congenitally infected children in Mexico, few years ago, we found 2 congenitally infected cases among 1000 newborns of Mexico City through an initial screening, both children were apparently healthy and remained so for up to 2 years, although one of them was born premature; unfortunately, we could not genotype the infecting strains. Therefore, the presence of nontype I strains in Mexico remains to be established.²⁴ Similarly, the frequency of congenital toxoplasmosis and its impact on public health remain to be established because there are no pre- or postnatal screening programs. The results showed herein and in other studies support the establishment of specific policies to control *T. gondii* transmission in the country.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Susi Esther Calderón-Segura and Rafael López Roboreño for excellent technical support.

REFERENCES

- Amisotbe-Thomas E, Petersen E. Congenital Toxoplasmosis. *Strategic Management, Clinical Management and Control*. Paris, France: Springer-Verlag; 2000:224.
- Chao-Aguayo LD, Carrozzini-Olivera H, Claudio-Solano E, et al. Congenital toxoplasmosis: established immune genes related to vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun*. 2010;11:363–372.
- Hern H, Walker M, Ayres E, et al. Mother to child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999;353:1870–1871.
- Bowe DS, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995;172:1561–1566.
- Dowse BK, Houzé S, Davainé E, et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1411–1414.
- Brucato E, Kiefer M, Huetten C, et al. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1366–1370.
- Ajzenberg D, Cogné M, Paris L, et al. Genotype of 96 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2007;195:658–666.
- Fernán A, Miki E, Chazotte B, et al. Genetic analysis of natural infections and the clonal *Toxoplasma gondii* diversity in humans in 9. 14–10137. *Infect Genet Evol*. 2006;6:22–31.
- Ahidi Hamani DM, Hossaini CM. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from Senegal patients with toxoplasmosis. *J Egypt Soc Parasitol*. 2008;38:301–306.
- Barghame S, Ben Abdellil S, Aïch E, et al. Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). *Am J Med Sci*. 2010;340:1041–1046.
- Delhez L, Ajzenberg D, Sletten B, et al. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Pediatr Drugs*. 2010;21:902–905.
- Khan A, Fox H, Su C, et al. Broad immunological overlap of *Toxoplasma gondii* driven by a single recombinant chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:14872–14877.
- Khan A, Dubey JP, Su C, et al. Genetic analysis of clonal *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol*. 2011;41:645–655.
- Dubey JP, McKenzie SS, Liebmann L. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging elk in Mexico. *J Parasitol*. 2004;90:411–413.
- Cedillo-Pérez C. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* in swine in Mexico (determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en cerdos silvícolas en México [México]). Mexico City, Mexico: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.

18. Datta, JP, Sahmuganathan CK, Alvarez Espinal C, et al. Isolation of *Yersinia pestis* from animals in Durango, Mexico. *J Parasitol*. 2009;95:319–322.
19. Basso Monta Alvarado. Genomic characterization of *Yersinia pestis* in domestic cats (*Felis catus*) in different regions of Mexico (*Yersinia pestis* genótipo *Yersinia pestis* en gatos domésticos de las zonas de distribución mexicana de *Yersinia pestis*). México City, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecia Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
20. Alvarado-Espinal C, Rajadurai C, Ferrin L, et al. Prevalence of *Yersinia pestis* infection in wild birds in Durango, Mexico. *J Parasitol*. 2011;97:589–592.
21. Cobble Poldos C, Silva Torres CE, Rojas Carrizo CG, et al. Acute toxic pneumonia in squirrel monkeys (*Saimiri oerzoni*) in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;82:468–470.
22. Yela Ariza M, Caffero Solares I, Gutiérrez Castellón E, et al. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72:142–144.
23. Kozlowski JF. Standardization and validation of the laboratory of a PCR test for detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples. *Metodología y validación nivel de laboratorio de una prueba de PCR para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas* [thesis]. Mexico City, Mexico: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
24. Corfas-Borja M, Tan HK, Wallen M, et al. Treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. *PLoS Med*. 2010;7(4):e1000757.

ABSENCE OF GASTROINTESTINAL PATHOGENS IN ILEUM TISSUE RESECTED FOR NECROTIZING ENTEROCOLITIS

Tina Ullrich, MD,* Yi-Wen Tang, MD, PhD,††
 Herman Correa, MD,‡ Steven A. Gatzert, MD,§
 Akhil Maheshwari, MD,¶ Melissa Hill, RA,*
 Praveen Mathu, BS,* Mohan K. Krishna, PhD,§
 and Jörn Wendrich Weiskamp, MD*

Abstract: Necrotizing enterocolitis (NEC) is one of the most common gastrointestinal emergencies in premature infants and has been linked with viral antigens in as much as 50% of cases in single-center cohorts. We examined 28 ileum sections from surgically resected ileum from 27 premature infants with NEC from 2 separate institutions for 15 common bacterial, viral, and paramyxoviral pathogens using multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction amplification and suspension array detection methods. We did not detect infectious enteric pathogens in any of the NEC tissue and conclude that gastrointestinal pathogens are a rare cause of NEC.

Key Words: necrotizing enterocolitis, intestinal disease, reverse transcriptase polymerase chain reaction

Accepted for publication November 10, 2011.

From the *Department of Pediatrics, Monroe Carell Jr. Children's Hospital at Vanderbilt, Nashville, Tennessee; †Department of Medicine, Vanderbilt University, Nashville, TN; ‡Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University, Nashville, TN; §Department of Pathology, University of Illinois, Chicago, IL; and ¶Department of Pathology, University of Illinois, Chicago, IL.

Supported by the International Academy of Child Sciences and a grant of the German Academic Exchange Service (DAAD) (to T.U.), the Lucille Markey Student National Institute of Child Health and Human Development grant (R01HD051047) (to S.A.G.), R01HD059150 (to A.M.), a research grant from the CACA Jacks Family Foundation (to A.M.), and the Vanderbilt CTSA grant UL1 RR024972-01 from the National Center for Research Resources, National Institutes of Health (NIH).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH.

Address reprint requests to Tina Ullrich, Weiskamp, 2215 E. Garland Ave, 1122 MRB IV Light Hall, Nashville, TN 37232. E-mail: ullrich@vanderbilt.edu

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.pediatrics.com).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/INF.0b013e3182422546

Necrotizing enterocolitis (NEC) is a complex, multifactorial complication of prematurity characterized by an acute inflammatory cascade leading to bowel necrosis. It is the most common acquired gastrointestinal medical and surgical emergency in premature infants and occurs in 7% of infants less than 1500 g birth weight.^{1–3} Progress in prevention of the disease has been limited by the inclusion of heterogeneous intestinal diseases labeled as NEC.⁴ Although considered an infectious disease for a long time, no single pathogen has been identified consistently. Reports of NEC have linked this disease with a variety of intestinal pathogens, including *Clostridium difficile*,⁵ *Clostridium perfringens*,⁶ *Escherichia coli*,⁷ adenovirus,⁸ astrovirus,⁹ enterovirus,¹⁰ rotavirus,¹¹ and norovirus.¹² The number of reports of viral pathogens associated with NEC has tripled in the last 5 years, and it has been suggested that rotavirus may constitute as much as 50% and norovirus 40% of NEC cases in single-center cohorts.^{13,14} Recently, molecular methods have been developed for detection of viral RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) human tissues.¹⁵ We applied a multiplex polymerase chain reaction polymerase chain reaction (PCR) amplification and suspension array detection approach to evaluate 28 ileum tissue samples resected for NEC collected over a 5-year period for 15 common bacterial, fungal, and viral gastrointestinal pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Specimens. Fresh ileum tissue specimens from infants with NEC or non-NEC diagnoses were provided from the Pathology Departments of the Monroe Carell Jr. Children's Hospital at Vanderbilt and the Children's Hospital of University of Illinois under protocols approved by the respective Institutional Review Boards. All samples were deidentified and only demographic data pertinent to the study design (diagnosis and indication for tissue resection, age at time of tissue resection, gestational age, and sex) were collected from patient records by the pathologist prior to releasing the tissue. Parts of resected tissue were FFPE at the day of tissue collection. All NEC and non-NEC tissue samples were from the small intestine. Positive controls were a FFPE from a pediatric patient with *Clostridium* enteritis and a stool sample from a patient infected with norovirus.

Nucleic Acid Extraction. Approximately 25 mg of ileum tissue specimen was used for total nucleic acid extraction using a NucliSENS easyMAG automated sample preparation system (BioMérieux, Inc., Durham, NC). An off-board process, including a frozen tissue grinding or an FFPE tissue paraffin removing, was included prior to easyMAG extraction.¹⁶ All extracts were tested positive for human beta-actin DNA and RNA as a quality control approach.

Gastrointestinal Pathogen Detection and Identification. Detection and identification of 15 bacterial (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *C. difficile* toxin A/B, enterotoxigenic *E. coli* toxins, *E. coli* O157, Shiga-like toxin-producing *E. coli* str 1) str 2, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, protozoal (*Cytospora*, *Parasarcocystis histolytica*, *Cryptosporidium*), and viral (Adenovirus 40/41, Rotavirus A, Norovirus GI/GII) major



Contents lists available at ScienceDirect

Transactions of the Royal Society of
Tropical Medicine and Hygienejournal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>

Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico; analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys

Heriberto Caballero-Ortega^a, Felipe Javier Uribe-Salas^{b,c}, Carlos J. Cunde-Glez^b, Carlos Cedillo-Pelaez^a, José Antonio Vargas-Villavicencio^a, Héctor Luna-Pastén^a, Irma Cañedo-Solares^a, Luz Belinda Ortiz-Alegria^a, Dolores Correa^{d,e}^a Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, SSA, México DF., CP. 04530, México^b Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigaciones y Referencia Epidemiológica Integros, Cuernavaca, México, C.P. 62000, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2012

Received in revised form 7 August 2012

Accepted 7 August 2012

Available online 12 September 2012

Keywords:

Toxoplasma gondii

Human beings

Mexico

Seroprevalence

National Health Surveys

Epidemiology

ABSTRACT

Global warming has had serious implications on dispersion of infectious diseases like toxoplasmosis, since the frequency of *Toxoplasma gondii* largely depends on climatic conditions. We studied its prevalence by means of 2599 samples of the National Health Survey 2000 (NHS-2000) and 2511 of the National Health and Nutrition Survey 2006 (NHNS-2006) serum banks, obtained from 1–98 year old subjects of both genders and all states of Mexico. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies were determined by ELISA and confirmed by western blot. Crude, epidemiologically weighted and diagnosis-performance adjusted prevalence values were calculated. Seroprevalence changes were compared between both surveys and among regions (north, center and coast). Also, correlations between changes in temperature or humidity and those in prevalence were measured. National crude prevalence was 60.14 and 62.05 for NHS-2000 and NHNS-2006, respectively. Weighted and adjusted values were 62.5% and 40.0% for NHS-2000, and 63.7 and 43.1% for NHNS-2006. Coastal states and children presented the larger increases between surveys, while the center of the country showed a decrease. An apparently higher prevalence of *T. gondii* infection was observed in both surveys compared to that performed in 1987, while a geographical redistribution was found from 2000 to 2006, with a positive correlation between temperature and frequency deltas in 21 states where prevalence increased.

© 2012 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasmosis is a common parasitic disease caused by *Toxoplasma gondii*, a remarkably successful parasite found

in many species throughout the world. This infection has a significant impact from the public health perspective, mainly due to severe complications in immunosuppressed subjects and the risk of congenital infection, which can lead to abortion, spontaneous stillbirth or clinical manifestations such as severe neurological abnormalities and ocular lesions.^{1–4} Moreover, it is now known that *T. gondii* may cause behavioral and psychiatric disorders.⁵

Toxoplasmosis is a health concern worldwide; in 2000 it was estimated that one third of the human population might be parasitized, but its prevalence varies from 12 to 90% in different parts of the world.^{3,6,7} Although urbanization, alimentary habits and serological techniques

^{*} Corresponding author. Present address: Torre de Investigación, 2^o plant. NP. Av. Investigadores Sur 3700-C Col. Investigadores, Cuernavaca, CP 62000, México DF., México. Tel.: +52 (55) 3147 0910x1071/1080. E-mail address: uribe@saludpublica.mx (D. Correa).

[†] Present address: El Colegio de la Frontera Norte, Calle Progreso y Hérostrato No. 503, Lata. Buenavista, Tijuana, Baja California, C.P. 22300, México.

employed may explain some differences, environmental conditions play a major role. Sporulation and survival of *T. gondii* oocysts are favored in warm-humid climates, like coastal zones of warm regions, where young children are more often infected, due to higher exposure to the environmental forms, the oocysts.^{41–43} In this regard, it has been suggested that climate change could increase the frequency of several infectious diseases, including toxoplasmosis worldwide.^{44,45}

Mexico is a country with heterogeneous socio-demographical and geographical conditions, and a high ratio of internal and external migration. In 1987 the first National Seroprevalentological Survey was carried out to study different diseases, including toxoplasmosis. Using immunofluorescence for IgG antibodies as a screening test, a nationwide prevalence of 19.5% and 32.0% was found using 1:120 and 1:16 serum titer cut off points, respectively. Higher frequency was found in humid/warm than in dry or cold places. Infection was not related to gender, and the prevalence in children was higher in the coastal zones. Furthermore, in the urban population toxoplasmosis was relatively high, which confirmed the relevance of the domestic cat in *T. gondii* transmission.¹⁷

Since the late 1980s, dramatic demographic changes have occurred in Mexico as in many parts of the world, including alimentary habits, access to health services, urbanization, and migration within and outside the country. Also, climatic changes have occurred, especially regarding humidity and temperature.¹⁸ Since *T. gondii* transmission largely depends on these aspects, we decided to make use of two subsequent nationwide serological surveys conducted in 2000 and 2005 in Mexico to study the prevalence of human toxoplasmosis, including its geographical distribution and variations due to age or gender.^{19,20}

2. Materials and methods

2.1. Study design

The work was performed using serum samples and data from the National Health Survey 2000 (NHS-2000) and the National Health and Nutrition Survey 2005 (NINS-2005). Briefly, NHS-2000 was a probabilistic household-based survey, which included users of health services. Information was gathered through direct interviews with adult informants.¹⁹ The serone was designed to determine the nutritional status of the Mexican population, based on national probabilistic survey of rural and urban strata in different regions of the country.²¹ Unfortunately, the serum bank from the 1987 National sero survey (NSS-1987) designed to analyse various diseases detectable in serum, was no longer available when we performed this study. Thus, we used data taken from the study by Velasco-Castro et al. for comparison.¹⁷ All three surveys were coordinated by the Mexican Ministry of Health with designs based on polystage (primary [state/municipality] secondary [household] and tertiary [individuals]) units, stratified (metropolitan and/or urban vs rural) and household sampling. The detailed information on survey designs and overall results have been specifically published.^{19–21}

The sample size of NHS-2000 was calculated to estimate a theoretical proportion of 5% or higher, regarding any health event, 10% relative precision, 95% confidence level, 50% lack of response and design effect of 3, obtaining a sample size of 47 040 households.¹⁹ In each selected household, one child (0–9 years old), one adolescent (10–19 years old) and one adult (over 19 years old) were selected by randomization. The final sample size was useful to make estimations at national and state level including all 32 which constitute Mexico. The 90 916 persons selected from the sample frame (24 184 [26.6%] children, 21 365 [23.5%] adolescents, 45 376 [49.8%] adults) were interviewed at home and gave a blood sample, to estimate the seroprevalence of *T. gondii*, we calculated a sample size of 3585 taking a theoretical seroprevalence of 30%, 95% confidence level and specific relative precision of 5%.^{19,22,23} A random selection was carried out and then selected serum samples were weighted taking into account the sampling structure of NHS-2000. Finally, we studied 3599 samples from NHS-2000.

NINS-2006 sample size was calculated to estimate a theoretical proportion of 8.1%, relative precision of 25%, confidence level of 95%, lack of response 20% and design effect of 1.7, obtaining a sample size of 46 800 households.²⁰ In each selected household, one child (0–9 years old), one adolescent (10–19 years old) and one adult (over 19 years old) were selected by randomization. The final sample size was also useful to make estimations at national and state levels. To estimate of *T. gondii* seroprevalence we calculated a sample size of 3653 observations, also taking a nationwide seroprevalence of 30%, 95% confidence level and specific relative precision of 5%. A random selection was carried out and selected serum samples were weighted taking into account the sampling structure of NINS-2006. Finally, we selected 3624 samples but we could only find 2916 samples in the NINS-2006 serum bank established at the National Institute of Public Health. This number was sufficient, given the prevalence found (from 40% to 62%; see below in the Results section).

2.2. Serologic assays

Anti-*T. gondii* IgG antibodies were searched by ELISA and Western blot according to previously reported methods.^{24,25} Methods were previously standardized and validated for the Mexican population of all regions of the country, three age groups and both genders, basically by contrasting them to a reference standard built up with results of three techniques (H. Caballero-Ortega et al., 2012, submitted). Sensitivity values of 98.4% and 87.8% and specificities of 66.4% and 94.0% were obtained for ELISA and Western blot, respectively. From this validation the fixed part of the cutoff point, i.e., three SDs of the absorbance from normally distributed negative samples was also obtained.

For ELISA, polystyrene plates (Maxisorb, Nunc, Roskilde, Denmark) were incubated with 2 µg/ml of the RH strain crude extract of *T. gondii* dissolved in 15 mM carbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C. Non-specific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin in PBS-0.05% tween 20 (PBS-T). Plates were washed five times

with PBS-T using an automated RIO 8500 (Hercules, CA, USA 1575 ImmunoWash machine). The human samples were diluted 1:500 and developed with a goat anti-human IgG-peroxidase conjugate diluted 1:5000 (Sigma Aldrich Corp., St Louis, MO, USA, product A8419). The reaction was developed with O-phenylenediamine- H_2O_2 citrate buffer solution. Absorbance was measured at 490 nm on a Turner Biosystems 9300-010 micro-ELISA autoreader using the Modulus™ Microplate Reader. Cut off was set as the mean of one low, one medium and one high negative control in duplicate included in each plate plus the constant value obtained from validation (H. Caballero-Cruz et al., 2012 submitted). The absorbance value of each serum was divided by the cut-off point to establish the reactivity index (RI). Serum samples with RI > 1.1 were considered positive. Those having a RI 0.8 to 1.09 were tested by Western blot to confirm results.

Western blot was carried out according to a method reported by others,²⁴ in brief, 10^7 parasite/gel were electrophoresed under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes. Strips were cut and each strip was incubated with individual serum diluted 1:200 and then with anti-human IgG-peroxidase conjugate 1:2500 and the standard 4-chloro-1-naphthol- H_2O_2 chromogenic substrate solution for reaction development. Reaction was stopped by washing with distilled water.

2.3. Data analysis and statistics

The crude prevalence values obtained for the NIS-2000 and NINS-2006 were weighted by multiplying the survey's expansion factor (i.e., the quantity of individuals from the population that is represented by one person selected from a sample) and the probability of being included in the subsample, taking into account the non-response rate and the differential response by gender and age, as it was done for sample size calculation. Since the sensitivity and specificity of the ELISA used are known, all frequency values were adjusted from the weighted prevalence, using the Rogan-Gladen estimator (P_{RG}):²⁵

$$P_{RG} = \frac{AP \cdot Sp + 1}{Se + Sp + 1}$$

where: AP=Apparent prevalence; Sp=Specificity; Se=Sensitivity.

Temperature and precipitation data for Mexico were obtained from the National Meteorological Service and the National Water Commission.⁶ Prevalence deltas per state were compared between 2000 and 2006, and were related to changes in precipitation or temperature between 1999 and 2006, considering one year sufficient to affect *T. gondii* transmission.

State-level analysis was performed using SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Toxoplasmosis frequencies were compared among regions, age groups and genders using χ^2 as statistical test.²³ Changes (deltas) in prevalence were estimated by subtracting the crude values reported by Velasco-Castrejón et al., from those of 2000, adjusted to minimize differences.¹⁷ Deltas were also obtained comparing crude, weighted and adjusted prevalence values between 2000 and 2006. The delta distributions of the

central, coastal and northern regions were statistically compared by Kruskal-Wallis, followed by Mann-Whitney-U test. Correlations between changes in temperature or precipitation and of prevalence values were assessed by linear regression (r , 95% CI). A $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Crude prevalence was 60.1% (95% CI 58.5–61.7%) for NIS-2000 and 62.6% (95% CI 60.3–63.9%) for NINS-2006 ($p=0.057$). The weighted and adjusted prevalence values were 62.5% (95% CI 58.7–65.2%) and 40.0% (95% CI 38.4–41.6) for NIS-2000, and 63.7 (95% CI 60.4–67.1%) and 43.1% (95% CI 41.3–44.9) for NINS-2006. Thus, a slight increase in national prevalence of toxoplasmosis seemed to occur between 2000 and 2006. Geographical distribution changed more evidently: it increased in all coastal and most northern states (7 out of 10), while it decreased in 8 out of 10 central states (Figures 1 and 2). A decrease in humidity occurred between 2000 and 2006 in most states, but no global correlation with toxoplasmosis frequency was found ($r < 0.01$).

A change in age related frequency was observed, with a significant increase among children in 2006 as compared to 2000 (Table 1). This was exclusively observed in the northern and coastal regions, with no significant variation in the center of the country. Toxoplasmosis frequency decreased in the center between 2000 and 2006, regardless of age, although the delta was significant in adolescents and adults only (Figure 2 and Table 1). The opposite was observed for the coastal and northern zones, with statistical significance for all age groups in the former, and in children in the north ($p=0.026$). No difference between genders was found.

Changes in temperature and precipitation between the end of the 1990s and 2006 were heterogeneous among states, with a global change of $+0.6 \pm 1.2^\circ C$ (range: -4.3 to 2.9°C) and -13.6 ± 206.2 mm (range: 390 to 647 mm) respectively. No positive or negative relation was found between the two climatic aspects, neither between precipitation nor prevalence delta, but a significant positive correlation was observed between temperature and prevalence in the 21 states where the latter increased ($r=0.408$, $p=0.020$; Figure 3).

4. Discussion

Toxoplasma gondii causes one of the commonest zoonoses worldwide. This is due to its lack of host-species specificity and its multiple transmission mechanisms: herbivores are infected by consumption of pastures or water contaminated with oocysts, while carnivores may acquire toxoplasmosis by raw meat (or contaminated water) ingestion. Omnivores – like human beings – are exposed to all these risk factors; besides, they might have domestic cats in their houses, which may release oocysts if they are fed with raw meat or are allowed to hunt.²⁷ The prevalence in a certain region largely depends on the main transmission mechanism. In places where raw or undercooked meat is the main risk, prevalence is usually low and exposure starts relatively late in life (i.e., when people start eating

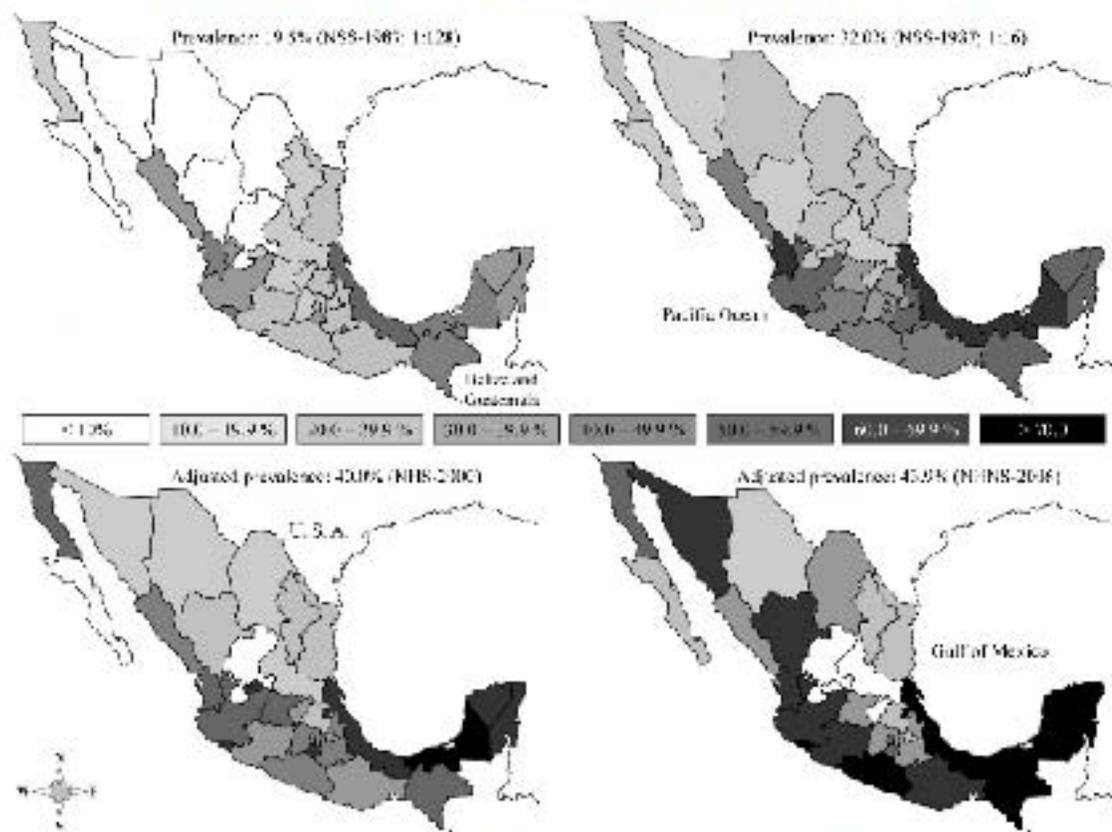


Figure 1. Maps of Mexico showing prevalence ranges per state of anti-*Tyrophium gondii* antibodies in the National Seroprevalence Survey of 1987 (NISS-1987) using 1:120 and 1:6 serum dilutions (in cities in U.S.A.), the National Health Survey 2000 (NHNS-2000) and the National Health and Nutrition Survey 2006 (NHNS-2006). Maps of the NISS-1987 were built up from data provided in article by Velasco-Castillo et al.¹⁷ and thus they are crude. For the NHNS-2000 and NHNS-2006 prevalence values were adjusted taking into account the sensitivity and specificity of the ELISA employed. Prevalence ranges are specified by different shades of grey.

meat). Conversely, environmental contamination with oocysts is normally associated with high prevalence and early exposure in life, since children sometimes play with soil and drinking water may be contaminated.^{12–14,27,28} As mentioned before, the climatic change is of major concern because of possible reemergence of infectious diseases, among them vector borne and environmentally related parasitoses, like *T. gondii* infection.^{19,29,30} Making use of serum banks gathered in two nationwide surveys in 2000 and 2006, and comparing them with the one performed in 1987, we were able to determine if there was a change in global prevalence, as well as in age- and geographical-related distribution of *T. gondii* in Mexico. We found evidence that it was so. Prevalence in 1954–1982 estimated using the dye test, and in 1987 using immunofluorescence, was 30% and up to 32%, respectively.^{17,21} In the present study, higher crude and weighted values were obtained in 2000 and 2006 (50.1 and 62.6%). This could be due to different sensitivities or specificities of the immunoassays employed, but even comparing the prevalence calculated using the 1:64 1:16 dilution cut off in 1987 with that estimated using adjusted ELISA results of 2000, an increase

at least of 8% is suggested. Thus, it seems there was an increase in *T. gondii* transmission and it might be partially due to climatic changes. Global increases in temperature of 0.4 °C and 0.6 °C occurred between 1987 and 2001, and between 2000 and 2005 in Mexico, respectively; the corresponding increases in global *T. gondii* infection prevalence (8 and 3%) could be partially due to weather change.¹⁸

It has to be emphasized that the 1987, 2000 and 2006 national surveys in Mexico had national and state level representation.^{10–21} There are elements that could have caused some bias in NISS-1987 and in NHNS-2006. In the former, age group distribution among individuals that provided blood samples had an over-representation of men for age ranges 1–4, 5–9 and 10–14 years, and under-representation among groups from 20 to 64.¹⁷ Unfortunately, the authors of that work did not mention the control of non-response rate or the use of an expansion factor in the analysis of their results. Nevertheless, *T. gondii* infection frequency has not been associated to gender, and this was corroborated for NHNS-2000 and NHNS-2006. Regarding NHNS-2006 we found that 24.1% of serum samples selected were empty. Further analysis of

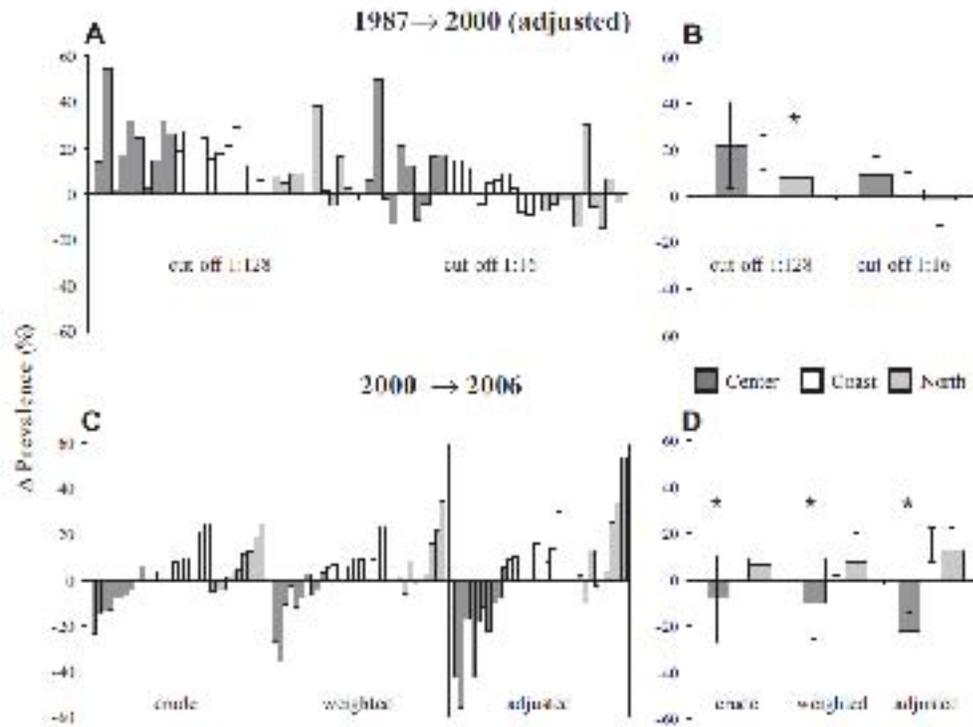


Figure 2. Prevalence deltas from 1987 to 2000 and from 2000 to 2006 for each state (A and C) and for the three regions (B and D). In A and B two cut-off points reported by Velasco-Castro et al.¹⁷ were compared to adjusted prevalence in 2000. In C and D the crude, weighted and adjusted prevalence values were used. Asterisks mark statistically different deltas of the median ($p < 0.04$) and mean ($p < 0.005$) values in the 1987–2000 and 2000–2006 comparisons, respectively.

results showed that samples were especially scarce in the 0–9 years old group. Nevertheless, sample size calculation for both surveys was estimated considering 80% prevalence, and the lowest found was 40% for which a sample of

2005 was necessary, i.e., below those individuals analyzed in each survey. Thus, bias could have minimal effect on results. This is further suggested by the fact that the prevalence increase observed in the coastal and northern zones between 2000 and 2006 was similar for all age groups.

The variation in age-related distribution of *T. gondii* infection with significant increase in children supports the effect of weather at national and regional levels. Most of those states flanked by the mountain ranges Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental and Sierra Madre del Sur (the plateau region) presented a prevalence decrease between 2000 and 2006, independently of temperature or precipitation modifications. In the other regions (21 States) the prevalence augmented with a significant relation to temperature change. It is believed that climate has changed and reliable models predict even more increases in mean global temperature. Global warming is threatening the health of humans and animals, partly because infectious diseases disperse through water, food or vectors. Among those which are disseminating more widely are cholera and other diarrheas, malaria, dengue, yellow fever and other encephalitic viruses.^{15,24,26} It has been postulated that the environmental changes observed during the last years might favor *T. gondii* dissemination in north-western Europe along with anthropogenic factors, like migration or feeding habit changes.¹⁶

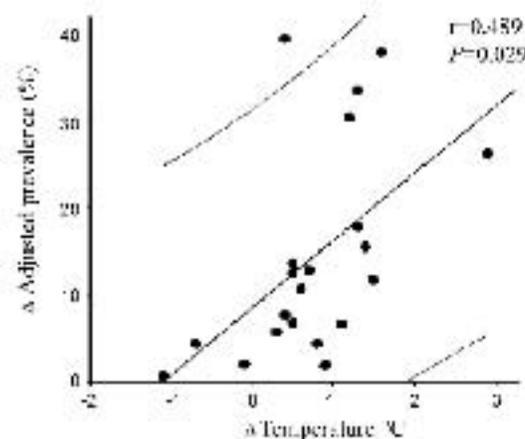


Figure 3. Correlation between temperature and toxoplasmosis prevalence in the 2000–2006 in the 21 states where an increase in prevalence was observed.

Table 1
Adjusted seroprevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys according to region and age.

Age	2000			2006		
	Number N=80,000	Overall n (%)	Total n (%)	Number N=80,000	Overall n (%)	Total n (%)
Children <10 y	168,741 (21.6)	4,201 (2.49)	361,240 (20.0)	124,255 (15.8)	1,182,205 (26.0) ^a	1,425,740 (33.8) ^a
Adolescents 10–19 y	227,165 (28.7)	112,496 (49.5)	757,265 (41.1)	182,715 (23.5) ^b	2,047,153 (26.0)	1,967,317 (44.9)
Adults 20–59 y	277,194 (35.0) ^c	357,476 (73.2) ^c	854,302 (51.8)	214,761 (26.2) ^d	1,743,322 (30.5)	2,117,244 (53.4)
>60 y	66,712 (8.4)	92,183 (138.2) ^e	2,150,820 (100)	408,251 (61.2) ^f	2,048,818 (32.0) ^g	1,811,219 (42.1)

Adjusted prevalence was calculated considering 95% sensitivity and specificity of the ELISA test. Labels in columns and rows are: ^a $p < 0.001$; ^b $p = 0.002$; ^c $p = 0.0001$; ^d $p = 0.0001$; ^e $p = 0.0004$; ^f $p = 0.0001$; ^g $p = 0.0004$.

Toxoplasmosis is an unrecognized health problem in several parts of the world, because its frequency is largely unknown and is thought to cause no problems to immunocompetent hosts. Nevertheless, it is distributed worldwide, it can provoke behavioral and psychiatric disorders in ‘‘asymptomatic’’ adults and is an important zoonotic and pediatric issue.^{1,6,9–12} The Ministry of Health of Mexico has made an effort to analyze the global health status of the Mexican population several times by making nationwide seroepidemiological surveys.^{19–21} We used the surveys to analyze the changes in *T. gondii* prevalence in the last three decades, and conclude that it increased between the late 1980s and 2000; also, its distribution changed in a relatively short period between 2000 and 2006, polarizing the nation in hyperendemic (coastal) and hypoendemic (central) zones. This information should be taken into account for implementation of toxoplasmosis control programs.

Authors' contributions: HCO, HJS, CJC and DC designed the study protocol; CTY carried out the random selection of serum samples; CCF, JAVV, ELP, ICS and LBOA were involved in performing ELISA and Western blot experiments. All authors worked on analysis and interpretation of the data. HCO drafted the manuscript, and all authors read and approved the final manuscript. DC is guarantor of the paper.

Acknowledgements: We thank Ana Herrer for critical review of the manuscript and Rafael López-Rebosello for his excellent technical assistance.

Funding: This work was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT, grant number 86490).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: This study was approved by the Research and Ethics Committees of the National Institute of Pediatrics of the Ministry of Health (Registration number 025/2000).

References

- Dubey JP, von Jan L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 2008;38:1257–73.
- Murphy JE, Hienfeldt J. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1055–58.
- World Health Organization. Toxoplasma gondii: priorities for further research and development. *Wkly Epidemiol Rec* 2001;26(17):1–11.
- Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd ed. Baltimore, Maryland: CRC Press; 2010.
- Hegi J. Effects of Toxoplasma on human behavior. *Schizophr Bull* 2007;33:757–60.
- Tenter AM, Heckmann M, Weiss LM. Toxoplasma gondii: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30:217–32.
- Hill DE, Charakandath S, Dubey JP. Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals. *Anim Health Res Rev* 2002;6:41–51.
- Dubey JP, Hienfeldt JF. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989.
- John PA, Sjogren U, Sjogren E, Sjogren H, Melby KK, Bodd A, Berg J. Incidence of Toxoplasma gondii-specific immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. *Appl Immunol* 1993;17:101–6.

10. Jensen PK, Aagaay-Belassen H, Melby KK, et al. Incidence of toxoplasma gondii infection in 35,840 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol* 1998;36:7403–6.
11. Eard L, Azeiteiro T, Goulet V, Thulliez P, Tardif-Flouy V, Caille E. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis* 1996;31:378–83.
12. Eppner H, Strauss H, Lopez ML. Toxoplasmosis seropositivity, clinical status, and Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:1305–9.
13. Chavín-Bonilla I, Sánchez-Estevé Y, Manríquez J, Estevé J. Seroprevalence of toxoplasmosis in amerindians from Western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:131–3.
14. Chavín Bonilla I, Sánchez-Estevé Y, Estevé J, Larreal Y, Molero E. Prevalence of human toxoplasmosis in San Carlos Island, Venezuela. *Int J Parasitol* 2011;41:497–502.
15. Kilpatrick AA, Nathaniel MD. Clinical warning and infectious disease. *Arch Med Res* 2010;41:648–50.
16. Meerburg BG, Kijstra A. Changing climate changing pathogens: Toxoplasma gondii in North Western Europe. *Parasitol* 2002;105:17–24.
17. Velasco-Castellón O, Salcedo IB, Valdespin E, et al. Toxoplasmosis: seroprevalence in Mexico [in Spanish]. *Salud Pública Mex* 1997;39:222–6.
18. Sistema Métricolegal Nacional. Comisión Nacional del Sistema Métricolegal and geodesia in Mexico. Item 20.0 to 20.6. <http://www.cna.gob.mx> [accessed 21 July 2011].
19. Sepúlveda J, Tapia-Coyne R, Velásquez O, et al. Design and methodology of the 2000 National Health Survey [in Spanish]. *Salud Pública Mex* 2007;49:427–32.
20. The Institute of Medicine. *U.S. Report on the Status of the American National Health and Nutrition Survey 2006*. http://www.nationalacademies.org/handbook/06/01/0603_01.
21. Tapia-Coyne R, Gutiérrez D, Sepúlveda J. Methodology of the National Seroprevalence Survey [in Spanish]. *Salud Pública Mex* 2007;39:124–32.
22. Swings RK, Torres-Hou S. Sample size determination in health studies: a practical manual for nurses. *World Health Organization*; 1991.
23. Lee L, Borczyk R, Larrea R. *Asociación Compleja Seroprevalencia Clínica*. IAP. Sage Publications; 1999.
24. Inoue T, Gargano J, Timmeron E, Lente S, et al. Intra-Camel performance of detection of IgG antibody to composite mother and newborn anti-Toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Int J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:648–54.
25. Ortiz-Alegria IB. Validation of laboratory tests for detection of anti-Toxoplasma IgG and IgM antibodies in pregnant women. *Revista de Invest. Médica Autónoma Universidad Nacional Autónoma de México* 2004.
26. Ingm M, Gilver B. Serotyping protozoa from the results of a screening test. *Am J Epidemiol* 1978;107:91–6.
27. Jubey JF. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Ver Parasitol* 2001;126:17–22.
28. Echía Oliveira IM, Jones JL, Azevedo Silva J, et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2005;9:55–62.
29. Taylor TH, Bond-John ST. The global spread of malaria in a human warmer world. *Avian* 2001;282:101–5.
30. Giese R, No V, Ismail D. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. *GMH* 2008;178:713–22.
31. Koch E, Varela C. Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en México. Resultados de 25,883 reacciones de Sabin y Fildman efectuadas en 1973 a 1983. *Salud Pública Mex* 1986;28:51–8.