



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“ESTUDIO SOBRE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EN BORREGOS CRIADOS EN SEMICAUTIVERIO DE UNA REGIÓN HIPERENDÉMICA EN LA COSTA DEL PACÍFICO MEXICANO”

TESIS

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

PRESENTA:
WILLIAMS ARONY MARTINEZ FLORES

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MA. DOLORES CORREA BELTRÁN
FACULTAD DE MEDICINA
DR. PABLO VINUESA FLEISHMAN
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Catalina y Cecilia.

No existen palabras para describir el amor o la gratitud hacia ustedes.

Agradezco el apoyo incondicional de mi esposa Cecilia Zampedri durante el tiempo que llevó concluir este trabajo, y por permitirme emprender el camino como padre.

A mis padres, Ma. De Angeles Flores y Aurelio Martínez por apoyarme todo el tiempo y enseñarme que el esfuerzo y la perseverancia son la base del éxito. A mi hermano y amigo Andrés Martínez por compartir momentos inigualables. A mis sobrinos Romi y Andresito. A mi nueva familia, Aurora Gómez, Pedro Eugenio Zampedri, Liliana Zampedri, Juan I. Zampedri y Francisco Zampedri por apoyarme en distintos aspectos durante estos últimos años.

A Tete y Pape por mostrarme lo que significa el amor de abuelos y a mis tíos, Chela, Tita, Güero, Memo, Rita y Pepe por todo su cariño.

A mis amigos Jeronimo Uruñuela, Salvador Solis, Gerardo Covarrubias y Gala Castro.

ÍNDICE

1. AGRADECIMIENTOS.....	1
2. RESUMEN.....	4
3. ABSTRACT.....	5
4. INTRODUCCIÓN.....	6
4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA TOXOPLASMOSIS.....	6
4.2. ULTRAESTRUCTURA DE LOS ESTADIOS UNICELULARES DE <i>Toxoplasma gondii</i>	7
4.2.1. CARACTERÍSTICAS COMPARTIDAS.....	8
4.2.2. DIFERENCIAS ULTRAESTRUCTURALES.....	10
4.2.3. QUISTES TISULARES.....	10
4.2.4. OOQUISTES.....	11
4.3. CICLO DE VIDA.....	13
4.3.1. HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS.....	15
4.3.2. HOSPEDEROS DEFINITIVOS.....	15
4.3.3. MEDIO EXTERNO.....	17
4.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.....	18
4.5. PATOGENIA.....	20
4.5.1. CICLO LÍTICO.....	20
4.5.2. INFECCIÓN POR <i>T. gondii</i>	21
4.6. DIAGNÓSTICO Y AISLAMIENTO DE <i>T. gondii</i>	24
4.6.1. DIAGNÓSTICO MEDIANTE SEROLOGÍA.....	25
4.6.2. DIAGNÓSTICO POR PCR.....	26
4.6.3. AISLAMIENTO EN RATÓN.....	26
4.7. TIPIFICACIÓN DE CEPAS Y AISLADOS DE <i>T. gondii</i>	28
4.8. FILOGEOGRAFÍA DE <i>T. gondii</i>	30
5. ANTECEDENTES.....	35
5.1. SEROEPIDEMIOLOGÍA DE LA TOXOPLASMOSIS EN MÉXICO.....	35
5.2. TIPIFICACIÓN DE AISLADOS Y CEPAS MEXICANAS DE <i>T. gondii</i>	39
5.3. BIOGEOGRAFÍA DE MÉXICO.....	41

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	43
7. HIPÓTESIS.....	46
8. OBJETIVOS.....	47
8.1. OBJETIVO GENERAL.....	47
8.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	47
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
9.1. MUESTREO.....	48
9.2. CONCENTRACIÓN DE QUISTES TISULARES.....	48
9.3. ANÁLISIS MOLECULARES.....	49
9.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA.....	49
9.3.2. INICIADORES	40
9.3.3. ENSAYOS DE PCR Y SECUENCIACIÓN.....	52
9.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	53
9.4.1. EVALUACIÓN DE CROMATOGRAMAS.....	53
9.4.2. BÚSQUEDAS EN BASES DE DATOS PÚBLICAS Y ALINEAMIENTOS.....	53
9.4.3. RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA.....	53
9.4.4. ÁRBOL DE REDES E ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA.....	54
10. RESULTADOS.....	55
10.1. MUESTRAS OBTENIDAS.....	55
10.2. ESTANDARIZACIÓN DE PCR.....	58
10.3. EVALUACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS.....	61
10.4. SITIOS VARIABLES.....	63
10.5. ÁRBOL DE REDES.....	65
10.6. RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA.....	66
10.7. ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA.....	69
11. DISCUSIÓN.....	70
12. CONCLUSIONES.....	77
13. REFERENCIAS.....	78
14. ANEXOS.....	107
ANEXO 1.....	107

ANEXO 2.....	108
ANEXO 3.....	109
15. ARTÍCULO.....	110

1. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, bajo la dirección del Dr. Pablo Maravilla Campillo, a quien agradezco profundamente por permitirme permanecer y formarme como científico en su laboratorio. Agradezco también el apoyo personal y el aliento moral que me ha brindado durante distintas etapas a lo largo de 10 años de conocerlo. Finalmente quiero puntualizar algunas de las características que desde mi perspectiva definen al Dr. Pablo Maravilla como un excelente tutor: ética intachable tanto en lo moral como en lo científico, una gran humanidad con quienes lo rodean, y apoyo constante en la búsqueda del conocimiento. Le dedico este trabajo, y espero que durante mi carrera profesional pueda reflejar estas características que admiro de usted.

Este trabajo es el resultado de una colaboración entre el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”; el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría; y el Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Colima.

Agradezco a los miembros del comité tutor: la Dra. Dolores Correa Beltrán del Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría y el Dr. Pablo Vinuesa Fleishman del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su comprometido apoyo, acertadas sugerencias y asesoramiento científico durante la realización de este proyecto.

Agradezco al Dr. Fernando Martínez Hernández del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por su constante apoyo moral y asesoramiento científico durante el doctorado, aspecto que permite considerarlo como un miembro más del comité tutor de este trabajo. Sin lugar a dudas, ha sido un personaje trascendental durante toda mi formación como científico.

Agradezco también el apoyo intelectual y asesoramiento científico del M. en C. Heriberto Caballero Ortega y del Q.F.B. Eduardo López Escamilla, quienes fueron miembros clave en la colaboración para realizar este proyecto.

Agradezco el compromiso del Dr. José Manuel Palma García y de la M. en C. Alejandra del Viento Camacho durante el muestreo de este proyecto, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

Williams Arony Martínez Flores agradece al “Programa de doctorado en Ciencias Biomédicas”, así como también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por las becas otorgadas durante la realización de sus estudios de Doctorado, Números de registro 245622 y 22961 (CB-2011/168619).

Este trabajo fue apoyado por el INP a través del donativo 013/2012 y por el CONACyT mediante el donativo CB-2011/168619.

Se extiende un especial reconocimiento a la Dra. Mirza Romero Valdovinos y la Dra. Angélica Olivo Díaz por su apoyo intelectual y científico no solo en la realización de este proyecto, sino durante todo mi proceso formativo en investigación.

Se reconoce también a la Dra. Guiedhani Villalobos Castillejos y la Dra. María Cecilia Zampedri por su apoyo intelectual y sus críticas constructivas al proyecto.

Agradezco a los miembros del jurado, Dra. Ana Flisser Steinbruch (presidenta) , Dr. Pablo Maravilla Campillo (secretario), Dr José Martín García Varela (vocal), Dr. Rafael Saavedra Durán (vocal) y Dra. Ana Elena Escalante Hernández (vocal), por sus valiosos comentarios durante la evaluación final del trabajo.

Agradezco al personal del servicio de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM, M. en C. Laura Margarita Márquez Valderrama. También agradezco al personal administrativo de la Facultad de Medicina, del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, de la Coordinación de Estudios de Posgrado y del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”: Evangelina Vargas, Zenaida Martínez Estrella, Marisol Villafañez González, Angélica Téllez Garmendia, Lizeth González Cruz, y Luz María Méndez Reyes.

Finalmente, agradezco a los colegas del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos y del Laboratorio de Inmunología Experimental por sus aportaciones al proyecto.

2. RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito cosmopolita intracelular obligado que infecta a vertebrados de sangre caliente. Su ciclo de vida presenta una fase sexual en el hospedero definitivo y la asexual en los hospederos intermediarios. Existe una sola especie en el género *Toxoplasma* pero posee una amplia diversidad genética. En México, existen estudios que sugieren que las poblaciones de *T. gondii* son genéticamente heterogéneas en las distintas regiones geográficas del país. El objetivo de este estudio fue describir la diversidad genética y distribución filogeográfica de *T. gondii* en una región costera del Pacífico Mexicano, en la que se han reportado fenómenos biológicos relevantes para la toxoplasmosis. La tipificación se realizó por secuenciación de un fragmento del gen *B1* de *T. gondii*, en muestras de 305 borregos de 27 localidades distintas. Se obtuvieron secuencias en las muestras de 23 borregos distintos, los electroferogramas de 20 muestras presentaron perfiles claros en la secuencia, mientras que en las tres muestras restantes los perfiles sugerían la existencia de coinfecciones, por lo que se generaron dos secuencias (A y B) de cada muestra. La comparación de las secuencias revelaron la existencia de 13 haplotipos (Hap): los Hap1 al 5 agruparon a las cepas de referencia mientras que los restantes fueron exclusivos de borregos. El Hap1 fue el más frecuente con 13 secuencias, seguido del Hap6 con cuatro. Los análisis filogenéticos revelaron que los Hap6 al 12 mostraron una estrecha relación con el Hap1 que agrupó a las secuencias de las cepas virulentas RH, CtCo5 y FOU. Nuestros resultados sugieren que en la región geográfica analizada, existen cepas similares a las de otras regiones en el mundo así como cepas autóctonas. Concluimos que el gen *B1* representa una herramienta poderosa en la identificación de cepas frecuentes y/o virulentas en zonas geográficas o poblaciones de hospederos no analizadas con anterioridad.

3. ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a ubiquitous protozoan with obligate intracellular parasitism that infects warm-blood vertebrates. Its life cycle consists in a sexual phase in the definitive host and an asexual phase in the intermediate hosts. There is a single species in the genus *Toxoplasma*, but possess a wide genetic diversity, which is higher in the tropics. Studies in Mexico, suggests that the *T. gondii* populations are genetically heterogeneous among distinct geographic regions in the country, which might be favored by certain factors namely ecological and epidemiological in the country. The goal of present study was to describe the genetic diversity and phylogeographic distribution of *T. gondii* in a Pacific coastal region of Mexico, in which has been described biological phenomena relevant to the infection. Sequencing of a *B1* gen region was used to typify *T. gondii* in tissue samples from 305 sheep from 27 localities. Sequences were obtained from 23 different samples, chromatograms from 20 samples showed no conflict in the called nucleotide bases, while three samples showed conflict in specific nucleotide positions, thus each one was separated in two different versions (A and B). Sequence analysis including those available in public nucleotide collections, revealed 13 haplotypes (Hap): Hap1 to 5 clustered reference strains while Hap6 to 13 were exclusive in sequences from present study. Among sequences obtained, Hap1 was the most prevalent with 13 sequences, following Hap6 with four sequences. Analysis revealed that Hap6 to 12 were phylogenetically related to Hap1, that clustered RH, CtCO5 and FOU virulent strains. Results from present study suggests that in the Pacific coastal region of Mexico, there are strains reported for other regions in the world as well as autochthonous strains. We conclude that *B1* gen is a powerful first approach that can identify prevalent and virulent strains in new sampled host populations and geographic regions.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA TOXOPLASMOSIS

A inicios del siglo XX, diversos cambios políticos, sociales, científicos y tecnológicos permitieron que una gran cantidad de científicos de Europa y EEUU, viajaran a regiones colonizadas o de interés económico a realizar investigaciones de enfermedades infecciosas endémicas (Morrissette and Ajioka 2009). En este contexto, durante sus investigaciones en el Instituto Pasteur de Túnez, Charles Nicolle y Louis Herbert Manceux (Nicolle and Manceux 2009), describieron en 1908 una nueva infección por protozoarios que afectaba a los gundis (*Ctenodactylus gundi*), roedores del norte de África (Nicolle and Manceux 2009). El mismo año, de manera independiente en Brasil, Alfonso Splendore reportó también una infección por protozoarios en los conejos de su laboratorio, observando similitudes con la enfermedad del Kala-Azar¹ (Splendore 2009). Estas observaciones (Nicolle and Manceux 2009; Splendore 2009) llevaron a definir el nombre que conserva hasta la actualidad: *Toxoplasma gondii*, del griego Toxon (arco), plasma (que es moldeado) y gondii (referente a la especie de roedores *C. gundi* en donde fue observado por primera vez) (Nicolle and Manceux 2009; Nicolle and Manceaux 1909).

A pesar de haber sido descrito a inicios del siglo XX, no fue sino hasta los primeros reportes confirmados de toxoplasmosis en humanos, que el interés científico sobre este protozoario incrementó considerablemente. Para entender la importancia de este hecho, es necesaria una breve descripción del mismo y los acontecimientos previos. En 1937, tras análisis post-mortem de una niña de un mes de edad, Wolf y Cowen observaron protozoarios en tejidos con lesiones, identificándolos en ese momento como parásitos del género *Encephalitozoon*; y comprobando posteriormente la relación del parásito con lesiones similares en los ratones

1 Kala Azar.- Nombre con el que se le conoce a la leishmaniasis visceral. Del hindustaní (dialecto del norte de la India) Kala – Negra y Azar – Fiebre.

usados para los aislamientos (Wolf et al. 1939a, 1939b). De acuerdo a los autores, la comparación de estos hallazgos con reportes con características similares en la literatura permitió, por un lado, confirmar que *T. gondii* era el agente etiológico de la infección y por otro lado, los llevó a desarrollar una hipótesis sobre la transmisión congénita del parásito, confirmándose esta hipótesis en estudios posteriores durante infecciones *in vitro* en ratones (Wolf et al. 1939b; Cowen 1950a, 1950b, 1950c, Cowen and Wolf 1951a, 1951b). El creciente número de investigaciones sobre *T. gondii* en las décadas siguientes, permitió elucidar diversos aspectos biológicos y epidemiológicos como: mecanismos de transmisión, ciclo de vida, relevancia como agente infeccioso, descripciones detalladas de su morfología, clasificación taxonómica, distribución en distintas poblaciones humanas, virulencia, etc. Estos aspectos resultan de interés para este estudio, por lo que serán tratados en apartados posteriores.

4.2. ULTRAESTRUCTURA DE LAS FORMAS UNICELULARES DE *Toxoplasma gondii*

Durante su ciclo biológico, *T. gondii* presenta distintas formas morfológicas, el bradizoíto, el taquizoíto, el esporozoíto y el merozoíto, que a su vez se subdivide en cinco formas estructurales en el intestino de los félidos. De manera general se considera que el bradizoíto, el taquizoíto y el esporozoíto, son los únicos estadios infectivos (Dubey et al. 1998), sin embargo, algunos autores también consideran al merozoíto como un estadio infectivo, debido a que tiene la capacidad de invadir nuevas células y replicarse en ellas (Ferguson and Dubremetz 2014). Estas cuatro formas morfológicas de *T. gondii* poseen dos roles biológicos específicos en su ciclo de vida: 1) la infección de un nuevo hospedero la realizan el esporozoíto o el bradizoíto, mediante el ooquiste y el quiste tisular respectivamente; y 2) la propagación dentro del hospedero, la realizan el merozoíto o el taquizoíto (Ferguson 2004). Los estudios de morfología que usan técnicas de microscopia electrónica, han mostrado que

los cuatro estadios poseen una ultraestructura² compartida, sin embargo, presentan también características que permiten diferenciar a cada uno.

4.2.1. CARACTERÍSTICAS COMPARTIDAS

T. gondii presenta una forma elongada de luna creciente (Figura 1) con el extremo anterior cónico-puntiagudo y el extremo posterior romo (Ogino and Yoneda 1966; Garnham et al. 1962; Sheffield and Melton 1968; Speer et al. 1998; Speer and Dubey 2005). Posee una membrana de tres capas, la capa exterior se denomina plasmalema (PI) y cubre la totalidad de la célula; las dos capas interiores forman al complejo membranal interno (CMI) que inicia en el anillo polar 1 y finaliza en el anillo posterior, en donde el CMI es más grueso (Sheffield and Melton 1968; Morrissette et al. 1997). Debajo del CMI se extienden en espiral 22 microtubulos submembranales que en sentido antero-posterior, inician en uno de los anillos polares y finalizan en un anillo posterior (Morrissette et al. 1997; Anderson-White et al. 2012; Sheffield and Melton 1968). En el extremo anterior presentan: dos anillos apicales (Ana); dos anillos polares (Anp); una estructura denominada conoide (Co) con apariencia de resorte comprimido que es formada por microtubulos; las micronemas (Mn), organelos de secreción que tienen una distribución debajo del Anp; y las roptrías (Rp), organelos de secreción de distribución lineal y en algunos casos extendidas al interior del conoide (Speer et al. 1998; Sheffield and Melton 1968). El núcleo (Nu) presenta cúmulos de cromatina y un nucléolo central, en su periferia se encuentra el aparato de Golgi (Gi), el retículo endoplásmico liso (RI) y rugoso (Rr) (Sheffield and Melton 1968). Posee un apicoplasto (Ap), organelo que da nombre al grupo de los *Apicomplexa*, y que se obtuvo por un segundo proceso de endosimbiosis (Kohler 1997). Presenta una sola mitocondria (Mt) ramificada extendida hacia el extremo anterior de la célula (Melo et al. 2000). Presenta dos invaginaciones, el microporo (Mp) que es una invaginación del plasmalema, y el poro posterior (Garnham et al. 1962). No

² Ultraestructura. La estructura de una célula que solo puede definirse mediante microscopia electrónica.

poseen organelos visibles de locomoción, sin embargo, puede deslizarse, ondularse o girar. En el citoplasma se distribuyen de manera libre: los granulos densos (GrD) que se consideran un tercer organelo de secreción; varios ribosomas (que también pueden estar asociados a membrana); gránulos de amilopectina (GrA) y cuerpos lipídicos (CpL) (Garnham et al. 1962; Sheffield and Melton 1968).

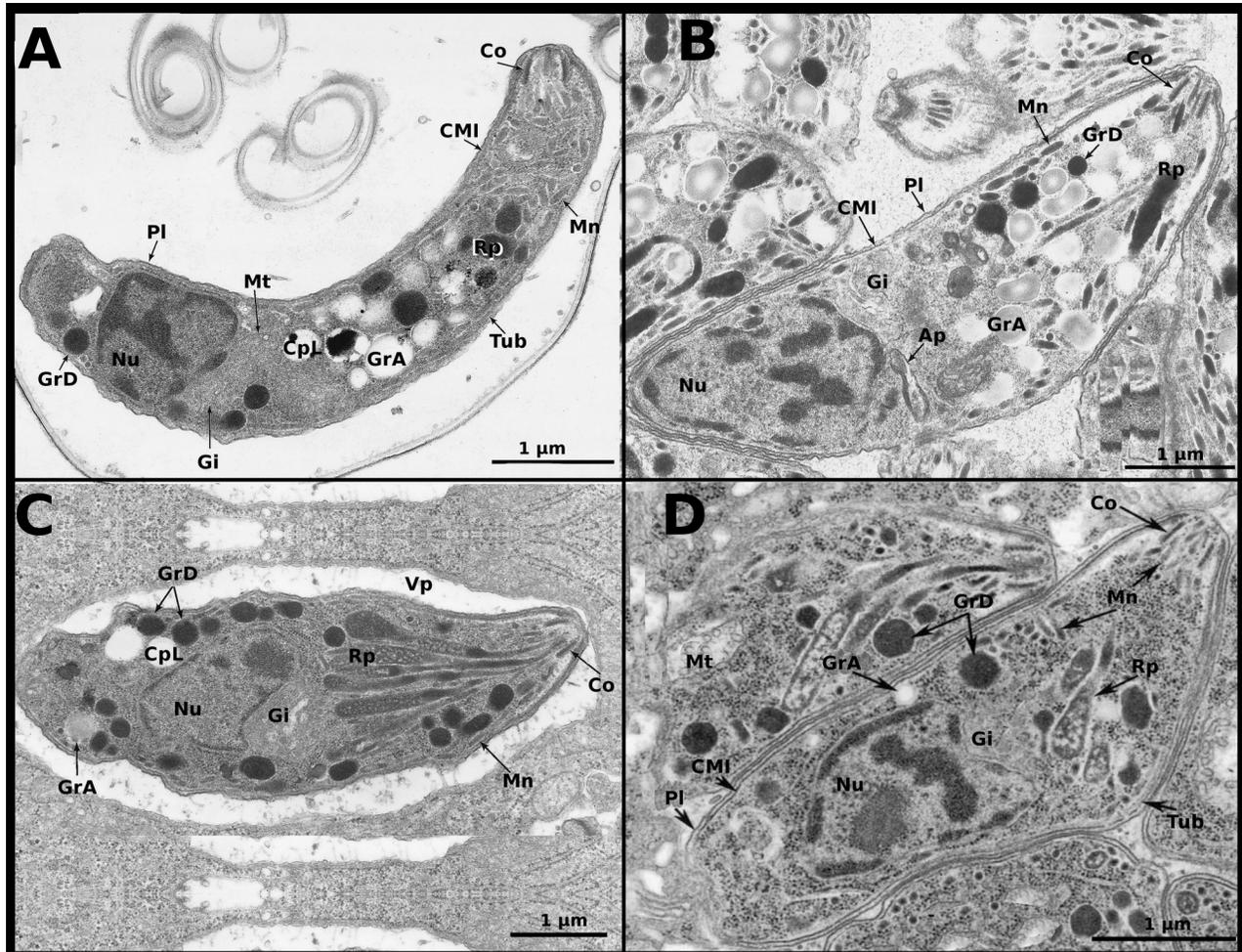


Figura 1. Estadios de *Toxoplasma gondii*. En las figuras se pueden observar algunas de las características ultraestructurales que comparten los cuatro estadios como el conoide (CO), el Plasmalema (PI), el Complejo Membranal Interno (CMI), los gránulos densos (GrD), las Roptrías (Rp), las micronemas (Mn), los cuerpos lipídicos (CpL), los gránulos de amilopectina (GrA), además de los organelos como el Núcleo (Nu), Aparato de Golgi (Gi) y Mitocondrias (Mt). A). Esporozoíto, modificado de Speer et al (1998). B) Bradizoíto modificado de Dubey et al (1998). C) Taquizoíto, modificado de Dubey et al (1998). D) Merozoíto, modificado de Speer y Dubey (2005).

4.2.2. DIFERENCIAS ULTRAESTRUCTURALES

Algunos autores consideran que las principales diferencias ultraestructurales entre los cuatro estadios de *T. gondii* son el tamaño de la célula, la posición del núcleo y diferencias en el número, tamaño y apariencia de los organelos de secreción y cuerpos de inclusión que poseen, el concentrado de las diferencias se encuentran agrupadas en la Tabla 1 (Dubey et al. 1998; Ferguson and Dubremetz 2014; Speer et al. 1998).

Tabla 1. Resumen de las diferencias ultraestructurales de los estadios de *T. gondii*

Estadio	Posición del núcleo	Micronemas	Roptrías		Gránulos densos	Gránulos de polisacáridos
			Número	Apariencia		
Esporozoíto	Central	Pocas	5-12	Laberinto	Numerosos	Pocas
Bradizoíto	Posterior	Numerosas	5-10	Sólidas	Numerosos	Numerosos
Taquizoíto	Central	Pocas	3-5	Sólidas	Numerosos	Ausentes
Merozoíto	Posterior	Numerosas	5-10	Laberinto	Numerosos	Numerosos

Resumen de las principales diferencias ultraestructurales entre los cuatro estadios de *Toxoplasma gondii*. Posición del núcleo, número de micronemas, número y apariencia de las Roptrías y número de los gránulos densos y de polisacáridos. Modificado de Ferguson y Dubremetz (2014).

4.2.3. QUISTES TISULARES

Por varios años existió confusión sobre las estructuras que *T. gondii* formaba en los tejidos de hospederos intermediarios; por un lado, se denominaban “pseudo-quistes” a los grupos de taquizoítos, mientras que el término quistes tisulares se refería a los grupos de bradizoítos (Dubey et al. 1998). No obstante, la resistencia de los bradizoítos a la digestión por jugo gástrico (pepsina-HCl) permitió aclarar la confusión, por lo que actualmente se reconoce que el bradizoíto es el único estadio de *T. gondii* que forma quistes verdaderos (Jacobs et al. 1960). Los quistes comienzan a formarse a partir del tercer día post-infección y permiten a los bradizoítos persistir por periodos largos en los hospederos (Dubey and Frenkel 1976). Permanecen y crecen en el citoplasma de la célula hospedera mientras el bradizoíto sigue dividiéndose, sin embargo, los mecanismos de formación y rompimiento de los quistes

siguen siendo desconocidos (Ferguson and Hutchison 1987a, 1987b; Ferguson et al. 1989; van der Waaij 1959). Aunque se considera que *T. gondii* posee la capacidad de infectar cualquier célula nucleada y por ende generar quistes en cualquier órgano del cuerpo, suelen observarse principalmente en músculo esquelético y cardíaco, cerebro y ojo, considerándose que la distribución en el organismo está relacionada con el hospedero intermediario y a la cepa infectante (Dubey 1997; Dubey et al. 1996; Koch et al. 2016; Lindsay et al. 1997).

El tamaño de los quistes es muy variado y depende de factores como la edad, ubicación y número de bradizoítos contenidos (Figura 2); sin embargo, se ha descrito que distintas cepas de *T. gondii* generan quistes de diferentes tamaños durante el mismo período post-infección (Dubey 1996, 1997; Dubey et al. 1998; Ferguson and Hutchison 1987a; Lainson 1958). Los quistes de reciente formación pueden presentar un diámetro de 5 μm y contener 2 bradizoítos; mientras que ha sido registrado que en cerebro y músculo alcanzan los 70 μm y 100 μm de diámetro respectivamente y contener cientos de bradizoítos. Sin embargo, algunos autores reportan no haber encontrado quistes que superen los 70 μm (Dubey et al. 1998). La pared quística se compone principalmente de materiales celulares tanto del hospedero como del parásito, es delgada, elástica y no contiene glucógeno u otros polisacáridos; asimismo, los espacios libres en la pared y dentro del quiste son ocupados por un material granular (Ferguson and Hutchison 1987a, 1987b; Sheffield and Melton 1968).

4.2.4. OOQUISTES

Con el descubrimiento de estructuras de resistencia de *T. gondii* en heces de gatos, los términos “quiste tisular” y “ooquiste” fueron acuñados para diferenciar a las 2 estructuras, siendo estos últimos de formación exclusiva en el epitelio intestinal de los hospederos definitivos como resultado de la fase sexual (Dubey and Beattie 1988; Dubey and Frenkel 1972). La estructura de los ooquistes se modifica durante la esporulación en el medio ambiente de uno a cinco días después de haber sido excretados con las heces fecales

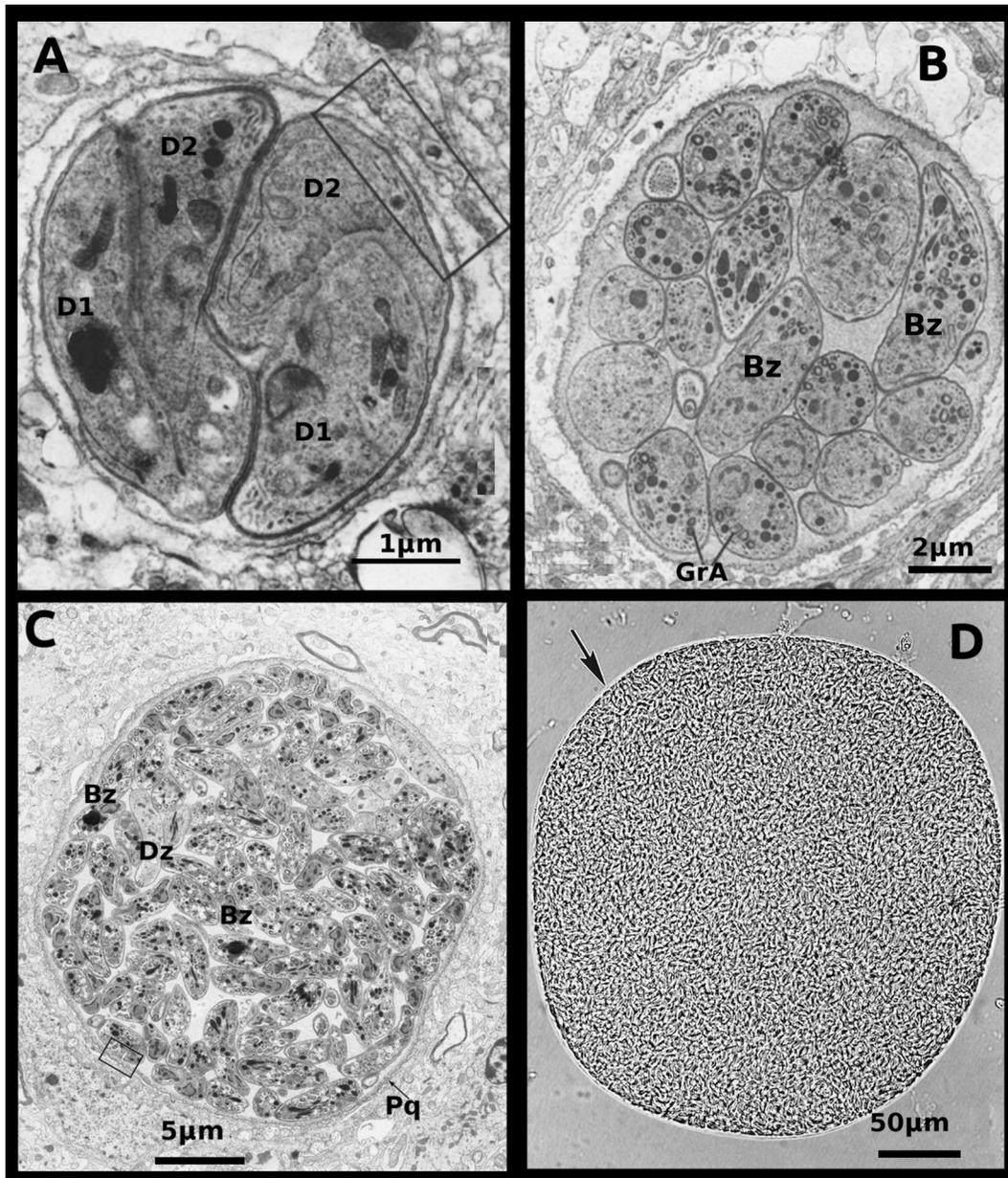


Figura 2. Quistes tisulares (QT) de *T. gondii*. **A**, QT a 11 dpi. con dos bradizoítos en proceso de endodiogenia, los dos parásitos hijos (D1 y D2) están contenidos en el parental. **B**, QT a 21 dpi. con muchos bradizoítos (Bz) con gránulos de amilopectina (GrA). **C**, QT a 8 meses post-infección. En la imagen se observa la pared del quiste (Pq), un microporo (rectángulo negro) y ~110 bradizoítos vivos (Bz) y degenerados (Dz). **D**, QT a 14 meses post-infección. La pared quística apenas se observa (flecha), se estima que el QT contiene más de 1000 bradizoítos. Imágenes A y B modificadas de Ferguson y Hutchison (1987a), imagen C y D modificadas de Dubey et al (1998).

(Dubey et al. 1998) (Figura 2B-D). La esporulación representa la transición entre el cigoto (ooquiste no esporulado) y el ooquiste (esporulado). Posterior a la esporulación, la nueva estructura presenta dos esporoquistes de 6 a 8 μm de diámetro que a su vez contienen cuatro esporozoítos cada uno, resultado de varias divisiones del núcleo y la membrana. Durante este proceso existe también una transición de estructuras subsféricas a elipsoidales, con diámetros en el rango de los 10 a los 13 μm . Las paredes del ooquiste y los esporoquistes presentan tres y dos capas respectivamente, que aumentan su densidad del interior hacia el exterior y un poro de ~ 350 nm de diámetro ubicado de manera aleatoria (Ferguson et al. 1978, 1979d, 1979a, 1979b, 1979c).

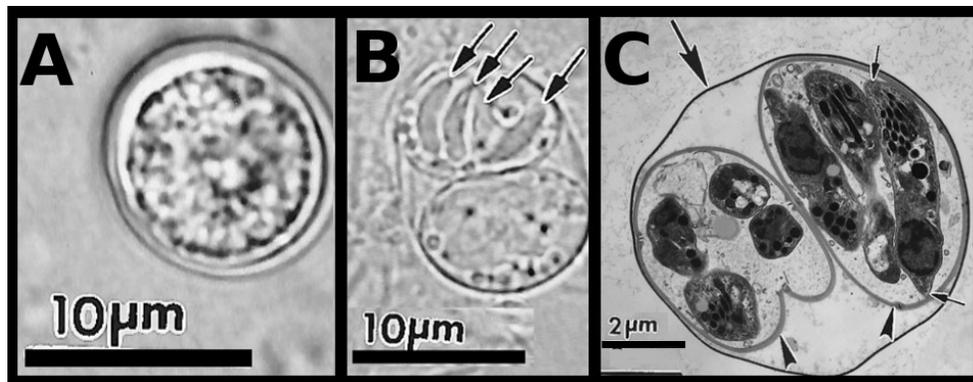


Figura 3. Ooquistes (Oq) de *T. gondii*. **A**, Oq sin esporular. **B**, Oq esporulado con dos esporoquistes, en uno se ven cuatro esporozoítos (flechas). **C**, Oq esporulado en el que se ve la pared del ooquiste (flecha grande), dos esporoquistes (cabezas de flecha) y esporozoítos (flechas pequeñas). Tomado de Dubey et al (1998).

4.3. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida (Hutchison et al. 1970) de *T. gondii* (Figura 4) involucra un proceso de reproducción asexual (Goldman et al. 1958) y formación del quiste tisular en los hospederos intermediarios (HI) que pueden ser cualquier vertebrado de sangre caliente (Jacobs 1973), dos procesos de reproducción asexual (Piekarski et al. 1971; Speer and Dubey 2005) y un

sexual (Hutchison et al. 1970; Frenkel et al. 1970; Frenkel 1970; Dubey et al. 1970) en los hospederos definitivos (HD) que pueden ser cualquier especie de la familia Felidae (Dubey 2009a) y un proceso asexual que se realiza exclusivamente de manera extracelular en el medio ambiente (Dubey et al. 1970).

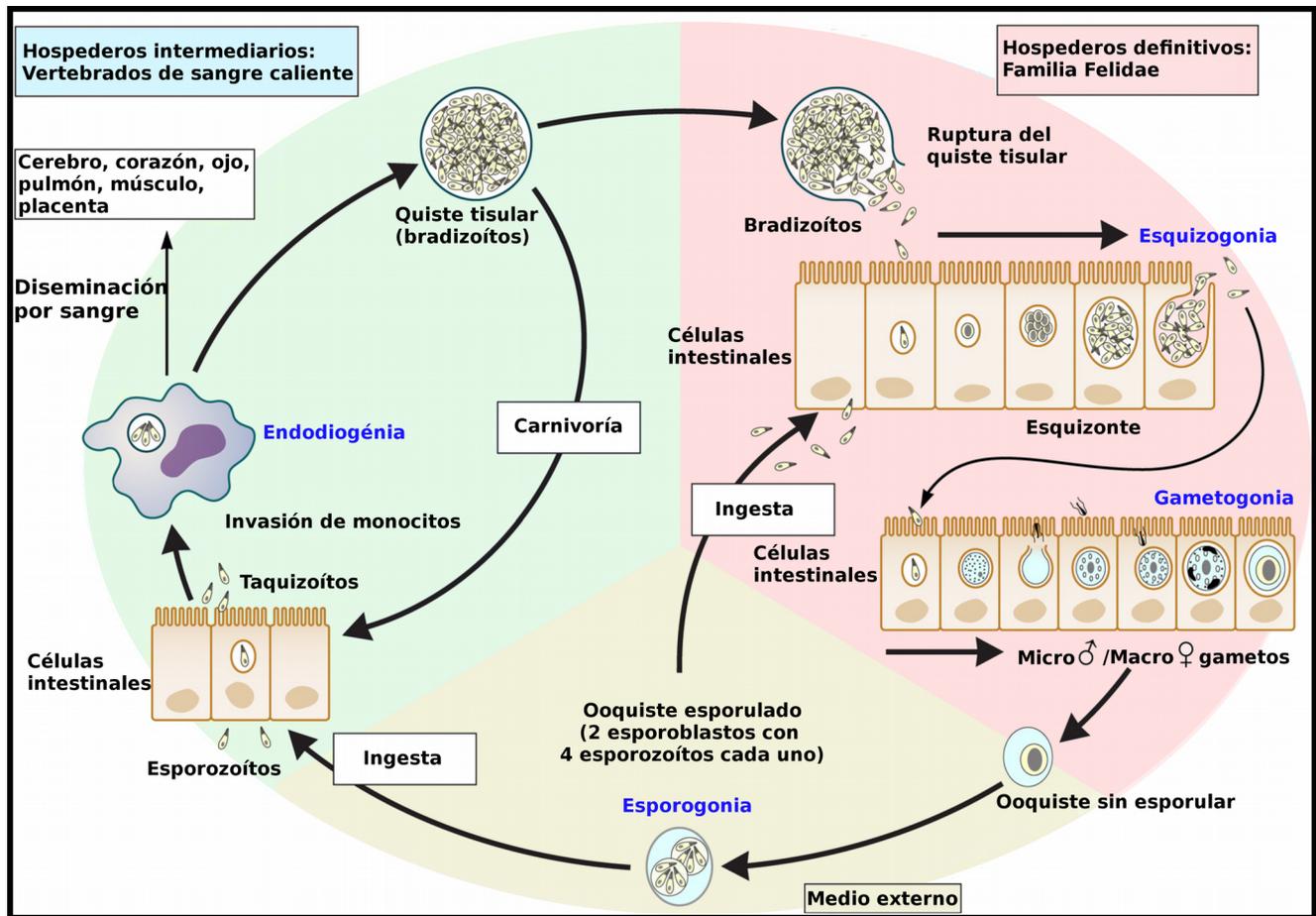


Figura 4. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. La endodiogénesis es el único tipo de reproducción en los hospederos intermediarios (izquierda). La esporogonia, gametogonia y formación del cigoto se llevan a cabo exclusivamente en félidos (derecha). La esporulación, único proceso extracelular (abajo). Modificado de Robert-Gagneux y Dardé (2012).

4.3.1. HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

Situando el inicio de la infección cuando un HI ingiere ooquistes esporulados, durante su paso por el tracto digestivo, las paredes del ooquiste y esporoquistes sufren degradación debido a la exposición a sales biliares y enzimas proteolíticas digestivas, permitiendo la liberación de los esporozoítos en la luz intestinal (Black and Boothroyd 2000). En condiciones controladas de laboratorio en experimentos *in vivo* en ratones infectados por la vía oral con ooquistes, Dubey et al. (Dubey et al. 1997) reportaron que en un rango de 12 a 18 horas post-infección (hr-pi) los esporozoítos se diferencian a taquizoítos y a los 5 días post-infección (dpi) los taquizoítos se diferencian a bradizoítos, en tanto que a los 8 dpi es posible observar quistes tisulares en cerebro. Durante el proceso, los esporozoítos (Dubey et al. 1997; Speer and Dubey 1998), los taquizoítos (Goldman et al. 1958) y los bradizoítos dentro de los quistes tisulares (Ferguson and Hutchison 1987a) se reproducen mediante un proceso asexual especializado denominado endodiogenia. De manera general, el proceso consiste en que finalizada la mitosis, el parásito parental comienza un proceso de gemación interna en el que se forman dos yemas unidas por un huso en el polo nuclear, se forma un Complejo Membranal Interno que delimita a los dos parásitos formados, un conjunto completo de organelos y una porción del citoplasma parental. Los nuevos parásitos continúan su crecimiento en tanto que el CMI parental desaparece, lo que permite que el plasmalema parental derive en el de los nuevos parásitos. Cuando termina el proceso, los dos nuevos parásitos se separan dejando un cuerpo citoplasmático residual (Goldman et al. 1958; Sheffield and Melton 1968; Ogino and Yoneda 1966).

4.3.2. HOSPEDEROS DEFINITIVOS

Cuando algún HD se infecta mediante la ingesta de carne con quistes tisulares, las paredes del quiste se degradan en su paso por el tracto digestivo, lo que permite que los bradizoítos sean liberados en la luz intestinal (Black and Boothroyd 2000). Los bradizoítos invaden los

enterocitos del intestino delgado y comienza la fase de esquizogonia característica de los Coccidios, la cual se realiza de manera exclusiva en el epitelio intestinal de los HD (Hutchison et al. 1970). De acuerdo a lo reportado por Dubey y Frenkel (Dubey and Frenkel 1972), la esquizogonia comienza a partir de las 12 hr-pi y finaliza a los 15 dpi, tiempo en el que se desarrolla una diferenciación secuencial en cinco tipos de esquizontes y merozoítos denominados tipo A al tipo E (Tabla 2), debido al tiempo post-infección en el que pueden ser observados. Durante la esquizogonia, *T. gondii* se reproduce asexualmente de forma asincrónica por endodiogonia (Speer and Dubey 2005) y de forma sincrónica por endopoligenia (Piekarski et al. 1971). La endodiogonia en el HD se lleva a cabo de la misma forma que en el HI (Speer and Dubey 2005); mientras que la endopoligenia difiere de la endodiogonia, en que se producen de manera sincronizada entre 4 y 20 nuevos parásitos en el interior de un parásito parental (Piekarski et al. 1971; Speer and Dubey 2005).

Tabla 2. Comparación de características entre los esquizontes y merozoítos tipo B al E

Característica	Tipo de esquizonte			
	B	C	D	E
Ubicación	Enterocitos, Lamina propria	Enterocitos, Lamina propria	Enterocitos	Enterocitos
Tipo de división	Endodiogénia (asincrónica)	Endopoligenia (sincrónica)	Endopoligenia (sincrónica)	Endopoligenia (sincrónica)
Tamaño del esquizonte	26 x 17 μm	16 x 10 μm	7.3 x 5.6 μm	12 x 8.8 μm
No. de merozoítos por esquizonte	2 – 48	24 – 36	12 – 18	50 – 80
Tamaño del merozoíto	5.8 x 2.9 μm	6.1 x 1.5 μm	5.8 x 1.3 μm	4.5 x 1.1 μm

Tabla comparativa de los esquizontes y merozoítos tipo B al tipo E. Ubicación en el intestino del gato, tipo de división celular, tamaño del esquizonte, Número de merozoítos que se forman y el tamaño que alcanzan. Modificado de Speer y Dubey (2005).

La reproducción sexual en el HD inicia con la fase de gametogonia, que se lleva a cabo durante los días 3 y 15 posteriores a la infección, al final de esta fase, los gametocitos masculinos producen entre 6 y 21 gametos biflagelados, mientras que los femeninos solo producen un gameto. Se desconoce que tipo de estructura durante la esquizogonia da origen a los microgametos masculino y femenino, sin embargo, debido a que la gametogonia ocurre durante el mismo período en el que puede observarse el esquizonte tipo E, se considera que este podría ser el precursor de los gametocitos (Dubey and Frenkel 1972)). El proceso de fecundación ha sido comprobada mediante cruces con dos cepas distintas de *T. gondii* en gatos (Pfefferkorn and Pfefferkorn 1980), pero no ha sido posible observar el proceso de fecundación por microscopia, sin embargo, se ha reportado que tanto el gametocito femenino como el masculino pueden encontrarse en la misma célula (Dubey and Frenkel 1972). Se considera que posterior a la fecundación y formación del cigoto (único estado diploide de este parásito) se forma una pared quística de manera progresiva que da como resultado un ooquiste no esporulado, el cual será liberado a la luz intestinal cuando la célula infectada se rompa. Los procesos que se llevan a cabo desde la infección hasta la producción de ooquistes se conocen como período prepatente, y presenta diferencias en el tiempo en el que se concluye dependiendo del estadio que generó la infección, si fue generada por quistes tisulares/bradizoítos se realiza en 3 a 10 días, si se inició por taquizoítos se requieren ≥ 13 días y si es iniciada por ooquistes esporulados/esporozoítos ≥ 18 días (Dubey et al. 1970; Dubey and Frenkel 1976). Durante el período de excreción de ooquistes, los HD pueden excretar hasta mil millones de ooquistes en un rango de 7 a 20 días (Dubey and Frenkel 1972; Dubey et al. 1970).

4.3.3. MEDIO EXTERNO

La esporulación es el único proceso que se realiza de manera extracelular en el medio ambiente. Después de haber sido defecados, los ooquistes esporulan en un rango de 24 a 48

horas en condiciones adecuadas de temperatura (~25°C) y aireación, tiempo en el que ya son infectivos. Por otro lado, los ooquistes se inactivan a temperaturas menores a 4°C o mayores a 50°C (Dubey et al. 1970). De manera general, durante la esporogonia el cigoto realiza dos divisiones nucleares en tanto comienza a formarse una segunda membrana que limita a los dos esporoblastos binucleados (Ferguson et al. 1979a). Los esporoblastos adoptan una forma elipsoidal y se forman las placas de las paredes de los esporoquistes en tanto se desarrollan cambios citoplasmáticos (Ferguson et al. 1979b). En cada extremo de los esporoquistes se forman dos esporozoítos mientras las placas de los esporoquistes continúan su crecimiento. Al finalizar la esporulación, cada ooquiste contiene dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno (Ferguson et al. 1979c).

4.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

T. gondii posee dos mecanismos principales de transmisión (Figura 5) por los cuales puede generar infección en un nuevo hospedero y están relacionadas con las dos estructuras de resistencia que se forman durante su ciclo de vida (Figura 4). El primero es el consumo de carne contaminada por quistes tisulares. Desmonts y colaboradores (Desmonts et al. 1965) describieron la relevancia epidemiológica de consumir carne poco cocida en la que pueden permanecer viables los quistes tisulares. Ellos observaron que la incidencia de la toxoplasmosis incrementaba en niños internados en un hospital en París en donde se les alimentaba con carne poco cocida. Cuando en la dieta se incluían dos porciones de carne poco cocida de res o caballo, la tasa anual del 10% incrementaba al 50%; mientras que el incremento era del 100% si la carne proporcionada era de borrego, con lo que se confirmaba el papel del carnivorismo en la transmisión de la infección. El segundo mecanismo es el consumo de agua o alimentos contaminados con ooquistes. Este mecanismo se conoció gracias a la descripción y la confirmación de la infectividad de los ooquistes en el excremento de gatos que habían sido alimentados con tejidos contaminados con quistes tisulares de *T.*

gondii (Dubey 1968; Dubey et al. 1970; Dubey and Frenkel 1973; Frenkel et al. 1969, 1969; Sheffield and Melton 1969; Work and Hutchison 2009). Adicionalmente *T. gondii* posee un tercer mecanismo, la transmisión congénita (Cowen 1950a, 1950b, 1950c). Sin embargo, este mecanismo podría considerarse como accidental, ya que se presenta solamente si una hembra gestante esta cursando por la fase aguda de la infección debido a que los taquizoítos pueden atravesar la barrera placentaria e infectar al producto en gestación. Se han reportado otros mecanismos de transmisión, pero debido a que son de menor relevancia epidemiológica no se tratarán en lo sucesivo.

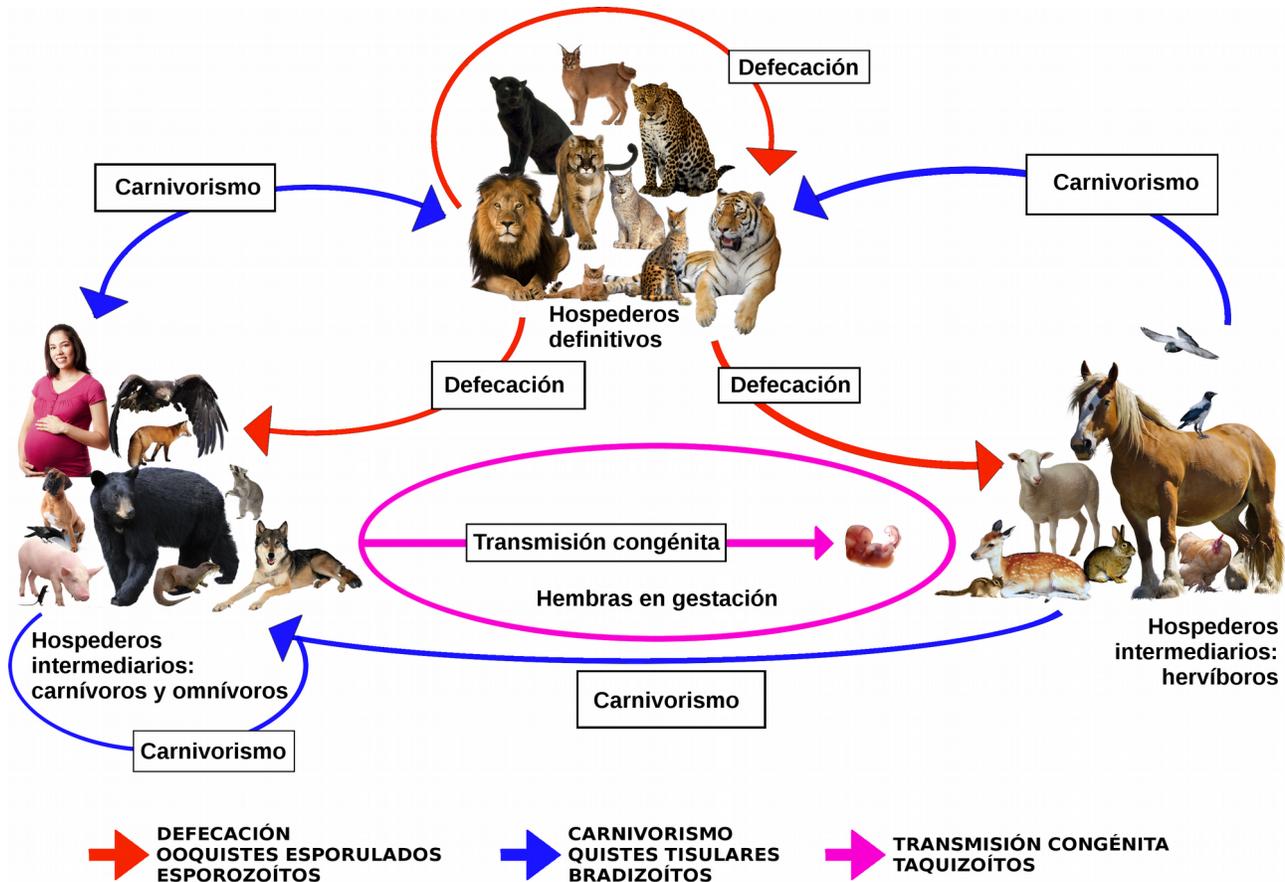


Figura 5. Mecanismos de transmisión de la toxoplasmosis. Los dos principales mecanismos de infección son por la ruta fecal-oral mediante la ingesta de ooquistes esporulados con esporozoítos (flechas rojas) o por carnivorismo mediante la ingesta de quistes tisulares (flechas azules). Adicionalmente, la infección se puede adquirir por la vía congénita con taquizoítos (flecha rosa) si las hembras de los mamíferos adquieren la infección durante la gestación.

4.5. PATOGENIA

4.5.1. CICLO LÍTICO

En la fase aguda de la toxoplasmosis, la diseminación a otros órganos extra-intestinales depende de los taquizoítos a través de una serie de procesos conocidos como ciclo lítico³ (Black and Boothroyd 2000), el cual incluye tres eventos secuenciales (Blader et al. 2015): 1) Invasión de la célula hospedera. En la primera parte de este proceso cuando los taquizoítos se encuentran en el medio extracelular, proteínas de superficie del parásito como la laminina o una familia de proteínas de superficie conocidas como SAG (surface antigen) por sus siglas en inglés, se unen a ligandos de la superficie de la célula del hospedero como integrinas $\beta 1$ y estructuras de proteoglicanos sulfatados, permitiendo generar un anclaje a la célula hospedera (Carruthers et al. 2000; Furtado et al. 1992; He et al. 2002; Jacquet et al. 2001; Manger et al. 1998). Durante la segunda parte de este proceso, el parásito migra alrededor de la célula mediante movimientos en espiral hasta que se reorienta de manera que el cono apical entre en contacto con la superficie de la célula (Leung et al. 2014). En este sitio, las micronemas secretan proteínas como la AMA1 (Hehl et al. 2000) y MIC8 (Kessler et al. 2008) en tanto que las roptrías secretan las proteínas RON5 (Beck et al. 2014), permitiendo que en la membrana de la célula se forme una brecha en forma de anillo conocida como unión móvil (Alexander et al. 2005; Besteiro et al. 2009; Lamarque et al. 2011; Mital 2005; Shen and Sibley 2012). Durante la tercera fase de la invasión suceden varios eventos de manera paralela que ponen fin al proceso de invasión. Después de la formación de la unión móvil, las roptrías secretan las proteínas ROP1 que están involucradas en la formación inicial de la vacuola parasitófora (Carruthers and Sibley 1997), durante este proceso, *T. gondii* se constriñe para ingresar a través de la unión móvil en sentido antero-posterior del parásito e

³ Ciclo lítico. Proceso de replicación de los virus que finaliza en la ruptura de la membrana de la célula infectada, con lo cual la progenie es liberada al medio extracelular y puede infectar nuevas células

invadir a la célula del hospedero (Alexander et al. 2005) en un lapso de 15 a 30 segundos (Bommer et al. 1969). Mientras el parásito continúa la invasión, la membrana de la célula se invagina para formar la vacuola parasitófora (Suss-Toby et al. 1996), y una vez formada, los granulos densos secretan proteínas conocidas como GRA, permitiendo la formación de un complejo microtubular entre el parásito y la vacuola parasitófora (Achbarou et al. 1991; Carruthers and Sibley 1997; Gold et al. 2015; Mordue et al. 1999). Finalizado el proceso de invasión, algunos organelos de la célula hospedera como la mitocondria y el retículo endoplásmico (Melo et al. 1992; Coppens et al. 2006) son secuestrados, permitiendo la nutrición y replicación del parásito (Dunn et al. 2007). 2) Replicación del parásito. Una vez que el parásito modifique el microambiente celular para su beneficio, los taquizoítos se replicarán inmediatamente por endodiogenia (Sheffield and Melton 1968; Goldman et al. 1958) por varios ciclos de replicación con una duración de ~7 horas cada uno hasta su egreso de la célula (Radke 2001; Radke and White 1998). 3) Egreso de los parásitos. Este proceso que se realiza de manera rápida (Blader et al. 2015), inicia cuando los parásitos atraviesan la vacuola parasitófora constriñéndose de manera similar al proceso de invasión celular, y finaliza con la lisis de la célula, lo que permite la salida de los parásitos al medio extracelular e infección de nuevas células (Caldas et al. 2010). Para iniciar y concluir el proceso, son necesarios algunos estímulos, como la disminución del potasio (Moudy et al. 2001), el incremento del calcio intracelular (Endo et al. 1982) o el incremento en la concentración de ácido abscísico (ABA) (Nagamune et al. 2008). En conjunto estos estímulos se agrupan en los que involucran al sistema inmune del hospedero y los que no lo involucran (Blader et al. 2015).

4.5.2. INFECCIÓN POR *T. gondii*

De manera general, se considera que la toxoplasmosis no representa un problema de salud pública en humanos, debido a que ~80% de las infecciones son asintomáticas y a que no

presentan complicaciones ni en la fase aguda ni en la crónica (Montoya and Liesenfeld 2004). Del porcentaje restante, algunos individuos presentan sintomatología moderada que suele ser autolimitante (Montoya and Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux and Darde, 2012) y solo una pequeña proporción de los individuos infectados con sintomatología desarrolla las formas más severas de la infección, resultando en complicaciones congénitas, oculares, cerebrales e incluso la muerte si la infección es diseminada en la mayoría de los órganos. Las descripciones de la toxoplasmosis en animales no humanos se basa principalmente en las realizadas en animales domésticos y en especies silvestres en semicautiverio o que se encuentran amenazadas; sin embargo, se considera de manera general que las manifestaciones clínicas son similares a las descritas en el humano (Montoya and Liesenfeld 2004). En la toxoplasmosis, las diferencias en la sintomatología de los hospederos es el resultado de la interacción de factores característicos del parásito y de las especies que infecta, de las cuales, la interacción *in vivo* más estudiada es con el ratón, debido a su uso como modelo experimental. Por esta razón, el principal criterio para determinar la virulencia de las cepas es el porcentaje de sobrevivencia y mortandad que genera un inóculo determinado de parásitos en el ratón (Kaufman et al. 1958).

La virulencia de las cepas de *T. gondii* se debe a la combinación de factores celulares, moleculares y genéticos.

1) Factores celulares. A diferencia de los merozoítos, los esporozoítos y los bradizoítos cuya existencia está limitada al epitelio intestinal o a estructuras de resistencia, los taquizoítos son el único estadio con la capacidad de diseminar la infección a órganos extraintestinales (Ferguson 2004). De acuerdo con Blader et al. (2015), las formas más severas de la toxoplasmosis se relacionan a la destrucción tisular generada por el ciclo lítico de los taquizoítos durante la fase aguda de la infección. Durante esta fase, los taquizoítos pueden invadir tejidos lejanos al sitio de infección inicial, debido a que tienen la capacidad de

transitar activamente en el medio extracelular y atravesar capas celulares (Barragan and Sibley 2002) sin que la integridad de la barrera celular o la del parásito se alteren (Barragan et al. 2005). Adicionalmente se ha reportado que los taquizoítos invaden leucocitos sin replicarse en ellos (Channon et al. 2000), pudiendo usarlos como transporte y llegar a espacios extravasculares (Courret 2006), capacidad que le permite atravesar barreras biológicas (Barragan and Sibley 2003) e invadir órganos “inmunoprivilegiados”⁴ como el ojo, cerebro y placenta (Barragan and Sibley 2003).

2) Factores moleculares. *T. gondii* posee un repertorio de moléculas que lo vuelven inusual entre otros patógenos intracelulares (Black and Boothroyd 2000). Ejemplo de ello son la familia de proteínas SAG que están involucradas en los eventos iniciales de invasión celular (Manger et al. 1998), y a las cuales se les considera son las que permiten invadir cualquier célula nucleada en los hospederos (Black and Boothroyd 2000). Otra molécula del parásito que se ha relacionado con la virulencia es la proteína MIC2 secretada por las micronemas, esta proteína interacciona con moléculas de adhesión celular ICAM-1 relacionadas con mecanismos de tráfico celular en los hospederos, por lo que se considera que esta interacción le permite a *T. gondii* explotar estos mecanismos para diseminar más rápidamente la infección en tejidos extraintestinales (Barragan et al. 2005; Barragan and Sibley 2002; Huynh and Carruthers 2006). Adicionalmente, se ha observado que la expresión génica es diferente entre los cuatro estadios (Boothroyd et al. 1998) e incluso entre los taquizoítos extracelulares e intracelulares (Lescault et al. 2010), lo cual explica en parte el porque solo el taquizoíto tiene la capacidad de diseminar la infección.

4 Inmunoprivilegiados. Concepto desarrollado por Peter Medawar en 1948. Establece que el cerebro y la cámara anterior del ojo son sitios privilegiados inmunológicamente, debido a la ausencia de vasos sanguíneos o linfáticos, lo que los hace libres de reacciones anti-alotransplantes y de respuesta inflamatoria. El concepto se ha extendido a otros órganos como testículos, placenta, fetos.

3) Factores genéticos. Se ha descrito que aspectos relacionados con la patogenicidad de *T. gondii* como la diseminación de la infección (Barragan et al. 2005; Barragan and Sibley 2002), la tasa de replicación (Kaufman et al. 1959), la capacidad de producir quistes tisulares (Dubey 1997) y otros más, es diferente entre las distintas cepas. Por esta razón, los estudios de tipificación genética incluyen genes de proteínas de virulencia secretadas durante la infección (Khan et al. 2007; Su et al. 2010, 2006; Howe and Sibley 1995). Estos estudios han evidenciado la relación entre el genotipo de *T. gondii* y sintomatologías particulares en algunos hospederos. Ejemplos de esta relación son el de la cepa X que se asocia con toxoplasmosis cerebral en nutrias marinas (Miller et al. 2004; VanWormer et al. 2014); las cepas tipo I que se relacionan con la toxoplasmosis ocular y congénita en humanos (Khan 2006), las cepas tipo II que se relacionan con abortos en borregos (Chessa et al. 2014; Owen and Trees 1999) o las cepas de la Guyana Francesa causantes de manifestaciones clínicas severas en humanos (Bossi et al. 2002; Carne et al. 2002, 2009).

4.6. DIAGNÓSTICO Y AISLAMIENTO DE *T. gondii*

En la actualidad existen diversas técnicas que permiten determinar si un organismo es positivo a toxoplasmosis, y están basadas en serología, ADN o demostración del parásito en tejidos. Sin embargo, debido a que la toxoplasmosis suele ser asintomática, la mayoría de las veces el diagnóstico solo es indicativo que se tuvo contacto con el parásito en el pasado. Por otro lado, aunque el aislamiento no es un procedimiento diagnóstico rutinario, puede utilizarse como una técnica auxiliar en casos particulares en los que se requiera asociar síntomas o daños tisulares con el parásito. La efectividad de las técnicas anteriores dependen de aspectos como experiencia en la técnica, accesibilidad a muestras biológicas como sangre, tejido, líquido cefalorraquídeo, etc; la importancia médica, veterinaria, económica y biológica que represente el hospedero, por ejemplo mujeres embarazadas, animales de producción ganadera, especies protegidas, etc; las características de la

infección, por ejemplo toxoplasmosis ocular, cerebral, congénita, diseminada, etc (Montoya and Liesenfeld 2004; Robert-Gangneux and Darde 2012; Dubey and Beattie 1988).

4.6.1. DIAGNÓSTICO MEDIANTE SEROLOGÍA

Las técnicas están enfocadas en corroborar la existencia de anticuerpos anti-*T.gondii* en suero, aunque existen modificaciones para detectarlo en jugo de carne, leche u otros fluidos. La mayoría de las técnicas han sido desarrolladas para ser usadas como diagnóstico de toxoplasmosis en humanos, aunque a través de los años algunas han sido modificadas para ser aplicadas principalmente en especies de interés ganadero, y en menor proporción para ser aplicadas en fauna silvestre (Montoya and Liesenfeld 2004; Robert-Gangneux and Darde 2012; Dubey and Beattie 1988).

La prueba de tinción de Sabin-Feldman (Sabin and Feldman 1948) DT por sus siglas en inglés (Dye Test), es considerada como la prueba de oro para diagnosticar toxoplasmosis en humanos (Dubey and Beattie 1988) aunque en la actualidad es poco usada (Robert-Gangneux and Darde 2012). El procedimiento se basa en que si el suero a probar posee anticuerpos anti-*T.gondii*, al ser incubado a 37°C por una hora con taquizoítos en presencia de complemento, los anticuerpos promoverán la lisis del citoplasma del parásito, por lo que al agregar un colorante (azul de metileno), es posible diferenciar mediante microscopia a los taquizoítos viables de los no viables (Frenkel and Jacobs 1958). Existen otros métodos como el IFA, siglas en inglés de “Indirect Fluorescent Antibody”, que utiliza anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo para detectar los anticuerpos anti-*T.gondii* en suero (Kelen et al. 1962). El MAT acrónimo en inglés de “Modified Agglutination Test”, en donde el suero es tratado con β -mercaptoetanol para eliminar IgM y sustancias asociadas, con el fin de detectar solamente anticuerpos IgM (Fulton and Turk 1959; Desmonts and Remington 1980; Dubey and Desmonts 1987). El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas “ELISA” por su acrónimo en inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”, en el que un conjugado

de antígeno del parásito (Franco et al. 1981) o suero del hospedero (Naot and Remington 1980) es fijado en una superficie plástica y mediante un sistema de anticuerpos, enzimas primarias y secundarias detecta IgM por una reacción colorimétrica. En la actualidad, esta técnica es usada rutinariamente en laboratorios clínicos para detectar IgG e IgM en sueros humanos, aunque ha sido usada también para animales como borregos (Caballero-Ortega et al. 2008), perros (Zhuo et al. 2017), gatos (Sumner and Ackland 1999) y cerdos (Ichikawa-Seki et al. 2015). El resto de las técnicas es más usada en laboratorios de referencia e investigación (Robert-Gangneux and Darde 2012).

4.6.2. DIAGNÓSTICO POR PCR

Esta metodología ha probado ser sencilla, sensible y reproducible, por lo que proporciona un método rápido y eficaz en la detección de DNA de *T. gondii* (Robert-Gangneux and Darde 2012; Su et al. 2010). Es posible aplicarlo en diversas muestras biológicas de animales y humanos como: orina (Fuentes et al. 1996), semen (Koch et al. 2016), distintos tejidos (Holliman et al. 1990, 1992; Owen et al. 1998; Dubey et al. 2008; Berger-Schoch et al. 2011; Belfort-Neto et al. 2007), humor vítreo (Montoya et al. 1999), fluido cerebroespinal (van de Ven et al. 1991) entre otros (Robert-Gangneux and Darde 2012; Su et al. 2010). Para incrementar la sensibilidad en el diagnóstico, se usan las variantes de PCR cuantitativo y PCR anidado con dos pares de iniciadores, en combinación con la amplificación de fragmentos de ADN cortos de regiones génicas unicopia y multicopia (Dubey and Beattie 1988). La región génica conocida como gen *B1* (Burg et al. 1989) y el elemento 529 (Homan et al. 2000), son dos de las más usadas debido a su naturaleza multicopia.

4.6.3. AISLAMIENTO EN RATÓN

El aislamiento de *T. gondii* suele estar enfocado a relacionar al parásito con alguna manifestación clínica o como el agente causante de muerte, aunque también se practica con muestras biológicas de hospederos sin sintomatología con el fin de determinar la distribución

geográfica o la frecuencia de una cepa. En combinación con pruebas de tipificación, el aislamiento es considerado como la metodología absoluta para describir una nueva cepa, sin embargo, algunos autores consideran que el utilizar ratones presenta sesgos potenciales debido a la resistencia que muestran los ratones ante algunas cepas. De acuerdo con Dubey y Beattie (1988), los modelos existentes para aislamiento de *T. gondii* son el ratón, el gato y el cultivo celular, y su elección depende de las características de la muestra biológica (fluidos corporales, tejidos, materia fecal), la vía de inoculación (intraperitoneal, subcutáneo y por la vía oral) y el estadio de *T. gondii* presente en la muestra. En el caso de los fluidos corporales como sangre o líquido cerebroespinal, la muestra se centrifuga y el sedimento de taquizoítos se inyecta de forma intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.) en ratones o se agrega a un cultivo celular. Con los tejidos, la elección de la técnica depende si es una infección aguda o crónica. Si se sospecha de una infección aguda, el tejido se rompe mecánicamente y se resuspende en solución salina (NaCl al 0.9 %) con o sin antibiótico, el sobrenadante se inyecta de forma i.p. o s.c. en ratón. Cuando se trata de tejidos de animales asintomáticos o en fase crónica en donde podrían estar formados los quistes tisulares, el tejido se rompe mecánicamente y se digiere con pepsina para liberar a los bradizoítos de los quistes tisulares, la inoculación de los bradizoítos se hace de forma s.c. en 5 a 10 ratones por muestra biológica. Con la materia fecal de los hospederos definitivos, la muestra puede procesarse mediante un protocolo de flotación estándar que use una solución con densidad mayor a 1.18, el sobrenadante se inocula por la vía oral en ratones. Los gatos suelen utilizarse cuando la carga parasitaria es baja, con lo que puede usarse una fracción mayor del tejido. Se han reportado aislamientos exitosos a partir de diversas muestras biológicas de humanos y animales domésticos y silvestres. La metodología más empleada es la descrita por Dubey (1998), y toma como base la resistencia del bradizoíto a la digestión por pepsina descrita por Jacobs *et al.* (1960).

4.7. TIPIFICACIÓN DE CEPAS Y AISLADOS DE *T. gondii*

Las primeras clasificaciones de *T. gondii* se basaron en la patogenicidad que las cepas mostraban en el ratón. Administrando un inóculo determinado, se evaluaba el tiempo de sobrevivencia y el porcentaje de mortalidad en los animales (Kaufman et al. 1958). Las cepas se clasificaban como virulentas si existía poco tiempo de sobrevivencia y una alta tasa de mortalidad, mientras que las clasificadas como no virulentas mostraban un efecto contrario. El desarrollo de técnicas de tipificación basadas en marcadores moleculares y su aplicación gradual en la toxoplasmosis, han llevado a una reclasificación continua de algunas de las cepas más representativas (Tabla 3), lo que ha sido un aspecto conflictivo en la comparación de los resultados (Su et al. 2012). Los primeros marcadores moleculares que se utilizaron para clasificar al parásito fueron las isoenzimas (Darde et al. 1988), aunque rápidamente cayeron en desuso y fueron rebasadas por los análisis de RFLP⁵ (Cristina et al. 1991) y en específico por los análisis mediante PCR-RFLP (Sibley and Boothroyd 1992). Las primeras conclusiones obtenidas con marcadores moleculares, fueron que *Toxoplasma* poseía poco polimorfismo genético (Sibley and Boothroyd 1992; Dardé et al. 1992) y que todas las cepas y aislados podían agruparse en tres linajes clonales (Howe and Sibley 1995). Estas conclusiones fueron basadas en los resultados de los análisis de 35 aislados con 15 isoenzimas (Dardé et al. 1992); 28 cepas analizadas por PCR-RFLP con tres loci (Sibley and Boothroyd 1992); y de 106 aislados, tipificados por PCR-RFLP con 6 loci (Howe and Sibley 1995).

5 RFLP.-Fragmentos de restricción de longitud variable. Por sus siglas en inglés "Restriction Fragment Length Polymorphism"

Tabla 3. Tipificación de *T. gondii* con distintas metodologías.

Cepa	País de origen	Zim*	Linaje / Genotipo	Genotipo ToxoDB #	Hap	Microsatélites														
						TUB2	W35	TqM-A	B18	B17	M33	MIV.1	MXL1	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83
CT1	E.E.U.U.	1	I	-	1	291	248	209	160	342	169	274	358	209	168	145	119	265	87	306
RH	E.E.U.U.	1	I	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Me49	E.E.U.U.	2	II	-	2	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	91	310
PRUGNIAUD	Francia	2	II	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTG	E.E.U.U.	-	III	-	3	289	242	205	160	336	165	278	356	215	190	147	111	269	89	312
VEG	E.E.U.U.	-	III	2	3	289	242	205	160	336	165	278	356	213	188	153	111	267	89	312
MAS	Francia	5	At	17	4	291	242	205	162	362	169	272	358	221	166	142	111	332	95	338
CASTELLS	Uruguay	7	At	15	4	287	242	207	158	358	169	274	356	239	164	138	109	283	87	324
RUB	Guyana Francesa	6	At	98	5	289	242	205	170	360	167	274	356	223	190	142	109	259	85	312
CAST	E.E.U.U.	-	At	28	7	291	242	205	158	342	167	276	356	211	168	147	119	279	87	306
TgCatBr5	Brasil	-	At	8	8	291	242	205	160	362	165	278	356	237	174	140	111	265	89	314
P89	E.E.U.U.	10	At	8	9	291	242	205	160	362	165	278	354	229	174	140	111	265	91	308
TgCatBr10	Brasil	-	At	21	9	291	242	207	160	360	165	278	356	229	174	140	105	263	91	314
VAND	Guyana Francesa	12	At	60	10	291	242	203	162	344	167	276	356	217	170	142	113	277	91	308
GUY-DOS	Guyana Francesa	-	At	97	10	291	242	205	162	342	165	278	356	231	166	153	111	265	91	344
TgCgCa01	Canada	-	III	66	11*	289	242	203	160	336	169	274	358	209	176	142	111	257	107	340
COUGAR	Canada	-	At	197	11	289	242	205	158	336	169	274	354	219	174	151	119	259	79	332
GPHT	Francia	1	At	-	6a	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	283	91	306
FOU	Francia	-	III	6	6a	291	248	205	160	364	165	274	356	209	192	140	115	263	97	304
TgCatBr9	Brasil	-	At	42	6b	291	242	205	160	362	165	278	354	227	174	140	111	269	89	308
BOF	Bélgica	-	At	-	6a	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	273	89	306
ARI	E.E.U.U.	-	II	5	12	289	242	209	158	336	169	274	362	215	170	147	131	295	89	316
RAY	E.E.U.U.	-	II	5	12	289	242	207	162	336	169	274	356	213	170	142	111	287	107	316
TgCkGh01	Ghana	-	-	137	13	289	242	207	160	336	169	274	356	227	190	142	111	269	103	310
TgCkBr186	Brasil	-	-	88	14	291	248	205	160	342	165	278	354	227	166	145	105			
GAB2-2007-GAL-DOM2 (TgA15004)	Gabon	-	-	203	14	291	248	205	160	342	165	278	354	237	166	142	105	263	89	306
TgCtCo05	Colombia	-	-	61	15	289	242	205	160	338	169	276	356	213	164	145	111	316	89	312
TgCkBr013	Brasil	-	At	63	15	291	242	207	164	342	169	272	356	229	172	142	105	320	81	310

Columna 3, Zimodemos basados en Dardé et al (1992). Columna 4, Linaje basado en Howe y Sibley (1995) o Su et al (2006). Columna 5, Genotipo basado en Su et al (2010). Columna 6, Haplogrupo basado en Khan et al (2007), Khan et al (2011) y Su et al (2012). Columnas 7-21, microsatélites basados en Ajzenberg et al (2010). Modificada de Ajzenberg et al (2010).

En años posteriores, la aplicación y uso de técnicas y marcadores moleculares con mayor capacidad resolutoria, como los microsatélites (secuencias cortas en tandem de 2-6 nucleótidos) que son muy polimórficos debido a las variaciones que presentan su longitud (Ajzenberg et al. 2002a; Blackston et al. 2001), o el análisis de intrones de genes constitutivos (Khan et al. 2007; Su et al. 2006), que se considera evolucionan con menor presión selectiva, han mostrado que existe una mayor diversidad genética (Ajzenberg et al. 2002b) y alélica (Khan et al. 2007) que la reportada durante los primeros estudios con

isoenzimas (Dardé et al. 1992) y RFLP (Sibley and Boothroyd 1992; Howe and Sibley 1995). De manera paralela a la tipificación multilocus, se ha utilizado también la tipificación basada en un solo locus, como el SAG2 (Howe et al. 1997), el GRA6 (Fazaeli et al. 2000) o el *B1* (Grigg and Boothroyd 2001). La tipificación con estos loci toma como ventaja el bajo polimorfismo entre los linajes clonales que se relacionan con manifestaciones clínicas en la toxoplasmosis humana (Howe and Sibley 1995), por lo que fueron diseñados inicialmente para identificar cepas virulentas en humanos (Howe et al. 1997; Fazaeli et al. 2000; Grigg and Boothroyd 2001). No obstante, se ha reportado que el marcador GRA6 y el B1 han sido de gran utilidad en la identificación de nuevas cepas (Miller et al. 2004) o realizar rastreos epidemiológicos de las ya conocidas (VanWormer et al. 2014).

4.8. FILOGEOGRAFÍA DE *T. gondii*.

Durante los primeros estudios de tipificación de *T. gondii*, un hallazgo frecuente fue la escasa diferenciación genética entre las cepas y aislados del parásito (Dardé et al. 1992; Howe and Sibley 1995). Esta ausencia de variabilidad genética, que concordaba con la definición de clona⁶ que Tibayrenc y Ayala habían propuesto en su publicación *Towards a Population Genetics of Microorganisms: The Clonal Theory of Parasitic Protozoa* (Tibayrenc and Ayala 1991), sirvió en parte para proponer que la población global de *T. gondii* era clonal (Tibayrenc 1993). Esta hipótesis perduró por varios años, ya que a pesar de usarse marcadores moleculares más resolutivos como los microsatélites (Ajzenberg et al. 2002a), el desequilibrio de ligamiento que se detectaba seguía siendo significativo, además de que la mayoría de las cepas seguían conformando tres grupos (Wendte et al. 2011). El primer grupo, representaba a las cepas conocidas genéricamente como “linajes/cepas” clonales, arquetípicas o tipo I, II y

6 Clona: Término acuñado por Tibayrenc y Ayala (1991) para designar, en una especie clonal, todos los aislados que aparentan ser genéticamente idénticos con base en un conjunto determinado de marcadores moleculares.

III, y representaban aproximadamente el 90% de las muestras; el segundo grupo son las cepas conocidas como “linajes/cepas” recombinantes, referidas así porque presentaban una combinación de alelos de las tres cepas clonales, y representaban aproximadamente el 5% de todas las cepas; y el tercero es el grupo de las cepas atípicas o exóticas, definidas así debido a que poseían alelos no encontrados en las cepas clonales, y porque representaban menos del 5% de las cepas existentes. Sin embargo, como ya ha sido discutido por otros (Lehmann et al. 2000, 2004, 2006; Wendte et al. 2011), la hipótesis sobre la clonalidad de las poblaciones de *T. gondii* fue basada en análisis con sesgos de muestreo y técnicos, ya que la mayoría de las cepas provenían de casos clínicos de toxoplasmosis en humanos o sus animales de compañía y habían sido aisladas principalmente en Francia, Estados Unidos y Brasil, por lo que existía una sobrerrepresentación de algunas cepas. Por otro lado, la diversidad genética era subestimada debido a limitaciones en la capacidad resolutive de las isoenzimas y los RFLP.

Las evidencias de que las poblaciones de *T. gondii* poseen una mayor diversidad genética de la que se estimaba, comenzaron a obtenerse por los estudios que analizaron secuencias de intrones de genes constitutivos y de virulencia en estudios poblacionales (Khan et al. 2007; Lehmann et al. 2000; Su et al. 2012) y que incluyeron cepas aisladas de hospederos sin sintomatología (Lehmann et al. 2004), fauna silvestre (Khan et al. 2011) y de zonas geográficas no muestreadas (Bertranpetit et al. 2017; Lehmann et al. 2006), logrando capturar una mejor representación de la estructura de la población global de *T. gondii*. Analizados por separado, algunos de estos estudios reportan resultados diferentes, como el de la estimación del ancestro en común más cercano (MRCA por sus siglas en inglés, *Most Recent Common Ancestor*) sin embargo, analizados en conjunto proponen los posibles procesos evolutivos que causaron la diversidad genética actual, así como la distribución y prevalencia de las variantes genéticas del parásito.

En un estudio reciente en el que se analizaron mediante análisis por secuenciación, 168 cepas agrupadas en 13 poblaciones en el mundo, Bertranpetit et al (2017) estimaron que el ancestro en común más cercano de las cepas actuales de *T. gondii* se originó hace aproximadamente 1.5 millones de años. Los autores (Bertranpetit et al. 2017) proponen que esta forma ancestral pudo haber migrado a Sudamérica a través de sus hospederos durante el Gran Intercambio Biológico Americano (GABI) (Webb 2006), después de que el corredor terrestre panameño emergiera hace unos 2 o 3 millones de años (O'Brien et al. 2008). Este evento, que favoreció la expansión y diversificación de diversas especies de mamíferos en SA (Webb 2006), pudo haber favorecido también al *T. gondii* ancestral, permitiendo la acumulación de diversidad genética en las poblaciones sudamericanas (Bertranpetit et al. 2017).

Los reportes recientes indican que la diversidad genética en las poblaciones de *T. gondii* en Norteamérica (NA), Europa (Eu), África (Af) o Asia (As) es considerablemente menor que en SA, además de que en cada población predominan de manera diferente algunas cepas (Lehmann et al. 2006; Khan et al. 2007; Su et al. 2012; Bertranpetit et al. 2017). Por ejemplo, en NA se distribuyen principalmente dos haplogrupos⁷ que integran a las cepas tipo II, III (Khan et al. 2007) y uno que integra a las cepas X y A, consideradas como el cuarto linaje clonal (Khan et al. 2011). En Eu, Af y As, se distribuyen principalmente tres haplogrupos que conforman las cepas clonales tipo I, II y III (Khan et al. 2007; Su et al. 2012; Bertranpetit et al. 2017), de las cuales las cepas tipo II son las más frecuentes (Khan et al. 2007). Por el contrario, En SA existen una mayor cantidad de haplogrupos (incluyendo los de las cepas arquetípicas) sin que alguno presente una mayor prevalencia sobre el resto (Khan et al.

⁷ Haplogrupo. Aplicados en la tipificación de *T. gondii*, el haplogrupo representa un sistema de nomenclatura para referir a las cepas que comparten un conjunto de SNP's (polimorfismos de un solo nucleótido) en al menos cuatro loci que no se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

2007; Su et al. 2012; Lehmann et al. 2006). Esta estructura de la poblacional, ha llevado a proponer que la población mundial de *T. gondii* es el resultado de reducciones alélicas por efectos de la deriva génica y efecto fundador después de algunos eventos de migración, lo cual ha disminuido la diversidad genética entre las poblaciones en tanto se alejan de los centros de origen (Bertranpetit et al. 2017), modelo que ya ha sido probado en otros parásitos como *Plasmodium* (Tanabe et al. 2010). Por esta razón, tomando como base la distancia genética y geográfica entre las poblaciones, se ha propuesto que el centro de origen de *T. gondii* es alguna región de SA, debido a que presenta una mayor diversidad genética que NA u otra población en el mundo (Lehmann et al. 2006; Bertranpetit et al. 2017). Una explicación razonable sobre como pudo migrar *T. gondii* hacia NA, podría encontrarse en eventos ocurridos durante el pleistoceno tardío hace ~10,000 años (Culver et al. 2000; Su 2003; Morrison 2005). Algunos estudios sugieren que la divergencia de las cepas arquetípicas, fue hace ~10,000 años (Su 2003), tiempo en el cual sus poblaciones comenzaron su expansión (Morrison 2005). Por otro lado, mediante el análisis de polimorfismos genéticos del Cromosoma Y, DNA mitocondrial y microsatélites en 315 muestras de pumas (*Puma concolor*) de todo el continente Americano, Culver et al (2000) concluyeron que estos felinos repoblaron NA hace ~10,000 años, a partir de un grupo de individuos provenientes del Este de SA (actual Brasil). Los autores consideran que este evento migratorio pudo ser posterior a la extinción masiva ocurrida en NA durante el pleistoceno tardío, en el que desaparecieron el 80 % de los grandes vertebrados (Culver et al. 2000) y algunos mamíferos pequeños (MacConaill et al. 1968). El proceso de repoblamiento de Pumas en América, podría representar el mecanismo de migración por el cual los linajes clonales de *T. gondii* se expandieron en NA, ya que ambos eventos ocurrieron durante el mismo periodo y tienen como centro de origen una zona similar en SA (Culver et al. 2000; Morrison 2005; Su 2003). Adicionalmente, Lehmann et al (2006) proponen que un

segundo evento de migración mediado por el hombre pudo haber introducido *T. gondii* al Viejo Mundo. Los autores consideran que durante el tráfico marítimo en el siglo XVI, pudieron generarse focos hiperendémicos de la infección a bordo de los barcos por un ciclo constante entre gatos y roedores, por lo que al llegar a los puertos, las poblaciones del parásito pudieron expandirse al interior de los continentes mediante el gato doméstico (Lehmann et al. 2006). Como evidencia de su hipótesis, Lehmann et al (2006) señalan que en su estudio, en las poblaciones en las que se encontraban algunos de los puertos activos durante el siglo XVI, tanto la diversidad genética del parásito como la prevalencia de la infección en los hospederos, es mayor que en las regiones al interior del continente.

5. ANTECEDENTES

5.1. SEROEPIDEMIOLOGÍA DE LA TOXOPLASMOSIS EN MÉXICO

A pesar de que ya se conocían diversos aspectos sobre la toxoplasmosis humana en México, no es sino hasta los resultados de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 1987 (Velasco-Castrejón et al. 1992), que se observa de una forma más clara la relación de la prevalencia de la infección y algunos aspectos biogeográficos en nuestro país. En este estudio, Velasco-Castrejón et al (1992), analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta 29 272 sueros de una muestra representativa de la población mexicana. Tomando en consideración las características geográficas del territorio nacional, los autores dividieron las 32 entidades federativas en tres regiones. La región norte que se ubica al norte del Trópico de Cáncer (TC) y posee suelos más áridos y climas extremos; la región centro que se ubica al sur del TC, posee climas templados y carece de costas; y la región costera, también al sur del TC, posee costas y climas subtropicales (Velasco-Castrejón et al. 1992). La prevalencia de la infección a una dilución en suero de 1:128 fue de <10% en la región norte, del 10-20% en la región centro y del 20-60% en la región costera, en tanto que a una dilución de 1:16, los valores incrementaron hasta 10 puntos porcentuales en cada región. De acuerdo con los autores, estos resultados mostraron que en nuestro país las características bioclimáticas de las tres regiones se asociaban con la prevalencia de la infección, considerando que el clima árido del norte de México evitaba que los ooquistes esporularan y favorecían que posteriormente murieran, en tanto que en la región subtropical, la temperatura y humedad favorecían que los quistes esporularan más rápido y permanecieran viables por más tiempo (Velasco-Castrejón et al. 1992).

La actualización sobre la seroepidemiología de la toxoplasmosis humana en México fue basada en dos Encuestas Nacionales (Caballero-Ortega et al. 2012), la Encuesta Nacional de Salud del 2000 (ENS-2000) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006 (ENSN-

2006). Mediante un estudio retrospectivo, Caballero-Ortega et al (2012) analizaron 3599 sueros de la ENS-2000 y 2916 sueros de la ENSN-2006, con el fin de detectar anticuerpos IgG anti-*T.gondii* por ELISA en una muestra de la población con características similares a las de Velasco-Castrejón et al (1992). En el estudio, las tres regiones mostraron un incremento en la prevalencia global de la toxoplasmosis en el país, de 19.5-32.0% en 1987 a 60.1% en el 2000 y 62.6% para el 2006, mientras que en algunos estados de la región costera, como Colima, Veracruz y Oaxaca, la prevalencia de la infección incremento a >70 % (Figura 6). A pesar de que la comparación entre ambos estudios es complicada debido a que el diagnóstico se realizó con técnicas y tamaños de muestra diferentes, los resultados de las prevalencias por regiones son congruentes en ambos estudios, en donde las prevalencias más altas correspondieron a la zona costera (Velasco-Castrejón et al. 1992; Caballero-Ortega et al. 2012).

La seroepidemiología de la toxoplasmosis en poblaciones animales en México es casi desconocida si se compara con lo que se sabe para humanos, sin embargo se han analizado de manera aislada algunas subpoblaciones de especies domésticas o en cautiverio (Hernández-Cortazar et al. 2015). En conjunto, se han analizado 29 especies distintas de animales provenientes de los estados de Durango, Colima, Estado de México, Ciudad de México, Tamaulipas, Oaxaca, Yucatán, Puebla, Veracruz, Michoacán, Coahuila, Nuevo León, Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit y Quintana Roo (Figura 7).

Estos estudios muestran similitudes con las diferencias en las prevalencias entre las tres regiones geográficas descritas por Velásco-Castrejon (2012) en humanos. Por ejemplo, la prevalencia promedio de la infección en animales silvestres, domésticos, ferales o en cautiverio, independientemente de sus hábitos alimenticios, es de ~20% en la región norte , del ~31% en la región centro y ~48% en la región costera.

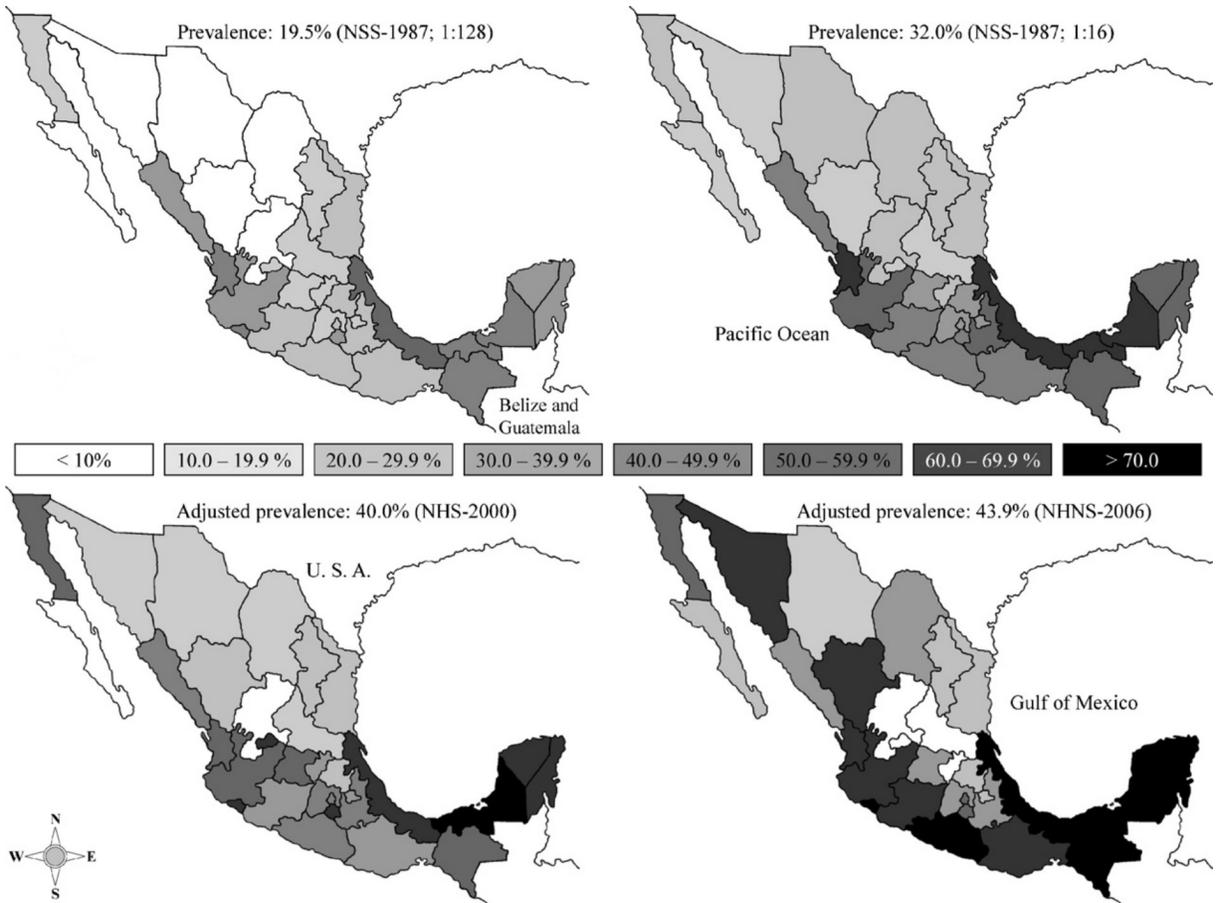


Figura 6. Mapas de México mostrando los rangos de la prevalencia por estado, de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 1987 (arriba), la Encuesta Nacional de Salud del 2000 (abajo a la izquierda) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006 (abajo a la derecha). El código de color por prevalencia se encuentra situado al centro de la imagen. Los mapas y el pie de figura fueron tomados y modificados de Caballero-Ortega et al (2012).



Figura 7. Mapa de México mostrando las entidades federativas en las que se han realizado estudios de serología en animales (Color gris). Los códigos de letras indican con la primer letra si el animal es un ave (A), mamífero carnívoro (C), mamífero omnívoro (O) o mamífero herbívoro (H), y con la segunda letra si son domésticos (d), fauna silvestre (s), ferales (f), en cautiverio (c) y * si son mamíferos marinos. Mapa basado en Hernández-Cortazar et al (2015).

Por otro lado si se analizan por separado, se puede observar que las prevalencias varían dependiendo del grupo filogenético o los hábitos alimenticios. En las aves, la prevalencia promedio es de ~9.8%, mientras que en los mamíferos es de ~38.7%, de los cuales el ~47.6% son carnívoros, el ~38.3% son omnívoros y el ~30.4% son herbívoros. (Hernández-Cortazar et al. 2015).

5.2. TIPIFICACIÓN DE AISLADOS Y CEPAS MEXICANAS DE *T. gondii*

En México existen algunos estudios de tipificación de las cepas de *T. gondii* en humanos y animales (Figura 8), para los cuales se han empleado estrategias de tipificación con un solo locus con los marcadores SAG2 (Dubey et al. 2004; Rico-Torres et al. 2012), SAG3 (Cedillo-Peláez et al. 2011; Rico-Torres et al. 2015) y BTUB (Rico-Torres et al. 2012), y estrategias de tipificación multilocus (Dubey et al. 2013; Rico-Torres et al. 2015; Dubey et al. 2009), usando metodologías ya reportadas (Su et al. 2010, 2006). A pesar de que estos estudios son aislados, nos permiten generar una idea sobre la diversidad de *T. gondii* en nuestro país. Por ejemplo en la región central de México, Dubey et al (2004) tipificaron 6 cepas aisladas de 208 gallinas de traspatio de localidades rurales del Estado de México y la Ciudad de México, mediante PCR-RFLP con el marcador SAG2 identificaron una cepa tipo I y 5 cepas tipo III. Años posteriores, cuatro de estos aislados fueron tipificados nuevamente como cepas tipo III por Dubey et al (2009), empleando una metodología de PCR-RFLP multilocus propuesta por Su et al (2006). En la misma región, Cedillo-Peláez et al (2011) identificaron por PCR-RFLP del marcador SAG3, cepas “tipo I” en pulmón e hígado de dos monos ardilla (*Saimiri sciureus*) que habían muerto previamente por toxoplasmosis. Aunque el origen de los monos es desconocido, los autores consideran pudieron haber adquirido la infección cerca de la Ciudad de México (Cedillo-Peláez et al. 2011). Por otro lado, el único reporte de tipificación en humanos ha sido realizado por Rico-Torres et al (2012). En el estudio los autores analizaron cuatro casos de toxoplasmosis congénita en la Ciudad de México, en el que analizaron por PCR-RFLP muestras tanto de la madre como del neonato. Mediante el marcador SAG3 identificaron cepas tipo I en dos neonatos y una madre, en tanto que con los marcadores SAG2 y BTUB identificaron cepas similares a la tipo I con alélos únicos, en las muestras de en una madre y un neonato no relacionados (Rico-Torres et al. 2012). En la

región norte del país, Dubey et al (2009) identificaron cuatro genotipos mediante análisis multilocus por PCR-RFLP, en 9 cepas aisladas de tres perros y cinco gatos de Durango, de acuerdo con los autores tres de los genotipos ya habían sido reportados, uno fue nuevo pero ninguno de los cuatro fueron clonales. También en Durango, Dubey et al (2013) identificaron un nuevo genotipo mediante tipificación multilocus empleando la estrategia propuesta por Su et al (2010), la cepa analizada fue aislada de un puma (*Felis concolor*) de vida libre que murió de toxoplasmosis aguda. Finalmente, Rico-Torres et al (2015) tipificaron por PCR-RFLP las muestras de dos gatos distintos de Colima, mediante el marcador SAG3 identificaron una cepa tipo III en la muestra de uno de los gatos, en tanto que con la estrategia multilocus de Su et al (2010) identificaron el genotipo #28 en una cepa aislada del otro gato. En conjunto estos reportes sugieren que en nuestro país se encuentran circulando cepas de los linajes clonales tipo I, II y III como cepas recombinantes y atípicas.

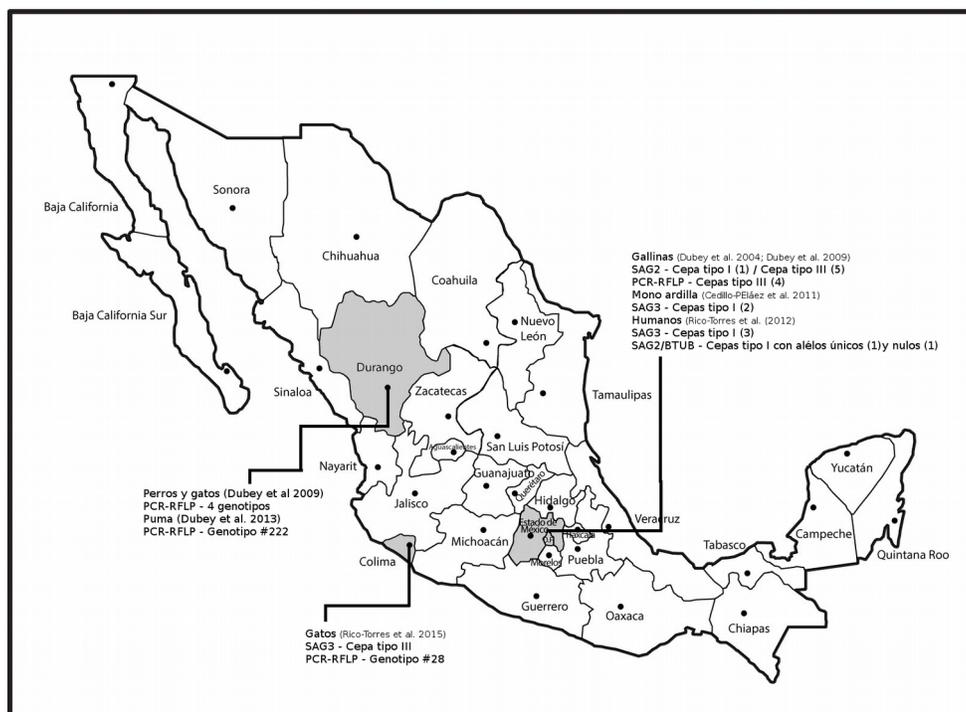


Figura 8. Estados de la República Mexicana en los que se han realizado tipificaciones de *Toxoplasma gondii* (Gris). En la imagen se especifican los hospederos de los que se obtuvieron las muestras, los marcadores y técnicas usados para tipificar y los resultados que se obtuvieron.

5.3. BIOGEOGRAFÍA DE MÉXICO

Desde el punto de vista de la biogeografía, México es un territorio extraordinario ya que representa una zona de transición (Figura 9) entre dos regiones biogeográficas⁸ (Morrone 2015). La Neártica, que está integrada por el norte, los altiplanos y las montañas que los rodean, y la Neotropical, integrada por las tierras bajas tropicales y la Península de Yucatán (Halffter et al. 2008). En la actualidad es posible identificar diferencias latitudinales y longitudinales debido a la interacción de estas regiones y la historia geológica de nuestro territorio. Uno de los principales contrastes latitudinales se plantea entre la mitad norte, hoy día semiárida y árida, y la mitad sur, hoy templado-húmeda y tropical, como resultado de los cambios ocurridos durante el Cuaternario en los patrones de circulación general de la atmósfera y de los océanos (Arroyo-Cabrera et al. 2008). Otro aspecto importante que permite diferenciar a las dos bioregiones Americanas en nuestro territorio, son los cambios geológicos que han ocurrido a lo largo del tiempo. En nuestro territorio, los actuales accidentes geográficos han sido el resultado de las interacciones tectónicas y magmáticas en los límites de placas que convergen en el entorno de México, y que ocurrieron desde finales del Cretácico hace ~80 millones de años, algunos de los ejemplos son la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, la Faja Volcánica Transmexicana (que sirve de conexión entre las dos anteriores), el Golfo y Península de California, entre otras (Arroyo-Cabrera et al. 2008). Adicionalmente, a partir de la formación del corredor terrestre panameño hace ~3.5 millones de años y el posterior intercambio biológico entre el Norte y el Sur del continente Americano, en nuestro país convergen dos grandes conjuntos bióticos muy distintos en su historia evolutiva (Arroyo-Cabrera et al. 2008; Halffter et al. 2008). La interacción de los elementos Septentrionales y Meridionales, fue contenido en parte por la orografía y climas de

⁸ Región Biogeográfica. Es una categoría jerárquica que refleja patrones de similitud biológica a escala global.

nuestro territorio, pero principalmente por la Faja Volcánica Transmexicana y el aislamiento del Altiplano Mexicano, dando como resultado que en la actualidad las partes altas estén ocupadas por linajes de afinidad septentrional, y las partes bajas por linajes de afinidad neotropical, en tanto que las zonas intermedias están ocupadas por biotas mixtas y una fuerte especiación *in situ* (Halffter et al. 2008).

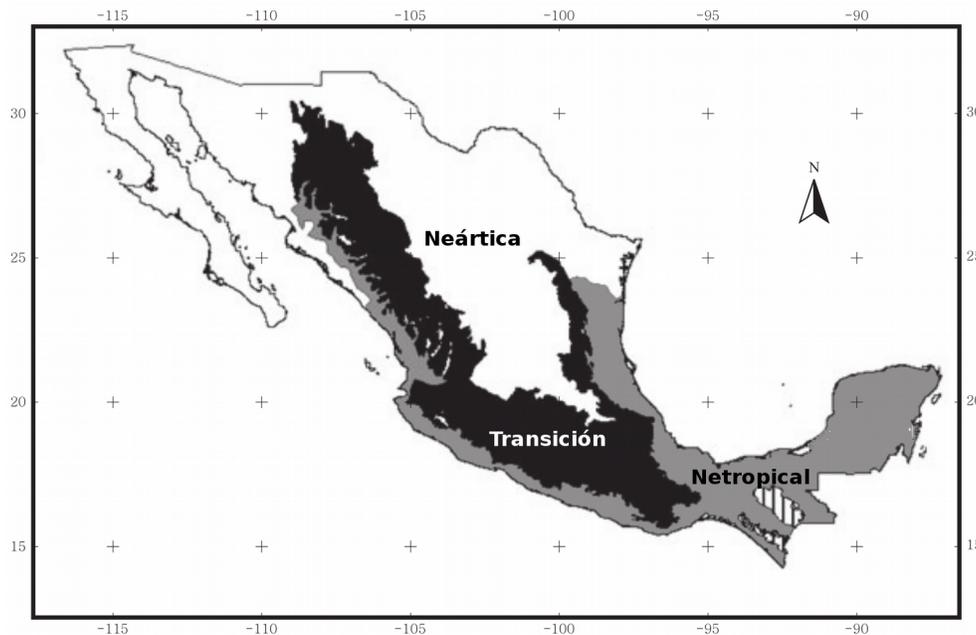


Figura 9. Regiones Neártica, Neotropical y la región de transición entre ellas en territorio Mexicano. Tomado de (Escalante et al. 2004)

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Tomando como base los reportes de seroprevalencia de la toxoplasmosis en México de Velasco-Castrejón et al (1992) y de Caballero-Ortega et al (2012), algunas regiones del país pueden considerarse hiperendémicas para la toxoplasmosis, ya que su prevalencia en humanos ha permanecido constante con cifras altas y afecta a todos los grupos de edad por igual. Un caso particular entre los focos hiperendémicos de la infección en México es Colima, ya que la prevalencia de la infección en humanos aumentó de 41.7% y 64.7% (a las diluciones de 1:128 y 1:16 consecutivamente) en la ENS-1987, al rango de 60% – 69.9% en la ENS-2000 y a >70% en la ENSN-2006, colocando a este estado entre los primeros lugares en todo el país (Velasco-Castrejón et al. 1992; Caballero-Ortega et al. 2012). Adicionalmente, existen reportes sobre la toxoplasmosis con relación a otros factores en esa región. Por ejemplo, Caballero-Ortega et al (2008) reportaron que en borregos la prevalencia se encontró estratificada con respecto a la altitud, ya que en ranchos situados a tres altitudes distintas, ~6 metros sobre el nivel del mar (msnm), 527 msnm y 1200 msnm, la prevalencia de la infección fue de 34.3 %, 28.1% y 12.2% consecutivamente. Con respecto a la infección en animales de zonas rurales y urbanas las prevalencias son similares, con valores de 29.1% en borregos de zonas rurales (Caballero-Ortega et al. 2008) y 28.8% en gatos de zonas urbanas (García-Márquez et al. 2007). Por otro lado la cepa aislada recientemente de un gato, fue identificada como el genotipo ToxoDB #28 (Rico-Torres et al. 2015), el cual ha sido reportado ya para cepas en gallinas y gatos en Sudamérica y en un paciente con SIDA en los Estados Unidos (Su et al. 2012). En estos estudios, la altitud, la edad de los hospederos, el tipo de alimentación y la presencia en gatos se identificaron como factores de riesgo para adquirir la infección (Caballero-Ortega et al. 2008; García-Márquez et al. 2007).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (“Resumen. Colima” 2017), Colima es el estado menos poblado en el país y el cuarto más pequeño en extensión. Se

encuentra delimitado al Sur por el Océano Pacífico y al Oeste, Norte y Este por relieves montañosos de la Sierra de Jalisco y el Volcán de Fuego, por lo que se encuentra en la región Neotropical en los límites entre esta y la Zona de Transición con la región Neártica. Aproximadamente, el 86 % de su territorio posee un clima cálido-subtropical entre las cotas de los 200 a los 2500 msnm y 12.5% tiene clima seco-semiseco entre la cota de cero a los 200 msnm. El 89% de su población se concentra en zonas urbanas en 5 de los 10 municipios del estado, por lo que la mitad de su territorio son zonas rurales.

Las características descritas en los dos párrafos anteriores, permiten plantear la interrogante sobre si la combinación de las características biogeográficas actuales de Colima y la interacción de los hospederos, permitirá identificar una estructura poblacional de *T. gondii* que muestre la transición de la diversidad genética de las poblaciones de este parásito entre las regiones Neártica y Neotropical. Para responder esta pregunta, se propuso analizar muestras de tejidos de borregos provenientes de ranchos ubicados en distintas regiones de Colima, siguiendo dos criterios. 1°) En los ranchos debía existir la presencia de gatos que transitaran libremente, lo cual puede favorecer el flujo de cepas entre distintas zonas geográficas (VanWormer et al. 2014). 2°) Los tejidos debían pertenecer a borregos criados en condiciones de semicautiverio con pastoreo abierto, ya que esta práctica de crianza en exteriores se relaciona con mayores tasas de la infección (Dubey 2009b). Estos dos puntos y el hecho de que los borregos son altamente susceptibles a la infección por ooquistes, permiten usar al borrego como organismo sentinela de la toxoplasmosis para obtener la mayor cantidad de cepas posible y realizar una mejor descripción de la variabilidad genética de *T. gondii*

La zona costera del Pacífico Mexicano, se encuentra cerca de la zona de transición entre las regiones Neárticas y Neotropicales. El analizar esta región en relación con la toxoplasmosis, favorece que el estudio de la variabilidad genética de *T. gondii* sea más representativo, ya

que se han descrito diferencias entre ambas regiones (Khan et al. 2007). Debido a que las zonas de transición entre las bioregiones no poseen límites bien definidos (Morrone 2015), la estructura de la población de *T. gondii* en esta zona mostrará la transición gradual entre la variabilidad genética del Neártico y el Neotropical. Adicionalmente, será posible identificar las variantes más frecuentes, lo que sentará las bases para estudios posteriores de asociación entre la toxoplasmosis en humanos y animales.

7. HIPÓTESIS

Si la variabilidad genética de *T. gondii* en América es mayor en regiones de alta endemicidad, especialmente en la ecozona Neotropical, en donde por sus características ecológicas, climáticas y de biomas, es posible relacionarla a un mayor número de eventos de recombinación en los hospederos definitivos; y al ser México una zona de transición entre las dos ecozonas americanas (Neártica y Neotropical); entonces es probable que en la región costera del Pacífico Mexicano se identifiquen diferentes haplotipos cosmopolitas y haplotipos autóctonos que favorezcan la endemicidad de esta parasitosis.

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GENERAL

Describir la diversidad genética y distribución filogeográfica de *T. gondii* en distintas poblaciones de borregos infectados de manera natural en una zona hiperendémica de la toxoplasmosis en una región costera del Pacífico Mexicano.

8.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener muestras de sangre y tejido de borregos de distintas zonas de la región costera del Pacífico Mexicano.
- Estandarizar un ensayo de PCR en punto final para *loci* específicos de *T. gondii*, cuya secuencia genética sea polimórfica
- Genotipificar las cepas de *T. gondii* mediante el análisis directo de los amplicones obtenidos sin realizar aislamiento en ratón.
- Determinar la diversidad genética de los haplotipos de *T. gondii* en las poblaciones analizadas.
- Plantear una hipótesis filogeográfica sobre la distribución de los haplotipos de *T. gondii* en las distintas poblaciones de borregos de una región costera del Pacífico Mexicano.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. MUESTREO

Durante marzo del 2013 a marzo del 2014, integrantes del Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Colima, obtuvieron muestras de suero y tejidos (diafragma, corazón y músculo esquelético) de borregos criados en semicautiverio, con pastoreo abierto y destinados para consumo humano. Las muestras fueron colectadas oportunamente en el rastro municipal del Estado de Colima, teniendo como base la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 que tiene como objetivo establecer los métodos de insensibilización y sacrificio de los animales domésticos y silvestres, con el propósito de disminuir su sufrimiento, evitando al máximo la tensión y el miedo durante este evento.

Los tejidos de cada borrego se lavaron con una solución al 1% de un desinfectante comercial (Virkon S, BAYER, México). Para evitar contaminación cruzada, los tejidos de cada borrego se colocaron en bolsas individuales (en las que se anotaron datos poblacionales que incluían la localidad y municipio de origen del animal, edad, sexo y raza) para su envío al Departamento de Ecología de Agentes Patógenos (DEAP) del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. El envío de las muestras se realizó por transporte aéreo desde la Ciudad de Colima a la Ciudad de México dentro de las primeras 24 horas posteriores a la colecta, conservando la cadena de frío durante el traslado y hasta su llegada al DEAP para su procesamiento.

9.2. CONCENTRACIÓN DE QUISTES TISULARES.

Considerando que los animales infectados de manera natural suelen poseer un bajo número de quistes (Robert-Gangneux and Darde 2012) y a que estos no presentan una distribución homogénea en los tejidos (Dubey 1998b), previo a la extracción de DNA, se implementó una técnica de concentración con el fin de obtener la mayor cantidad de quistes tisulares

presentes en una fracción de tejido. El protocolo implementado se basó en la técnica de flotación por gradiente de densidad que se utiliza comúnmente para aislar huevos, quistes y ooquistes de parásitos en materia fecal (Biagi, 2004) y por otro lado en el método de digestión con pepsina para el aislamiento e inoculación de bradizoítos de *T. gondii* en ratón a partir de tejidos infectados (Dubey, 1998b). El protocolo empleado se describe en el Anexo 1, brevemente: el tejido se homogeneizó y filtró a través de un tamiz metálico con apertura de malla de 180 μm (Newark wire cloth company, NJ, EEUU), se realizaron dos lavados con agua bidestilada previo a la separación de los quistes por diferencia de densidad usando una solución de sacarosa y su posterior lavado y precipitación de los quistes. Durante el procesamiento de las muestras para concentrar quistes tisulares, se eligieron muestras al azar para realizar preparaciones en fresco para corroborar la presencia de quistes tisulares o estadios intracelulares de *T. gondii*.

9.3. ANÁLISIS MOLECULARES

9.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del DNA se realizó con dos protocolos distintos. En el primer protocolo (Anexo 2), se empleó la pastilla que se obtenía en la técnica para concentrar quistes tisulares a partir de tejidos sin congelar. Esta pastilla se destinó para realizar la extracción de DNA con la técnica convencional de fenol-cloroformo (Green et al. 2012).

Con el segundo protocolo (Anexo3), se usaron los tejidos congelados a -20°C para realizar la extracción de DNA. Siguiendo el protocolo modificado de VanWormer *et al.* (2014) de un sistema comercial de extracción de DNA (QIAGEN, Alemania), se procesaron 6 fracciones de 250 mg de cada muestra.

9.3.2. INICIADORES.

Para las reacciones de PCR, se usaron iniciadores específicos de *T. gondii* ya descritos en la literatura (Khan et al. 2007; Grigg and Boothroyd 2001; Rico-Torres et al. 2012). Para detectar el DNA del parásito en las muestras, se utilizaron los iniciadores Tm-S 5'-CAGGAGTTGGATTTTGTAGA-3' y Tm-As 5'-CTGCTGGTGCGACGGGAGTG-3', que amplifican un fragmento de 362 pb del gen *B1* de *T. gondii* (Rico-Torres et al. 2012). Para la tipificación con el gen *B1*, se utilizaron los iniciadores Tm-S/As en combinación con los iniciadores externos Pml-S1 5'-TGTTCTGTCCTATCGCAACG-3', Pml-AS1 5'-ACGGATGCAGTTCCTTTCTG-3'; y los iniciadores internos Pml-S2 5'-CTTCCCAGACGTGGATTTC-3' y Pml-AS2 5'-CTCGACAATACGCTGCTTGA-3' que amplifican un fragmento de 531 pb del gen *B1* (Grigg and Boothroyd 2001). Esta combinación de iniciadores amplifican un fragmento de 803 pb.

Para la tipificación multilocus se usaron los iniciadores reportados por Khan et al (2007), y amplifican los fragmentos de 8 intrones de cinco genes *housekeeping* y tres regiones del apicoplasto (Tabla 4). Estos iniciadores permiten una identificación genética certera de *T. gondii* (Khan et al., 2007) ya que ha sido reportado que poseen la resolución adecuada para diferenciar y clasificar haplogrupos de este parásito, considerándose también como los iniciadores adecuados para estudios de variabilidad genética y filogeografía (Khan et al. 2007; Su et al. 2012).

Tabla 4. Iniciadores usados en este estudio

Haplogrupo	Locus	Intron	Ubicación	Posición	Long	Dirección	Primers de PCR	Primers de secuenciación
				(bp)	(bp)		Secuencia (5'-3')	Secuencia (5'-3')
Su et al., 2012	UPRT	Intron 1	Chr XI	2709316-2709781 €	467	Sentido	CCCGATATTCGACAAACGAC	CCCGATATTCGACAAACGAC
		Intron 7		2712832-2713290 €	459	Antisentido	GAGCCGTCTGCTTCATGAGC	GAGCCGTCTGCTTCATGAGC
	EF1	Intron 1	Chr XI	1601470-1600824 €	647	Sentido	TCTTGTTFGCTTTCCTCGGC	TGGTCGTCGCTACTGTTA
				1601470-1600824 €	647	Antisentido	CGGTCAGCGGCTGTCAAAA	GCAGCCTCACAATAAAACT
	HP	Intron 2	Chr IV	1622719-1623535 €	817	Sentido	AAATGCACCCTTTCTTAAA	AAATTGTCCCGCCATCAG
				1622719-1623535 €	817	Antisentido	CACATGAAGGTACACCAAAA	GATCAACATCAAGAGGTGGA
	MIC2	Intron 1	Chr VIIa	3760002-3759594 €	413	Sentido	GACAGAAACACGCAGAGAAT	ATAATA CAGTCA GTTCCTCGAT
				3760002-3759594 €	413	Antisentido	TAATCTTTGTTCCCATGCTT	TTTCTCACCTCAGTCTCTTG
	BTUB	Intron 1	Chr IX	974756-974323 €	465	Sentido	TTCCGCTCTGATGTTGCTTG	CITGCGGTATGTGGATGTGG
				974756-974323 €	465	Antisentido	GGGCAACACCAITAAAAGG	GTATTCTATGCTCCAGAC
BTUB	Intron 3	Chr IX	3757402-3757032 €	371	Sentido	GGTCTGTATGAAAACGAGAC	GAGAACAGTCCAAGAAAGAG	
			3757402-3757032 €	371	Antisentido	CTACTCCATCCACATATCAC	ATCACTATCGTCAATCCACGG	
BTUB	Intron 1	Chr IX	974756-974323 €	465	Sentido	AGGTCATCTCGGACGAAAC	GTTTCCCTGTGGAGAATC	
			974756-974323 €	465	Antisentido	TTCTCTCCAGCTGCAAGTCA	GCGAACAGGAGTGAAGTATT	
BTUB	Intron 2	Chr IX	973199-973059 €	141	Sentido	GCCATCCAGGAGATGTTCAA	GTGTGTCGACCAATTCACA	
			973199-973059 €	141	Antisentido	CTGCTGATATCGGACACCA	CTCGGTGAATCCATCTCGT	
Khan et al., 2007	AP1	-	Genoma del Apicoplasto	25197-25867 ¥	671	Sentido	AAAAATAACGCGAAAAGATTCA	CGTGCAAAAACATCATCAGA
	AP2	-		25844-26483 ¥	640	Antisentido	TGTGGAAGATATGGAATAAAGGA	GCAGAAAACGCTGATTTACCTT
	AP3	-		22385-22886 ¥	502	Sentido	TCCTTTATTTCCATATCTTCCACA	TTCCACATAATTTATCTCCAACGT
Khan et al., 2007	AP3	-	Genoma del Apicoplasto	22385-22886 ¥	502	Antisentido	AAAACCTTTAGTATGAAAACGGTGAA	TGGATATGATTTGAAGATGCTG
						Sentido	TTCCCTCTGTATGAAAAGTTCCG	TTTTGAACAAAAGTCTTCCAC
Khan et al., 2007	AP3	-	Genoma del Apicoplasto	22385-22886 ¥	502	Antisentido	TGTTATGGAGCAAGAAAAGGAA	CAAATGCTGGGTATTTAACACG
						Sentido	TTCCCTCTGTATGAAAAGTTCCG	TTTTGAACAAAAGTCTTCCAC
Haplotipo-B1	B1	-	Región de 2214 pb	128-707 £	531	Sentido	TGTTCTGTCTATCGCAACG	CTTCCCAGACGTGGATTTTC
						Antisentido	ACGGATGAGTTCCTTTCTG	CTCGACAATACGCTGCTTGA
Haplotipo-B1	B1	-	Región de 2214 pb	633-994 £	362	Sentido	CAGGAGTTGGATTTGTAGA	-
						Antisentido	CTGCTGGTGCCGACGGGAGTG	-

En Amarillo, el esquema MLST de 8 marcadores para tipificar haplogrupos, y las tres regiones del apicoplasto para determinar ancestrías (Khan et al. 2007). En Azul, el esquema MLST de 4 marcadores para identificar haplogrupos (Su et al., 2012). En morado, los iniciadores para detectar ADN de *T. gondii* con el gen *B1*. En gris, los iniciadores usados en este estudio para determinar haplotipos de *T. gondii* en una región de 803 pb del gen *B1*. €, Ubicación de la región en la que los iniciadores se alinean con respecto a los distintos cromosomas. ¥ Ubicación de la región en la que los iniciadores se alinean con respecto al genoma del Apicoplasto. £ Ubicación de la región en la que los iniciadores se alinean con respecto a la región de 2214 pb del gen *B1*.

9.3.3. ENSAYOS DE PCR Y SECUENCIACIÓN

Las condiciones de amplificación de cada par de iniciadores se corroboraron en el laboratorio utilizando DNA de las cepas de referencia RH y ME49, siguiendo las condiciones reportadas en la literatura (Grigg and Boothroyd, 2001; Khan *et al.*, 2007; Rico-Torres *et al.*, 2012). Debido a que se usaron PCR anidados y a que las muestras positivas serían secuenciadas, la amplificación se ajustó a 35 ciclos con los iniciadores externos y a 25 ciclos con los internos.

Los reactivos en las PCRs se calcularon para un volumen final de 100 μ l y se mantuvieron constantes para todos los marcadores de la siguiente forma: 1X de *amortiguador* de PCR (de acuerdo a lo recomendado por el proveedor: Promega), 1x de *buffer enhancer* con Betaína (PROMEGA, EEUU); BSA 0.4% (vol/vol); 1.5 mM de MgCl₂; 200 μ M de cada dNTP; 25 pmol de cada uno de los iniciadores y 3 U de Taq Hot Star-DNA polimerasa (Promega). Para la detección de DNA del parásito en la muestra, se usaron 150 ng de DNA; para la tipificación, se usaron 300 ng de DNA, y para la tipificación multilocus se usaron para cada marcador, 250 ng, 500 ng, 750 ng y 1 μ g de DNA.

Con el fin de identificar las muestras en las que se encontraran concentraciones adecuadas de DNA molde de *T. gondii*, se realizó un tamizaje con el PCR diagnóstico usando los iniciadores B1-INP (Rico-Torres *et al.* 2015). Las muestras positivas se destinaron a la tipificación con el análisis MLST (Khan *et al.*, 2007). Finalmente, como método alternativo se realizaron análisis por PCR con los iniciadores descritos por Grigg y Boothroyd (2001) para identificar los haplotipos de *T. gondii* basados en el gen *B1*.

Para obtener la concentración necesaria para secuenciar las muestras positivas, se usaron como templado 2 μ l de producto de PCR con los iniciadores internos en la reacción anidada, y se realizaron dos o tres reacciones de 100 μ l cada una para cada muestra. Los productos de PCR fueron purificados con el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN,

Alemania) y se secuenciaron en ambos sentidos por el servicio de secuenciación del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM).

9.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

9.4.1. EVALUACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS

Para evaluar la calidad de los cromatogramas y tener certidumbre durante el ensamblaje de la secuencia consenso a partir de los perfiles cromatográficos sentido y antisentido de cada muestra, se utilizó la paquetería Chromaseq versión 1.2 (Maddison and Maddison 2016a) incluida en el programa Mesquite versión 3.1 (Maddison and Maddison 2016b). Estos programas hacen uso del algoritmo *phred* (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) para analizar de manera individual la intensidad de los picos y asignar un valor de calidad a cada base nucleotídica identificada, y *phrap* (Gordon *et al.*, 1998) para realizar el ensamblado de la secuencia consenso tomando en cuenta dichos valores de calidad.

9.4.2. BÚSQUEDAS EN BASES DE DATOS PÚBLICAS Y ALINEAMIENTOS

Se realizaron búsquedas BLASTN (Johnson *et al.* 2008) usando como secuencia se consulta la secuencia completa del tándem del gen *B1* de la cepa RH con número de acceso GenBank: AF179871.1 (Burg *et al.* 1989), en la base de datos BLAST-wgs (Whole-Genome Shotgun Contigs) del NCBI, la cual alberga los proyectos de secuenciación del genoma de 16 cepas distintas de *T. gondii*. Los alineamientos de las secuencias se realizaron con el programa ClustalW versión 2.1 con los parámetros predeterminados (Larkin *et al.* 2007).

9.4.3. RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

La reconstrucción filogenética fue calculada con el programa MrBayes versión 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) para lo cual se fragmentaron los datos de secuencias en intrones y exones. El análisis se hizo con 10 millones de generaciones, la distribución de la probabilidad posterior y la frecuencia de diagnóstico fue evaluada cada 1000 y 100,000 generaciones respectivamente, el modelo de sustitución fue implementado durante el análisis mediante el

supuesto de saltos reversibles, los árboles calculados fueron resumidos con valor de “postburnin” del 50 % y modificados con el programa Figtree versión 1.4.2 (“FigTree,” n.d.).

9.4.4. ÁRBOL DE REDES E INDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA.

Se calcularon redes de haplotipos con el programa NETWORK versión 4.6.11, de acuerdo con las reglas de redes del algoritmo de *Median-Joining* (Bandelt et al. 1999). Se calcularon los índices de diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (Θ), flujo génico (Nm) y diferenciación genética (H_{ST}) usando el software DnaSP v5.10.01, implementando una prueba de permutación para determinar niveles de significancia (Librado and Rozas 2009). Los rangos usados para diferenciación genética fueron: 0 a 0.05, poca; 0.06 a 0.15, moderada; 0.16 a 0.25, elevada; y >0.26 una muy elevada diferenciación genética. Finalmente se calculó el índice de migración o flujo génico (Nm) que refiere al movimiento de los organismos entre las subpoblaciones, aquellos completamente diferenciados poseen un valor de $Nm < 1$, mientras que un valor de $Nm > 4$ se comporta como una unidad panmíctica independiente (Hartl and Clark 2007).

10. RESULTADOS

10.1. MUESTRAS OBTENIDAS

Durante un período de 12 meses se obtuvieron muestras de 305 borregos destinados para consumo humano en una zona costera del Pacífico Mexicano. Los animales provenían de 27 localidades ubicadas en los estados de Colima y Michoacán, México (Figura 10 Y Tabla 5). Tomando como referencia la proximidad entre las localidades y su distancia con respecto a la línea costera, las localidades fueron agrupadas en 6 zonas (Z1 a Z6) de la siguiente forma: Z1) Colima, ~2 km de la línea costera; Z2) Colima, ~14 km de la línea costera; Z3) Colima, ~13 km de la línea costera; Z4) Colima, ~54 km de la línea costera; Z5) Colima y Michoacán ~9,5 km de la línea costera y Z6) Colima cerca del límite con Michoacán ~29 km de la línea costera.

Del total de las muestras obtenidas, 275 provenían de las zonas 1, 2, 3 y 5; mientras que 30 provenían de las zonas 4 y 6. Con respecto al género, 64% (n=196) fueron machos, 33% (n=99) hembras y 3% (n=10) fetos en los que no fue posible determinar el sexo. Se establecieron cuatro grupos de edad: 1) fetos, 6% (n=18); 2) <1 año, 68% (n=208); 3) 2 a 3 años, 15% (n=46) y 4) >4 años, 11% (n=33).

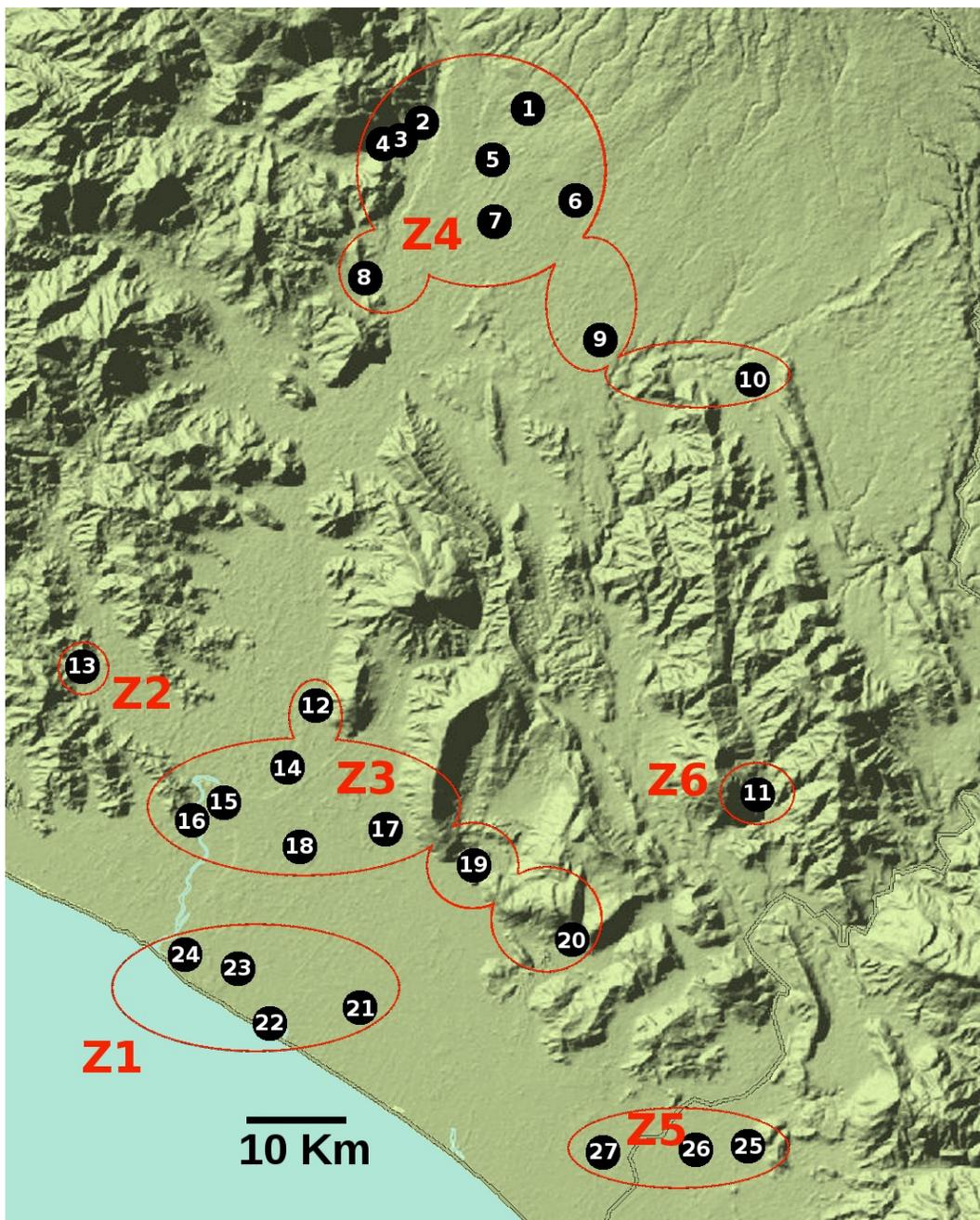


Figura 10. Mapa de las localidades de las que se obtuvieron muestras de borregos en la región de la costa del Pacífico Mexicano. Cada círculo negro representa una localidad distinta. Los números dentro de los círculos representan el código de cada localidad y corresponden con la Tabla 5. Las zonas (Z1 a Z6) delimitadas con una línea roja representan las zonas en las que se agruparon las localidades con respecto a la distancia entre ellas y con respecto a la línea de costa.

Tabla 5. Concentrado de datos poblacionales de los borregos muestreados en este estudio

No. Zona de muestreo	Localidad	No. de muestras	B1-Pos	Sexo		Grupos de edad			
				Machos	Hembras	Fetos	<1 año	1-3 año	>3 año
1	Comala	1	1	1	-	-	1	-	-
2	Trapichillos	1	1	1	-	-	1	-	-
3	El seis	2	2	2	-	-	1	-	-
4	Juluapan	15	15	12	3	-	6	1	8
5	Cerro de Ortega	36	33	29	7	-	33	-	3
6	Picachos	1	1	1	-	-	1	-	-
7	Espinal	1	1	1	-	-	-	1	-
8	Chical	1	1	1	-	-	1	-	-
9	Alpuyequé	2	2	-	2	-	-	2	-
10	Ticuisitan	1	1	1	-	-	1	-	-
11	Las Conchas	1	1	1	-	-	-	-	1
12	Calera	8	8	6	2	-	3	5	-
13	Coalatilla	29	26	20	9	-	23	5	1
14	Estación	19	19	6	13	-	11	5	3
15	Col Bayardo	6	4	2	4	-	3	2	1
16	Sta Rosa	30	30	5	25	3	10	9	8
17	San Miguel	10	10	10	-	-	-	10	-
18	Tecoman	12	12	6	6	-	7	5	-
19	Laguna Alenzahue	2	0	2	-	-	1	-	-
20	Chanchopa	2	2	2	-	-	1	1	-
21	Cerrito de Aguilar	10	10	10	-	-	10	-	-
22	Tecuanillo	18	18	16	2	-	16	2	-
23	El Real	9	9	9	-	-	7	1	1
24	Pascuales	10	8	2	8	3	-	7	-
25	Camalote	66	42	41	15	12*	32	17	5
26	Coahuayana	8	6	5	3	-	8	-	-
27	Cerro Grande	4	4	4	-	-	3	1	-

Columna 1, número de localidad. Columna 2 nombre de la localidad. Columna 3 número de muestras obtenidas en la localidad. Columna 4, número de muestras positivas al gen *B1* con los iniciadores de Rico-Torres et al (2012). Columna 5 y 6, sexo del borrego. Columna 7-10 grupos de edad. * En 10 fetos de la localidad Camalote no pudo determinarse el sexo.

10.2. ESTANDARIZACIÓN DE PCR

Durante los ensayos de estandarización de los PCRs para la tipificación que se basa en los loci propuestos por Khan *et al* (2007), se usaron como controles positivos muestras de DNA provenientes de cultivos de la cepa RH y de tejidos de roedores infectados experimentalmente con la cepa ME49, lográndose obtener los productos de amplificación ya reportados, con excepción de los fragmentos de los intrones 1 y 3 del locus MIC2, en donde la longitud fue del doble de la reportada (Figura 11). Al analizar las muestras de DNA obtenidas a partir de tejidos de borregos, no se obtuvieron conjuntos de amplicones completos de los *loci* que conforman el análisis MLST propuesto por Khan *et al* (2007). Por esta razón, tomando como base el resultado de un PCR de tamizaje en donde se amplificó un fragmento del gen *B1* (Rico-Torres *et al.*, 2015), se implementaron estrategias enfocadas a obtener los productos de amplificación de los cuatro *loci* para el análisis MLST propuesto por Su *et al* (2012) el cual se basa en los mismos marcadores propuestos por Khan *et al* (2007). Las estrategias se basaron en la modificación de las condiciones de amplificación en el termociclador, las concentraciones de reactivos de la PCR (incluido el DNA), variantes de la PCR de punto final, uso de facilitadores para la PCR y sistemas comerciales de limpieza secundaria de DNA y finalmente nuevas extracciones de DNA de todos los tejidos, aplicando de manera individual y/o en combinación las estrategias anteriores (Figura 11). Sin embargo, solamente fue posible obtener los amplicones y secuencias de algunos marcadores y muestras, pero en todos los casos los resultados nunca fueron constantes, por lo que tampoco fue posible una tipificación parcial por alguno de los *loci* del MLST.

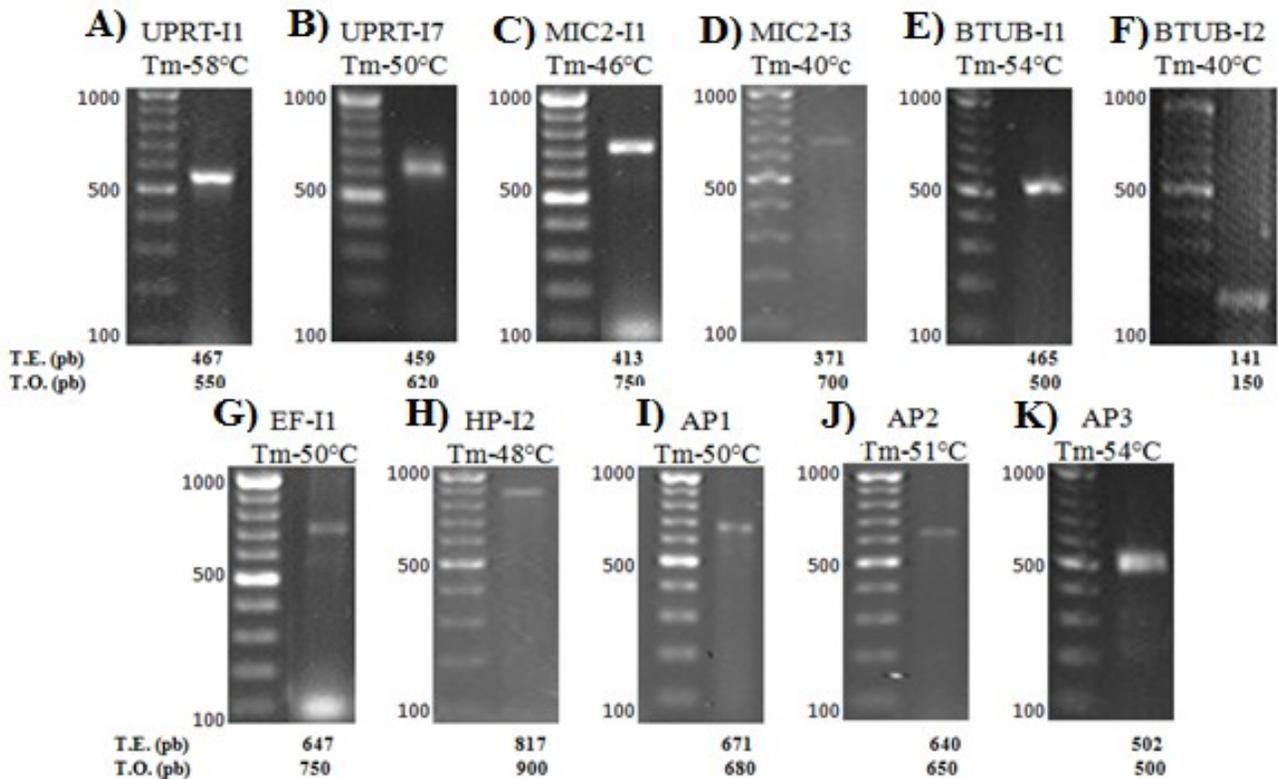


Figura 11. Geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio. Estandarizaciones de las condiciones de amplificación para los 11 marcadores de Khan *et al* (2007): A, *UPRT* intrón 1; B, *UPRT* intrón 7; C, *MIC2* intrón 1; D *MIC2* intrón 3; E, *BTUB* intrón 1; F, *BTUB* intrón 2; G, *EF1* intrón 1; H, *HP*-intrón 2; I, *AP1*; J, *AP2* y K, *AP3*. Debajo del nombre de cada marcador se muestra la temperatura de alineamiento utilizada. Debajo de la imagen de cada marcador se muestra la longitud en pares de bases esperada (T.E.) y obtenida (T.O.).

Alternativamente con las muestras de DNA obtenidas a partir de tejidos congelados, se realizaron las PCR para una región de 803 pb del gen *B1*. Se obtuvieron las secuencias de 23 muestras distintas de 9 localidades (Figura 12).

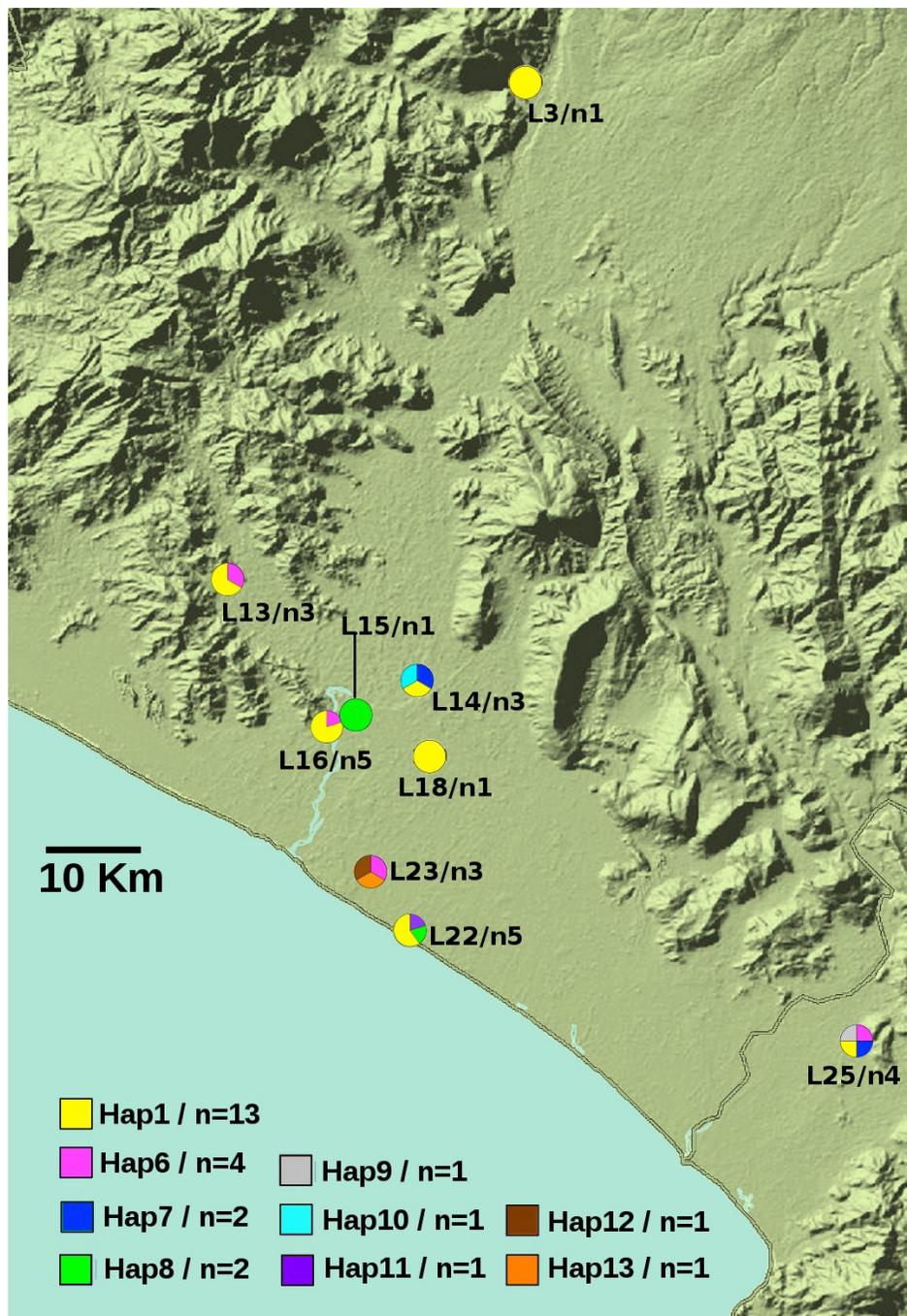


Figura 12. Mapa con las localidades en las que se obtuvieron secuencias para el fragmento de 803 pb del gen *B1*. En la parte baja de la imagen se muestra el código de color de los Haplotipos de *Toxoplasma gondii* en el gen *B1* y el número de secuencias que se obtuvieron para cada uno. Las gráficas de pastel indican las localidades (L) con secuencias y el número de muestras que se pudieron secuenciar (n).

10.3. EVALUACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS

Las secuencias consenso para cada uno de los amplicones se ensamblaron concatenando los cromatogramas sentido y anti-sentido de los dos fragmentos secuenciados para el gen *B1*. Los análisis con los algoritmos *phred* y *phrap*, incluidos en la paquetería Chromaseq del programa Mesquite, mostraron picos bien definidos sin ruido de fondo a lo largo de los cromatogramas de cada muestra, o no significativo cuando el ruido de fondo estaba presente. En la mayoría de las bases identificadas por el programa Mesquite/Chromaseq, los valores de calidad de *phred* (quality scores) mostraron valores superiores a 600; los valores para el ruido de fondo cuando estaba presente en algunas regiones eran menores a 100. En los cromatogramas de las muestras Estacion101 y Camalote102, en la posición 305 se observaron los nucleótidos C/t; mientras que en la muestra ElReal109, en la posición 754 se observaron los nucleótidos A/g. Una revisión puntual de los sitios en cuestión, permitió observar que los picos de los nucleótidos en esas posiciones mostraban valores altos de *phred* y no se observó ruido de fondo. Todas las muestras se secuenciaron por duplicado, con excepción de las muestras con Estacion101, Camalote102 y ElReal109 que se secuenciaron por triplicado usando Taq DNA polimerasa de alta fidelidad; sin embargo, en estas tres muestras se continuaron observando los mismos patrones con los nucleótidos no resueltos, por lo cual se generaron dos versiones de la secuencia para cada muestra (secuencias “a” y “b”).

Usando como secuencia de consulta la región completa de 2214 del gen *B1* reportada para *T. gondii* (Burg et al. 1989), se encontraron secuencias homólogas (Tabla 6) con cobertura del 100% en un solo *contig* para las cepas FOU, COUG, VAND, p89, TgCatPRC2, TgCatBr5, TgCatBr9, MAS, ME49, VEG y RUB [GenBank: AEYH02003113.1, AGQR01003377.1, AEYJ02001392.1, AEYI02002629.1, AHZP01002751.1, AFPV01004535.1, AFHV01003993.1, AEXC02003062.1, ABPA02000142.1, AAYL02000317.1, AFYV02002275.1]. Para las cepas

CtCo5 y ARI fueron necesarios dos *contigs* para ensamblar la secuencia completa [GenBank: AKIR01004496.1, AKIR01005079.1 y AGQS01004638.1, AGQS01001174.1, respectivamente]. En el caso de la cepa ARI, los primeros 13 nucleótidos no habían sido identificados. Para las cepas GT1, GAB2-2007-GAL-DOM2 y CAST no se encontraron *contigs* que presentaran cobertura total en la región de interés.

Tabla6. Información detallada de las secuencias encontradas en los proyectos de secuenciación de 16 cepas de *Toxoplasma gondii*.

Cepa	Base de datos	Número identificador GB	Número identificador GI	Rango en el Contig (nucleótidos)	Longitud de la secuencia (nucleótidos)	Cobertura de la secuencia (nucleótidos)	Orientación	Haplogrupo	Secuencias con el fragmento de 803 bp	Fecha de acceso	
RH	Nucleotide	AF179871.1 *	-	-	2214	-	-	1	X	10/16/15	
ME49	WGS	ABPA02000192.1	392295505	918-3127	2213	1-2213	Plus	2	X#	10/16/15	
		ABPA02000142.1	392295555	19-2173	2155	58-2213	Minus		X#		
		ABPA02002210.1	392293487	1-849	849	198-1047	Plus		X#		
		ABPA02000192.1	392295505	1-916	916	1297-2213	Plus		-		
VEG	WGS	AAYL02000317.1	557732915	2198-3115	920	1-920	Plus	3	X	10/16/15	
				1-2197	2196	18-2214					
MAS	WGS	AEXC02002972.1	672559439	22-80	59	1-59	Minus	4	X	10/16/15	
		AEXC02003062.1	672558679	1-2033	2033	58-2090	Plus				
		AEXC02002225.1	672566884	30006-30128	123	2091-2213	Minus				
RUB	WGS	AFYV02006073.1	672280825	240-296	57	1-57	Minus	5	X	10/16/15	
		AFYV02002275.1	672294216	1-1918	1918	58-1975	Minus				
		AFYV02002274.1	672294218	83963-84200	237	1976-2213	Plus				
FOU	WGS	AEYH02003040.1	672256588	67232-67287	56	1-56	Plus	6	X	10/16/15	
		AEYH02003113.1	672256643	1-19084	1984	58-2041	Minus				
TgCATBr9	WGS	AFHV01003673.1	333357068	22-80	59	1-59	Minus	6	X	10/16/15	
		AFHV01003993.1	333356748	1-2143	2143	58-220	Plus				
CAST	WGS	AHIV01002532.1	381327169	1-481	481	1-481	Minus	7	-	10/16/15	
		AHIV01002533.1	381327167	384-1779	1396	819-2214	Minus				
TgCATBr5	WGS	AFPV01004236.1	344910951	22-80	59	1-59	Minus	8	X	10/16/15	
		AFPV01004535.1	344910652	1-2033	20133	58-2090	Minus				
		AFPV01004010.1	344911177	30048-30170	123	2091-2213	Minus				
p89	WGS	AEYI02005358.1	672241764	1-57	57	1-57	Minus	9	X	10/16/15	
		AEYI02002629.1	672250107	1-2013	2013	58-2070	Plus				
		AEYI02002390.1	672251504	71620-71762	143	2071-2213	Minus				
VAND	WGS	AEYJ02001393.1	672561362	22-80	59	1-59	Minus	10	X	10/16/15	
		AEYJ02001392.1	672561376	2-2047	2046	58-2105	Minus				
		AEYJ02001391.1	672561383	137919-138021	108	2106-2213	Minus				
COUG	WGS	AGQR01003377.1	448921350	1-248	248	1-248	Minus	11	-	10/16/15	
				269-2368	2100	115-2214					
ARI	WGS	AGQS02004274.1	1005156857	67352-67407	56	1-56	Plus	12	X\$	10/16/15	
		AGQS02001763.1	1005173271	1-529	529	184-712	Plus				
		AGQS02004275.1	1005156855	11-1615	1605	603-2207	Plus				
TgCatPRC2	WGS	AHZP02002270.1	1008946127	1-302	302	1-302	Minus	13	-	10/16/15	
CtCo5	WGS	AKIR01002201.1	395642274	1-45	45	1-45	Minus	15	X\$	10/16/15	
		AKIR01005079.1	395639396	10-364	355	171-525	Minus				
		AKIR01004496.1	395639979	1-625	625	449-1073	Plus				
		AKIR01005662.1	395638813	11-257	247	1115-1361	Plus				
		AKIR01002201.1	395642274	46-798	753	1462-2214	Minus				
GAB2-2007-GAL-DOM2	WGS	NO SE ENCONTRARON SECUENCIAS							14	-	10/16/15
GT1	WGS	NO SE ENCONTRARON SECUENCIAS							1	-	

* Secuencia usada para realizar las búsquedas. La clasificación de haplogrupo es acorde con Khan et al (2007, 2011) y Su et al (2012). # La secuencia consenso fue obtenida a partir de varios contigs. \$ Se necesitaron dos secuencias para obtener el fragmento de interés.

10.4. SITIOS VARIABLES

Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos se realizaron con los parámetros predeterminados en el programa ClustalW (Larkin et al. 2007) y no fue necesario realizar ediciones manuales. Los sitios polimórficos fueron posicionados e identificados tomando como base la secuencia de 2214 pb del gen *B1* reportada previamente (Burg et al. 1989) y la descripción de este gen como un marcador para identificar cepas virulentas tipo I, en los que se reportaron 10 sitios variables entre distintas cepas tipo I, II y III (Grigg and Boothroyd 2001).

Al comparar las secuencias del gen *B1* encontradas en la base de datos GenBank-wgs (whole genome shotgun sequences), se identificaron 26 sitios variables a lo largo de la región completa de 2214 pb. Estos sitios permitieron agrupar en 13 haplotipos todas las secuencias comparadas, con excepción de las secuencias de TgCatBr5 y MAS que mostraron 100% de identidad (Tabla 7).

Se identificaron los sitios variables de la región de 803 pb (Tabla 8) al comparar las 14 secuencias disponibles en bases de datos públicas y 26 secuencias de este estudio; se observaron 16 sitios variables que distinguían 13 haplotipos diferentes. Los haplotipos del 1 al 5 agruparon a las 14 secuencias disponibles en el GenBank, mientras que los haplotipos 6 al 13 fueron exclusivos de las secuencias que se obtuvieron a partir de 23 muestras de tejido de borrego (Figura 12). De los sitios variables reportados originalmente, solo se encontraron el 504 (G/c) y 754 (A/g) en las secuencias obtenidas a partir de tejidos de borrego del presente estudio (Grigg and Boothroyd, 2001).

Tabla 7. Tabla 7. Sitios variables en la secuencia de 2214 pb del gen B1 para las 15 cepas de *T. gondii*

Posición + Consenso *	29	37	57	94	114	413	504	688	690	754	1235	1247	1434	1586	1675	1860	1895	1941	1992	2071	2094	2149	2162	2164	2174	2204	Haplogrupo#
Cepa	G	T	C	A	A	C	G	C	G	A	G	T	G	T	C	A	C	G	T	C	C	G	C	G	G	C	
RH	.	.	.	t	g	g	.	.	c	.	.	.	a	.	a	.	1
ME49	g	.	c	c	a	c	t	.	t	2
VEG	g	.	c	c	.	c	.	.	t	.	.	t	3
MAS	c	c	g	.	.	a	c	t	t	4
RUB	a	a	c	.	t	5
FOU	c	c	g	t	g	6-
TgCATBr9	c	c	g	.	.	a	c	6b
CAST	.	.	.	t	a	.	a	.	7
TgCATBr5	c	c	g	.	.	a	c	t	t	8
p89	c	t	c	.	t	9
VAND	c	c	g	c	.	t	10
COUG	.	.	.	g	c	c	11
ARI	c	c	.	-	-	c	c	a	c	t	12
TgCatPRC2	.	.	.	g	.	c	c	a	c	t	13
CtCo5	.	.	-	-	-	g	.	.	-	a	.	a	.	15

Sitios variables en la secuencia de 2214 pb del gen B1 para las 15 cepas de *Toxoplasma gondii* disponibles en las bases de datos del NCBI. + Posición en el fragmento de 2214 pb. * Indica el nucleótido más frecuente entre las 15 cepas, los nucleótidos en minúscula indican el nucleótido menos frecuente. # Clasificación de haplogrupo de acuerdo con Khan et al (2007) y Su et al (2012). En la tabla, los puntos indican los nucleótidos idénticos al consenso, los guiones medios indican deleciones en la secuencia.

Tabla 8. Sitios variables de la región de 803 pb del gen B1 de *T. gondii*

Posición + Consenso *	172	173	305	401	413	504	671	679	688	690	698	747	754	789	840	843	Secuencias
	C	G	C	T	C	G	C	C	C	G	C	C	A	C	G	G	
Hap1	g	.	.	.	RH, CtCO5, FOU, StaRosa113, Estacion101-a, Camalote102-a, StaRosa103 StaRosa107, VAlvarez108, Juluapan110, StaRosa112, Coalatilla170, Tecuanillo174 Tecuanillo175, Tecuanillo 177, Coalatilla184
Hap2	c	ME49, VEG, ARI, TgCatPRC2
Hap3	COUG, VAND, p89
Hap4	a	MAS, TgCATBr5, TgCATBr9
Hap5	a	a	RUB
Hap6	t	g	.	.	.	Camalote104, ElReal109b, StaRosa114, Coalatilla173
Hap7	.	.	t	g	.	.	.	Camalote102b, Estacion101b
Hap8	t	g	.	.	.	Bayardo11, Tecuanillo178
Hap9	a	.	g	.	.	.	Camalote106
Hap10	.	.	.	c	g	.	.	.	Estacion98
Hap11	.	t	g	.	.	.	Tecuanillo179
Hap12	g	g	g	t	a	a	El Real111
Hap13	t	ElReal109-a

El asterisco indica los nucleótidos más frecuentes entre las secuencias de las 15 cepas de *T. gondii* y las muestras obtenidas en el presente estudio. + Los sitios polimórficos fueron ubicados con respecto a la región completa de 2214 pb. Las secuencias en negritas indican las cepas del proyecto de secuenciación de genoma de cepas de *T. gondii*.

10.5. ÁRBOL DE REDES

Los árboles de redes identificaron también los 13 haplotipos. Las agrupaciones observadas fueron las siguientes: Haplotipo1 (Hap1): cepas RH, FOU y CtCO5 y 13 secuencias del presente estudio; Haplotipo 2 (Hap2): cepas ME49, VEG, TgCatPRC2 y Ari; Haplotipo 3 (Hap3): cepas COUG, Vand y p89; Haplotipo 4 (Hap4): cepas MAS, TgCatBr5 y TgCatBr9; Haplotipo 5 (Hap5): cepa RUB; Haplotipo 6 (Hap6): 4 secuencias del presente estudio; Haplotipo 7 (Hap7) y Haplotipo 8 (Hap8) agrupan 2 secuencias cada uno, mientras que los Haplotipo 9 (Hap9) al 13 (Hap13) poseen una sola secuencia cada uno (Figura 13). Se encontró también que el Hap1 (el cual agrupa a cepas consideradas como virulentas), fue el

más frecuente en las secuencias de *T. gondii* obtenidas a partir de tejidos de borregos de este estudio.

10.6. RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

La inferencia bayesiana de la filogenia de la región de 803 pb del gen *B1*, corroboró los hallazgos del árbol de redes. En el árbol filogenético pudo observarse que 17 de las muestras se agruparon con secuencias que presentaban alelos tipo I de *T. gondii*, incluidos los haplotipos 9 al 13, identificados como haplotipos únicos por el árbol de redes. Las secuencias que conformaron los haplotipos 6, 7 y 8 en el árbol de redes, también fueron agrupadas como clados separados en la reconstrucción Bayesiana. Finalmente, la secuencia correspondiente al haplotipo 13 fue incluida en el cluster que agrupa a la mayoría de las cepas tipo I (Figura 14).

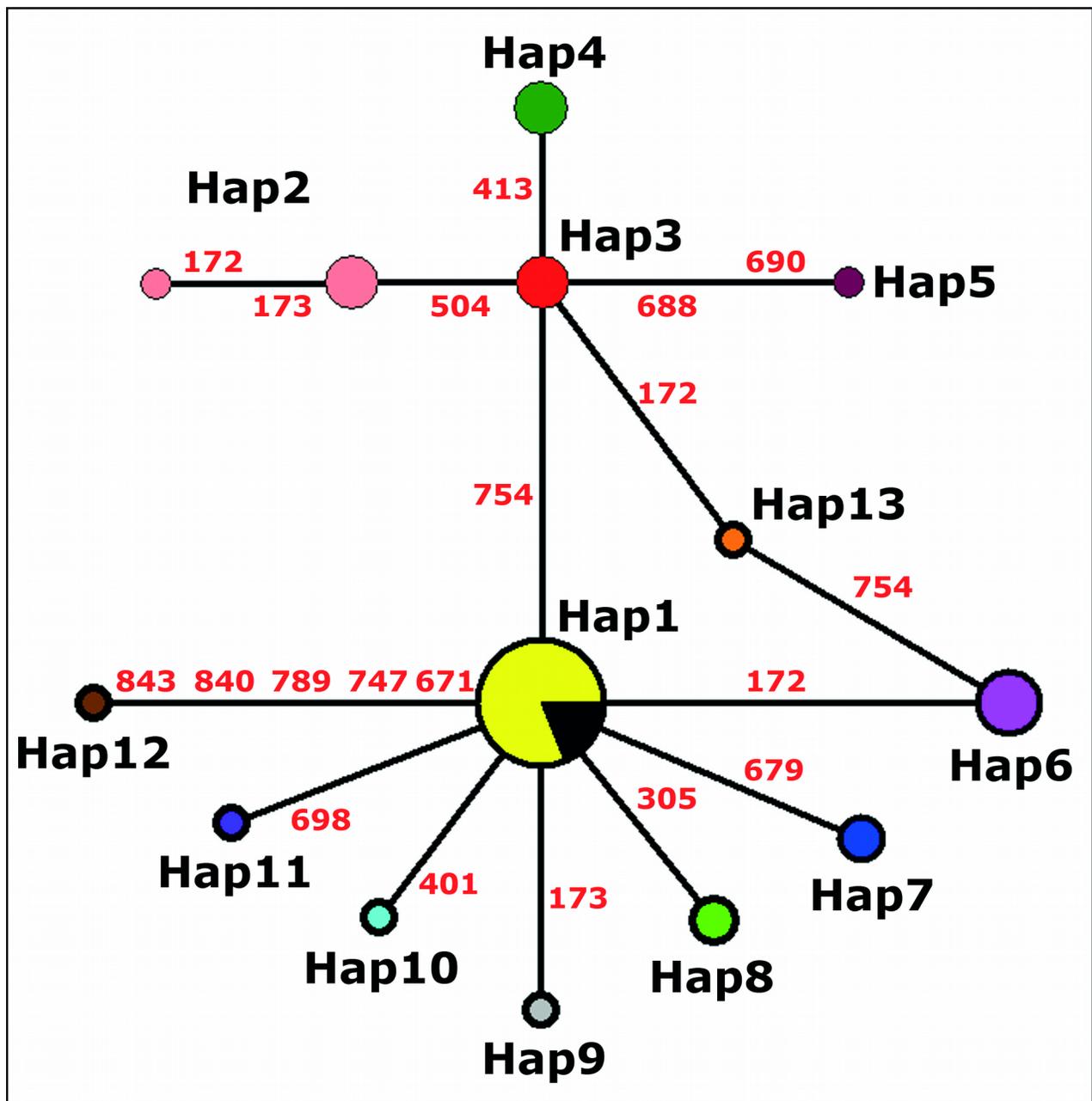


Figura 13. Árbol de redes de haplotipos. El árbol muestra que los haplotipos de las secuencias de *T. gondii* en borregos (Hap6-12) son muy cercanas a las cepas virulentas tipo I (Hap1). La fracción resaltada en color negro en el cluster Hap1, indica las muestras obtenidas en el presente estudio y que son idénticas a cepas tipo I. Los números en color rojo indican las posiciones de los polimorfismos entre cada Haplotipo y que concuerdan con la Tabla 8.

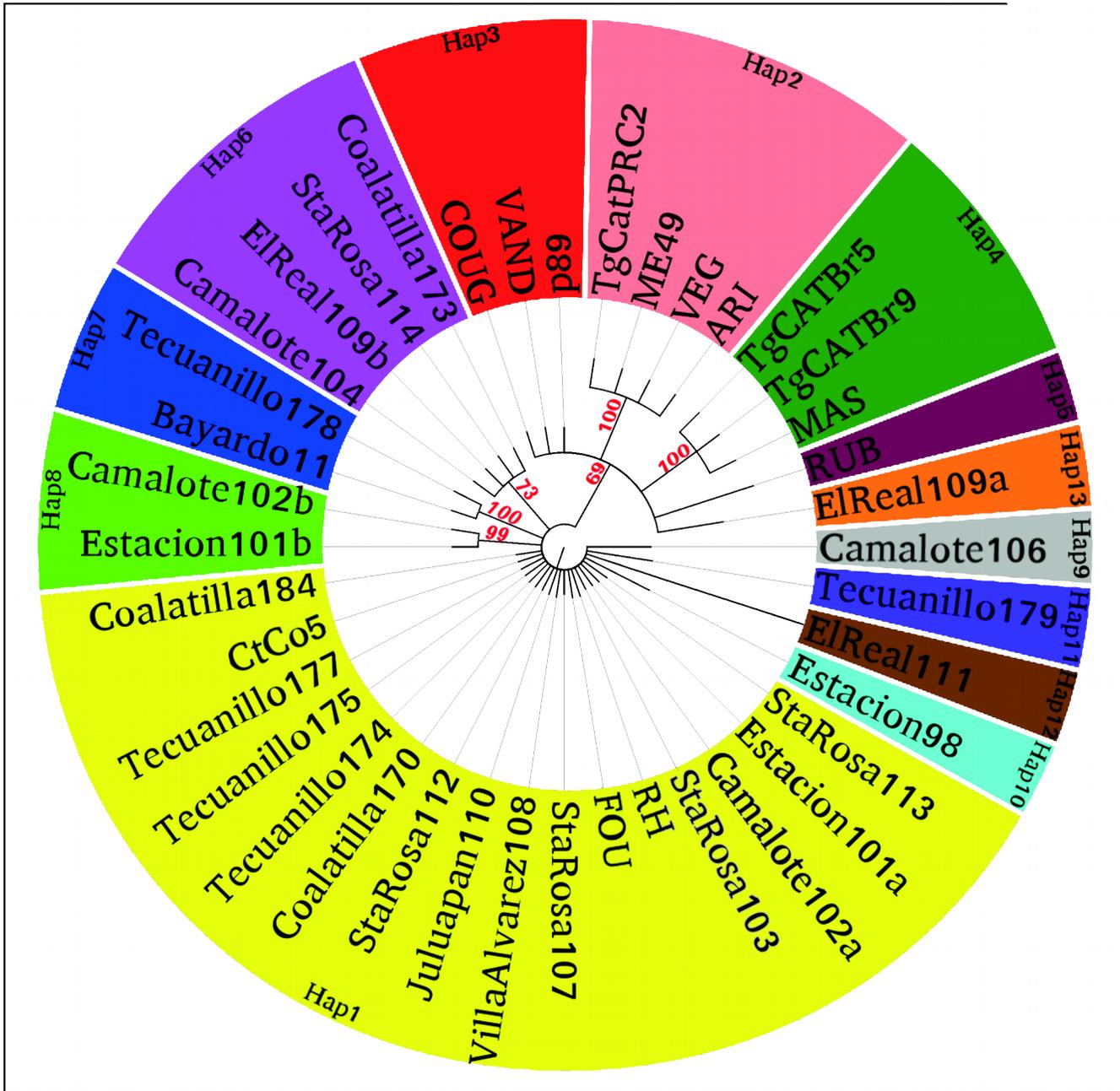


Figura 14. Reconstrucción filogenética de la región de 803 pb del gen *B1* con el método de Mr. Bayes. Los clusters muestran los haplotipos obtenidos a partir de las secuencias de este estudio y las de las 15 cepas de *T. gondii*. Los resultados refuerzan las agrupaciones obtenidas en el árbol de redes, y evidencia la diferencia de los haplotipos 6 al 8, del resto de las secuencias.

10.7. INDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Las comparaciones de todas las secuencias de este estudio con aquellas pertenecientes a Sudamérica (SA) o Norteamérica (NA), mostraron niveles bajos de diferenciación genética (Tabla 9): $H_{ST}=0.0398$ y $Nm=8.84$ ($p=0.0448$) para SA y $H_{ST}=0.0530$, $Nm=7.53$ ($p=0.0212$) para NA. A pesar de que los valores de diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (Θ) para nuestras secuencias ($\pi=0.0016\pm 0.0004$, $\Theta=0.0039\pm 0.0016$), Norteamérica ($\pi=0.0012\pm 0.0003$, $\Theta=0.0011\pm 0.0009$) y Sudamérica ($\pi=0.0021\pm 0.0007$, $\Theta=0.0020\pm 0.0015$) fueron similares, los datos de SA mostraron mayor variabilidad genética, seguido de la Región Costera del Pacífico Mexicano (RCPM) y NA respectivamente. Asimismo, se realizaron otras comparaciones (por ejemplo, entre localidades o entre las zonas de muestreo), sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos ni mostraron algún patrón.

Tabla 9. Índices de diversidad genética.

	Hst	Nm	p	π	Θ
RCPM vs NA	0.053	7.53	0.0212	-	-
RCPM vs SA	0.0398	8.84	0.0448	-	-
RCPM	-	-	-	0.0016±0.0004	0.0039±0.0016
NA	-	-	-	0.0012±0.0003	0.0011±0.0009
SA	-	-	-	0.0021±0.0007	0.0020±0.0015

Índices de diversidad genética entre las secuencias de la Región Costera del Pacífico Mexicano (RCPM), Norteamérica (NA) y Sudamérica (SA). Hst, diferenciación genética. Nm, Flujo genético. P, significancia estadística. π , diversidad nucleotídica. Θ , diversidad haplotípica.

11. DISCUSIÓN

La principal propuesta del presente estudio fue describir la variabilidad genética de *T. gondii* mediante análisis directos de DNA sin realizar ensayos de aislamiento en ratón (bioensayos), ya que este abordaje presenta sesgos potenciales a los objetivos del estudio, debido a que pueden favorecer la selección artificial de cepas y pueden resultar en reportes falsos de poblaciones clonales. La metodología para los bioensayos suele implementar primero un tamizaje para identificar a los animales seropositivos y centrar los esfuerzos en un número reducido de muestras; sin embargo, se han reportado aislamientos exitosos a partir de tejidos de individuos seronegativos (Araújo et al. 2010; Ruffolo et al. 2016). Adicionalmente, se ha descrito que los títulos de los anticuerpos anti-*T. gondii* permanecerán elevados si existe una exposición constante al parásito y se dejarán de detectar si no existe una re-exposición (Dubey 2009b). Esto refuerza el hecho de que el tamizaje por serología no garantiza el éxito del aislamiento, ya que no puede corroborar que la fracción de tejido contenga quistes tisulares.

Otro aspecto desfavorable de los bioensayos, es que pueden favorecer el aislamiento de algunas cepas sobre otras, ya que depende en gran medida de los rasgos de virulencia expresados por las cepas en el modelo murino (Dubey and Frenkel 1973). Por ejemplo, las cepas virulentas se diseminan rápidamente generando la muerte del ratón y evitando la formación de quistes tisulares; mientras que las cepas consideradas poco virulentas necesitan una dosis infectiva mayor que favorezca el establecimiento de la infección y la formación de quistes tisulares (Dubey and Frenkel, 1973). Estos antecedentes sugieren la probabilidad de que en nuestro estudio, los aislamientos no fueran exitosos o que incluso se anulara por completo la descripción de la diversidad genética de *T. gondii*, ya que en nuestro estudio con los iniciadores de Grigg y Boothroyd (2001) que amplifican una región de ~490 pb, todas las secuencias obtenidas correspondieron a cepas tipo I y no se encontró ninguna

cepa tipo II. Las reconstrucciones bayesianas y el árbol de redes, confirmaron la ausencia de cepas tipo II (poco virulentas en ratón).

A pesar de que el aislamiento en ratón permite obtener grandes cantidades del parásito para su posterior genotipificación, su aplicación para un gran número de muestras resulta poco viable. En el protocolo más usado, la metodología indica el uso de ~50 g de tejido para realizar ensayos de aislamiento en 5 a 10 ratones (Dubey, 1998b), lo que implica un costo elevado en material biológico y otros recursos. Por ejemplo, en un estudio en el que se analizaron muestras de tejido de 810 animales infectados de manera natural, se identificaron 99 animales seropositivos; los ensayos de aislamiento se realizaron en 36 muestras de individuos seropositivos y algunos seronegativos, el resultado final fueron 8 muestras (de animales seropositivos) en las que el aislamiento fue exitoso, ~1 % del tamaño de muestra. Los autores no detallan la razón por la que no analizaron las muestras de los 99 animales seropositivos, o el número de bioensayos con muestras de animales seronegativos, sin embargo, es probable que haya sido debido a los altos costos de la técnica cuando se realiza a gran escala (Dubey et al. 2009).

Uno de los principales problemas para estudios de diversidad genética de *T. gondii* en animales infectados de manera natural, es que suelen poseer una baja carga parasitaria y no presentan una distribución homogénea de los quistes tisulares en sus tejidos; esto representa una limitante muy fuerte debido a que la secuenciación sin aislamiento requiere grandes concentraciones de DNA parasitario para obtener resultados positivos, dependiendo del conjunto de marcadores y el número de copias de estos, cada *locus* puede necesitar entre 1 y 100 equivalentes genómicos para los marcadores multicopia y unicopia respectivamente (Lindström et al. 2008; Robert-Gangneux and Darde 2012; Sibley et al. 2009; Su et al. 2010).

Para reducir los efectos que conlleva analizar muestras de animales infectados de manera natural mediante análisis directos de DNA, en el presente estudio se implementó una técnica de concentración de quistes tisulares por flotación basada en la diferencia de densidades. El objetivo de esta técnica fue incrementar el número de estructuras parasitarias que serían usadas en las extracciones de DNA para disminuir la proporción de DNA genómico del hospedero e incrementar la del parásito en la muestra de DNA total y, por consiguiente, mejorar los resultados dependientes de la técnica de PCR. Sin embargo, tomando en cuenta que no se observó ningún quiste tisular o estadios intracelulares en las preparaciones en fresco y, los equivalentes genómicos necesarios para los análisis por MLST (unicopia) y *B1* (multicopia), los resultados sugieren que en la fracción de tejido analizado, la cantidad de estructuras parasitarias fue muy baja (Sibley *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010).

Estos resultados, además de estar influenciados por el número de copias de los *loci* utilizados, podrían sumarse también tres aspectos: 1) la edad de los animales muestreados; se ha descrito que la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en borregos incrementa considerablemente con la edad, siendo más alta en borregos adultos que en aquellos de un año de edad, resultado de múltiples infecciones a lo largo de su vida (Caballero-Ortega *et al.*, 2008; Clementino *et al.*, 2007; Dubey and Kirkbride, 1989); 2) la edad de los quistes tisulares; es sabido que los bradizoítos continúan dividiéndose una vez enquistados, por lo que se ha descrito que los quistes jóvenes miden usualmente 5 μm de diámetro y pueden contener solamente dos bradizoítos, mientras que los quistes más viejos pueden llegar a medir 100 μm de diámetro y contener decenas de bradizoítos (Dubey *et al.*, 1998) y 3) la distribución de los quistes tisulares; en nuestro estudio, el 68 % de las muestras provenían de animales de año de edad, por lo que de manera general es probable que la población muestreada haya tenido pocos o ningún evento de reinfección y que los quistes presentes en sus tejidos fueran de reciente formación y consiguientemente albergaran pocos bradizoítos.

Con base en los resultados de tipificación por análisis de MLST del presente estudio, y en revisiones que indican por un lado, que las poblaciones que no han sido previamente muestreadas requieren metodologías que permitan una primera descripción de la diversidad genética, y por otro lado, que las metodologías basadas en secuenciación sin aislamiento detectan una mayor diversidad genética, en comparación con otros métodos, se utilizó una metodología alternativa que permitiera alcanzar este fin. Por todo lo anterior, la genotipificación se realizó mediante la amplificación de un fragmento del gen *B1*, ya que ha sido comprobada su utilidad en la tipificación y correcta identificación genética de cepas de *T. gondii*, aspecto que se discutirá más adelante (Grigg and Boothroyd, 2001; Miller *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2008a; Miller *et al.*, 2008b; VanWormer *et al.*, 2014). En nuestro estudio, la secuenciación de un fragmento de ~800 pb del gen *B1* permitió identificar secuencias idénticas al haplotipo de la cepa de referencia RH (Hap1), además de secuencias con haplotipos diferentes (Hap6 al Hap13) a los de las secuencias de las cepas de referencia (Hap1 al Hap5) y que se encuentran disponibles en bases de datos públicos.

En el caso de los haplotipos nuevos, el Hap6 fue obtenido a partir del tejido de borregos que provenían de 4 hatos distintos, con ~48 km de distancia entre las localidades más lejanas y una distancia media de ~17 km entre las cuatro localidades. Este hallazgo podría indicar que nuestro Haplotipo 6 se trata de una cepa endémica con amplia distribución en la región costera del Pacífico Mexicano. Nuestros hallazgos son similares a los reportados por un grupo de investigación que estudia la toxoplasmosis en nutrias de la costa de California en Estados Unidos (Miller *et al.* 2004). Mediante la amplificación de una región del gen *B1*, Miller *et al.* (2004) logró identificar una nueva cepa que afectaba a nutrias marinas en la Costa de California, E.E.U.U. Esta cepa conocida actualmente como cepa X (Miller *et al.* 2008a) se identificó como una de las cepas del cuarto genotipo clonal de Norteamérica (Khan *et al.* 2011), y ha sido correctamente identificada mediante el gen *B1*, durante un rastreo

epidemiológico para determinar la fuente de infección hacia ambientes costeros (VanWormer et al. 2014).

Debido a la naturaleza multicopia del gen *B1* (Burg et al. 1989), y a que el número de copias en cada cepa es diferente (Costa and Bretagne 2012), los resultados deben interpretarse con precaución, ya que la secuenciación por sí sola no puede diferenciar entre los polimorfismos del gen y las coinfecciones. Lo anterior sugiere que el gen *B1* puede utilizarse para abordar una primera descripción en poblaciones o cepas de *T. gondii* no analizadas previamente, para después centrar los esfuerzos con metodologías con mayor capacidad resolutive y que faciliten la detección de coinfecciones (Costa and Bretagne 2012; Sibley et al. 2009; Su et al. 2010). El uso de este marcador como primer abordaje, puede permitir también determinar si en la población son frecuentes las cepas virulentas, ya que originalmente fue propuesto como un marcador para diferenciar entre cepas virulentas y no virulentas (Grigg and Boothroyd 2001). Este aspecto es importante, ya que debido a que la aplicabilidad de este marcador es sencilla, rápida y reproducible (Su et al. 2010), por lo que en un corto tiempo puede determinarse si una población está conformada por cepas virulentas sin necesidad de realizar aislamientos y pruebas en el modelo murino. Por otro lado, el determinar si una población es virulenta o no, puede servir como base para estudios que pretendan asociar las cepas con alguna sintomatología o fenómeno.

Con base en la división de regiones naturales que indican que en el territorio Mexicano convergen las ecozonas Neártica y Neotropical, con la existencia de una zona de transición entre ellas (Morrone 2015; Escalante 2009), las descripciones parciales de la diversidad genética de *T. gondii* en México (incluidos los resultados del presente estudio), muestran los patrones de distribución y prevalencia de cepas reportada para el continente americano. En las regiones Neárticas, las cepas que conforman al Hap2 se encuentran con una alta prevalencia, mientras que las del Hap1 presentan una baja prevalencia; por otro lado, en las

regiones Neotropicales se observa el efecto contrario, además de que existe una mayor diversidad de cepas (Khan *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2012). En nuestro estudio, no se obtuvo el Haplotipo 2, que corresponde a las cepas tipo II como la ME49, en cambio, se obtuvieron Haplotipos de cepas poco frecuentes en NA. Basado en los análisis de las secuencias, las cepas que se identificaron en el presente estudio corresponden al linaje tipo I. Estos resultados son complementarios a otros reportes en México en donde refieren la endemicidad de las cepas tipo I en regiones que corresponden a la ecozona Neotropical para nuestro país (Cedillo-Peláez *et al.*, 2011; Dubey *et al.*, 2004; Rico-Torres *et al.*, 2012). Por otro lado, en el norte de México en un estudio en el que se analizaron 9 cepas aisladas mediante PCR-RFLP se logró identificar que las cepas que generaban infecciones en esa región que corresponde a la ecozona Neártica, presentaron de manera independiente, en los 10 *loci* analizados, alelos tipo II y III (Dubey *et al.* 2009), que corresponden a las cepas que conforman al Haplotipo 2 en el presente estudio.

Estos resultados se refuerzan por los índices de diversidad genética π , Θ , H_{ST} y N_m que se obtuvieron al comparar las secuencias de nuestra población con los datos disponibles de las cepas provenientes de las 2 ecozonas, los cuales sugieren que existe una mayor similitud con las cepas del Neotrópico que con las del Neártico, ya que en el primero se observó una baja diferenciación y mediana variabilidad genética. Esto apoya la distribución de distintos fondos genéticos que podrían estar aislados por la alta fragmentación del territorio Mexicano, debida en parte a las cadenas montañosas presentes en gran parte del país y las cuales han servido como barrera física, favoreciendo el aislamiento de las poblaciones de manera natural. Por otro lado, nuestros datos sugieren la existencia de cepas clonales en borregos, sin embargo, este resultado podría estar influenciado por la baja variabilidad que posee el *locus*, ya que solamente ~1 % de la región completa de 2214 pb del gen *B1* es variable, cifra que se mantiene para el fragmento de 803 pb de este estudio y para el fragmento de ~ 500

pb que suele utilizarse para la tipificación de cepas virulentas de *T. gondii* (Grigg and Boothroyd, 2001).

Los estudios filogenéticos de *T. gondii* han incrementado progresivamente su complejidad, sin embargo, el conocimiento sobre la relación entre los polimorfismos genéticos y la epidemiología de este parásito sigue siendo limitado. Lo anterior resulta importante ya que de acuerdo con Wendte et al (2011), la toxoplasmosis podría ser considerada como una enfermedad infecciosa reemergente (EID) ya que infecta a una gran cantidad de hospederos, y las cepas que causan la infección se relacionan a algunas poblaciones de especies y rangos geográficos (Ciclos doméstico y Silvestre). Por esta razón, las propuestas enfocadas a mitigar la expansión geográfica de las infecciones, deben incluir aspectos como el conocimiento de la biodiversidad parasitaria, la estructura genética de sus poblaciones, su relación con los diferentes hospederos en términos de nichos ecológicos y los mecanismos mediante los cuales son transportados entre sus ciclos de transmisión, ya que son aspectos relevantes en la epidemiología de la infección, y pueden ser utilizados para su control (McIntyre et al. 2014; Merianos 2007; Grogan et al. 2014; Mackenzie 2011; Thompson and Lymbery 1995; Rodriguez-Prado et al. 2014; Chevillon et al. 2012; Tibayrenc 2012; Vourc'h et al. 2012; Murphy 1999; Elsheikha 2014; Patz et al. 2004; Hugh-Jones et al. 2000; Chomel 2008).

Los futuros estudios en el campo de la toxoplasmosis en México, además de incluir los aspectos científicos para realizar una descripción detallada de la estructura poblacional de este parásito, deberán contemplar si en las regiones a analizar existen tendencias de desarrollo económico sustentable en términos ambientales, mejoras en los sistemas productivos de alimentos, reducción de la perturbación de áreas naturales, etc. ya que podrían estar influenciado la expansión o contención de alguna cepa.

12. CONCLUSIONES

El uso del gen *B1* permitió identificar mediante análisis directos en DNA, haplotipos que podrían corresponder a cepas virulentas que no han sido reportadas previamente. Los análisis de las secuencias de este gen, revelaron que en una región costera del Pacífico Mexicano existen principalmente cepas con un fondo genético similar al de las cepas tipo I que está generando infecciones en borregos. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que la diversidad genética en la región analizada es más parecida a la del sur del continente, en donde existe una mayor variabilidad genética.

13. REFERENCIAS

- Achbarou, A., O. Mercereau-Puijalon, A. Sadak, B. Fortier, M. A. Leriche, D. Camus, and J. F. Dubremetz. 1991. "Differential Targeting of Dense Granule Proteins in the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma Gondii*." *Parasitology* 103 (3): 321. doi:10.1017/S0031182000059837.
- Ajzenberg, Daniel, Anne-Laure Bañuls, Michel Tibayrenc, and Marie Laure Dardé. 2002a. "Microsatellite Analysis of *Toxoplasma Gondii* Shows Considerable Polymorphism Structured into Two Main Clonal Groups." *International Journal for Parasitology* 32 (1): 27–38. doi:10.1016/S0020-7519(01)00301-0.
- Ajzenberg, Daniel, Nadine Cogné, Luc Paris, Marie-Hélène Bessières, Philippe Thulliez, Denis Filisetti, Hervé Pelloux, Pierre Marty, and Marie-Laure Dardé. 2002b. "Genotype of 86 *Toxoplasma Gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings." *The Journal of Infectious Diseases* 186 (5): 684–89. doi:10.1086/342663.
- Alexander, David L., Jeffrey Mital, Gary E. Ward, Peter Bradley, and John C. Boothroyd. 2005. "Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma Gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles." *PLoS Pathogens* 1 (2): e17. doi:10.1371/journal.ppat.0010017.
- Anderson-White, Brooke, Josh R. Beck, Chun-Ti Chen, Markus Meissner, Peter J. Bradley, and Marc-Jan Gubbels. 2012. "Cytoskeleton Assembly in *Toxoplasma Gondii* Cell Division." In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298:1–31. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123943095000018>.
- Araújo, Jacqueline B., Aristeu V. da Silva, Ronaldo C. Rosa, Rodrigo J. Mattei, Rodrigo C. da Silva, Virginia B. Richini-Pereira, and Helio Langoni. 2010. "Isolation and Multilocus Genotyping of *Toxoplasma Gondii* in Seronegative Rodents in Brazil." *Veterinary*

Parasitology 174 (3–4): 328–31. doi:10.1016/j.vetpar.2010.08.039.

Arroyo-Cabrales, Joaquín, Ana Luisa Carreño, Socorro Lozano-García, and Marisol Montellano-Ballesteros. 2008. “La Diversidad En El Pasado.” In *Capital Natural de México*, edited by Gloria Alencáster Ybarra, María del Carmen Perrillia, and Francisco Sour Tovar, Vol. I. Conocimiento actual de la biodiversidad:227–62. México: Conabio. <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol>

%20I/I02_Laperspectivab.pdf.

Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Rohlf. 1999. “Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies.” *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37–48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.

Barragan, Antonio, Fabien Brossier, and L. David Sibley. 2005. “Transepithelial Migration of *Toxoplasma Gondii* Involves an Interaction of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) with the Parasite Adhesin MIC2: Barrier Penetration by *Toxoplasma*.” *Cellular Microbiology* 7 (4): 561–68. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x.

Barragan, Antonio, and L. David Sibley. 2002. “Transepithelial Migration of *Toxoplasma Gondii* Is Linked to Parasite Motility and Virulence.” *The Journal of Experimental Medicine* 195 (12): 1625–33. doi:10.1084/jem.20020258.

———. 2003. “Migration of *Toxoplasma Gondii* across Biological Barriers.” *Trends in Microbiology* 11 (9): 426–30. doi:http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00205-1.

Beck, Josh R., Allan L. Chen, Elliot W. Kim, and Peter J. Bradley. 2014. “RON5 Is Critical for Organization and Function of the *Toxoplasma* Moving Junction Complex.” Edited by Michael J. Blackman. *PLoS Pathogens* 10 (3): e1004025. doi:10.1371/journal.ppat.1004025.

Belfort-Neto, Rubens, Veronique Nussenblatt, Luiz Rizzo, Cristina Muccioli, Claudio Silveira, Robert Nussenblatt, Assis Khan, L. David Sibley, and Rubens Belfort. 2007. “High

Prevalence of Unusual Genotypes of *Toxoplasma Gondii* Infection in Pork Meat Samples from Erechim, Southern Brazil.” *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* 79 (1): 111–14.

Berger-Schoch, A.E., D.C. Herrmann, G. Schares, N. Müller, D. Bernet, B. Gottstein, and C.F. Frey. 2011. “Prevalence and Genotypes of *Toxoplasma Gondii* in Feline Faeces (Oocysts) and Meat from Sheep, Cattle and Pigs in Switzerland.” *Veterinary Parasitology* 177 (3–4): 290–97. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.046.

Bertranpetit, Emilie, Thibaut Jombart, Emmanuel Paradis, Hilda Pena, Jitender Dubey, Chunlei Su, Aurélien Mercier, Sébastien Devillard, and Daniel Ajzenberg. 2017. “Phylogeography of *Toxoplasma Gondii* Points to a South American Origin.” *Infection, Genetics and Evolution* 48 (March): 150–55. doi:10.1016/j.meegid.2016.12.020.

Besteiro, Sébastien, Adeline Michelin, Joël Poncet, Jean-François Dubremetz, and Maryse Lebrun. 2009. “Export of a *Toxoplasma Gondii* Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion.” Edited by Vern B. Carruthers. *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000309. doi:10.1371/journal.ppat.1000309.

Biagi, Francisco. 2004. *Enfermedades Parasitarias*. 3a ed. México: Manual Moderno.

Black, Michael W., and John C. Boothroyd. 2000. “Lytic Cycle of *Toxoplasma Gondii*.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3): 607–23. doi:10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000.

Blackston, C. R., J. P. Dubey, E. Dotson, C. Su, P. Thulliez, D. Sibley, and T. Lehmann. 2001. “High-Resolution Typing of *Toxoplasma Gondii* Using Microsatellite Loci.” *Journal of Parasitology* 87 (6): 1472–75. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[1472:HRTOTG]2.0.CO;2.

Blader, Ira J., Bradley I. Coleman, Chun-Ti Chen, and Marc-Jan Gubbels. 2015. “Lytic Cycle of *Toxoplasma Gondii*: 15 Years Later.” *Annual Review of Microbiology* 69 (1): 463–85.

doi:10.1146/annurev-micro-091014-104100.

Bommer, W., H. H. Heunert, and B. Milthaler. 1969. "[Cinematographic studies on the movement of *Toxoplasma gondii*]." *Zeitschrift Fur Tropenmedizin Und Parasitologie* 20 (4): 450–58.

Boothroyd, John C., Adrian Hehl, Laura J. Knoll, and Ian D. Manger. 1998. "The Surface of *Toxoplasma*: More and Less." *International Journal for Parasitology* 28 (1): 3–9. doi:10.1016/S0020-7519(97)00182-3.

Bossi, Philippe, Luc Paris, Eric Caumes, Christine Katlama, Martin Danis, and François Bricaire. 2002. "Severe Acute Disseminated Toxoplasmosis Acquired by an Immunocompetent Patient in French Guiana." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 34 (4): 311–14. doi:10.1080/00365540110080124.

Burg, J L, C M Grover, P Pouletty, and J C Boothroyd. 1989. "Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma Gondii*, by Polymerase Chain Reaction." *Journal of Clinical Microbiology* 27 (8): 1787–92.

Caballero-Ortega, H., J. M. Palma, L. J. GarcíA-MáRquez, A. Gildo-CáRdenas, and D. Correa. 2008. "Frequency and Risk Factors for Toxoplasmosis in Ovines of Various Regions of the State of Colima, Mexico." *Parasitology* 135 (12): 1385. doi:10.1017/S0031182008004873.

Caballero-Ortega, Heriberto, Felipe Javier Uribe-Salas, Carlos J. Conde-Glez, Carlos Cedillo-Pelaez, José Antonio Vargas-Villavicencio, Héctor Luna-Pastén, Irma Cañedo-Solares, Luz Belinda Ortiz-Alegría, and Dolores Correa. 2012. "Seroprevalence and National Distribution of Human Toxoplasmosis in Mexico: Analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106 (11): 653–59. doi:10.1016/j.trstmh.2012.08.004.

Caldas, Lucio Ayres, Wanderley de Souza, and Márcia Attias. 2010. "Microscopic Analysis of

- Calcium Ionophore Activated Egress of *Toxoplasma Gondii* from the Host Cell.” *Veterinary Parasitology* 167 (1): 8–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.051.
- Carne, B., F. Bissuel, D. Ajzenberg, et al. 2002. “Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana.” *Journal of Clinical Microbiology* 40 (11): 4037–44. doi:10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002.
- Carne, Bernard, Magalie Demar, Daniel Ajzenberg, and Marie Laure Dardé. 2009. “Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma Gondii* , French Guiana.” *Emerging Infectious Diseases* 15 (4): 656–58. doi:10.3201/eid1504.081306.
- Carruthers, V. B., S. Hakansson, O. K. Giddings, and L. D. Sibley. 2000. “*Toxoplasma Gondii* Uses Sulfated Proteoglycans for Substrate and Host Cell Attachment.” *Infection and Immunity* 68 (7): 4005–11. doi:10.1128/IAI.68.7.4005-4011.2000.
- Carruthers, V. B., and L. D. Sibley. 1997. “Sequential Protein Secretion from Three Distinct Organelles of *Toxoplasma Gondii* Accompanies Invasion of Human Fibroblasts.” *European Journal of Cell Biology* 73 (2): 114–23.
- Cedillo-Peláez, Carlos, Claudia Patricia Rico-Torres, Carlos Gerardo Salas-Garrido, and Dolores Correa. 2011. “Acute Toxoplasmosis in Squirrel Monkeys (*Saimiri Sciureus*) in Mexico.” *Veterinary Parasitology* 180 (3–4): 368–71. doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.012.
- Channon, J. Y., R. M. Seguin, and L. H. Kasper. 2000. “Differential Infectivity and Division of *Toxoplasma Gondii* in Human Peripheral Blood Leukocytes.” *Infection and Immunity* 68 (8): 4822–26. doi:10.1128/IAI.68.8.4822-4826.2000.
- Chessa, Giovanna, Valentina Chisu, Rosaura Porcu, and Giovanna Masala. 2014. “Molecular Characterization of *Toxoplasma Gondii* Type II in Sheep Abortion in Sardinia, Italy.” *Parasite* 21: 6. doi:10.1051/parasite/2014007.
- Chevillon, Christine, Thierry de Meeûs, and Karen D. McCoy. 2012. “Population Genetics and Molecular Epidemiology of Infectious Diseases.” In *New Frontiers of Molecular*

Epidemiology of Infectious Diseases, edited by Serge Morand, François Beaudou, and Jacques Cabaret, 45–76. Dordrecht: Springer Netherlands. http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-2114-2_4.

Chomel, B. 2008. "Control and Prevention of Emerging Parasitic Zoonoses." *International Journal for Parasitology* 38 (11): 1211–17. doi:10.1016/j.ijpara.2008.05.001.

Clementino, M.M., M.F. Souza, and V.F. Andrade Neto. 2007. "Seroprevalence and Toxoplasma Gondii-IgG Avidity in Sheep from Lajes, Brazil." *Veterinary Parasitology* 146 (3–4): 199–203. doi:10.1016/j.vetpar.2007.02.036.

Coppens, Isabelle, Joe Dan Dunn, Julia D. Romano, Marc Pypaert, Hui Zhang, John C. Boothroyd, and Keith A. Joiner. 2006. "Toxoplasma Gondii Sequesters Lysosomes from Mammalian Hosts in the Vacuolar Space." *Cell* 125 (2): 261–74. doi:10.1016/j.cell.2006.01.056.

Costa, J.-M., and S. Bretagne. 2012. "Variation of B1 Gene and AF146527 Repeat Element Copy Numbers According to Toxoplasma Gondii Strains Assessed Using Real-Time Quantitative PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 50 (4): 1452–54. doi:10.1128/JCM.06514-11.

Courret, N. 2006. "CD11c- and CD11b-Expressing Mouse Leukocytes Transport Single Toxoplasma Gondii Tachyzoites to the Brain." *Blood* 107 (1): 309–16. doi:10.1182/blood-2005-02-0666.

Cowen, D. 1950a. "EXPERIMENTAL CONGENITAL TOXOPLASMOSIS: I. THE VAGINA AS A PORTAL OF ENTRY OF TOXOPLASMA IN THE MOUSE." *Journal of Experimental Medicine* 92 (5): 393–402. doi:10.1084/jem.92.5.393.

———. 1950b. "EXPERIMENTAL CONGENITAL TOXOPLASMOSIS: II. TRANSMISSION OF TOXOPLASMOSIS TO THE PLACENTA AND FETUS FOLLOWING VAGINAL INFECTION IN THE PREGNANT MOUSE." *Journal of Experimental Medicine* 92 (5):

403–16. doi:10.1084/jem.92.5.403.

———. 1950c. “EXPERIMENTAL CONGENITAL TOXOPLASMOSIS: III. TOXOPLASMOSIS IN THE OFFSPRING OF MICE INFECTED BY THE VAGINAL ROUTE. INCIDENCE AND MANIFESTATIONS OF THE DISEASE.” *Journal of Experimental Medicine* 92 (5): 417–29. doi:10.1084/jem.92.5.417.

Cowen, David, and Abner Wolf. 1951a. “Experimental Congenital Toxoplasmosis: IV. Genital and Secondary Lesions in the Mouse Infected with *Toxoplasma* by the Vaginal Route.” *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 10 (1): 1–15. doi:10.1097/00005072-195110010-00001.

———. 1951b. “Experimental Congenital Toxoplasmosis: V. Lesions in the Offspring of Mice Infected with *Toxoplasma* by the Vaginal Route. Observations on an Associated Hepatic Injury.” *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 10 (2): 142–57. doi:10.1097/00005072-195104000-00003.

Cristina, N., B. Oury, P. Ambroise-Thomas, and F. Santoro. 1991. “Restriction-Fragment-Length Polymorphisms among *Toxoplasma Gondii* Strains.” *Parasitology Research* 77 (3): 266–68. doi:10.1007/BF00930870.

Culver, M., W. E. Johnson, J. Pecon-Slattery, and S. J. O’Brien. 2000. “Genomic Ancestry of the American Puma (*Puma Concolor*).” *The Journal of Heredity* 91 (3): 186–97.

Dardé, M. L., B. Bouteille, M. Pestre-Alexandre, and M. L. Darde. 1992. “Isoenzyme Analysis of 35 *Toxoplasma Gondii* Isolates and the Biological and Epidemiological Implications.” *The Journal of Parasitology* 78 (5): 786. doi:10.2307/3283305.

Darde, M. L., M. Pestre-Alexandre, and B. Bouteille. 1988. “Isoenzymic Characterization of Seven Strains of *Toxoplasma Gondii* by Isoelectrofocusing in Polyacrylamide Gels.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39 (6): 551–58. doi:10.4269/ajtmh.1988.39.551.

- Desmonts, G., J. Couvreur, F. Alison, J. Baudelot, J. Gerbeaux, and M. Lelong. 1965. "[Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection]." *Revue Francaise D'etudes Cliniques Et Biologiques* 10 (9): 952–58.
- Desmonts, G, and J S Remington. 1980. "Direct Agglutination Test for Diagnosis of Toxoplasma Infection: Method for Increasing Sensitivity and Specificity." *Journal of Clinical Microbiology* 11 (6): 562–68.
- Dubey, J. P. 1968. "Isolation of *Toxoplasma Gondii* from the Feces of a Helminth Free Cat." *The Journal of Protozoology* 15 (4): 773–75. doi:10.1111/j.1550-7408.1968.tb02211.x.
- . 1996. "Pathogenicity and Infectivity of *Toxoplasma Gondii* Oocysts for Rats." *The Journal of Parasitology* 82 (6): 951. doi:10.2307/3284205.
- . 1997. "Tissue Cyst Tropism in *Toxoplasma Gondii*: A Comparison of Tissue Cyst Formation in Organs of Cats, and Rodents Fed Oocysts." *Parasitology* 115 (1): 15–20. doi:10.1017/S0031182097008949.
- Dubey, J. P., and C. P. Beattie. 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man / Authors, J.P. Dubey, C.P. Beattie*. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Dubey, J. P., and G. Desmonts. 1987. "Serological Responses of Equids Fed *Toxoplasma Gondii* Oocysts." *Equine Veterinary Journal* 19 (4): 337–39. doi:10.1111/j.2042-3306.1987.tb01426.x.
- Dubey, J. P., and J. K. Frenkel. 1972. "Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats*." *The Journal of Protozoology* 19 (1): 155–77. doi:10.1111/j.1550-7408.1972.tb03431.x.
- . 1973. "Experimental *Toxoplasma* Infection in Mice with Strains Producing Oocysts." *The Journal of Parasitology* 59 (3): 505. doi:10.2307/3278784.
- . 1976. "Feline Toxoplasmosis from Acutely Infected Mice and the Development of *Toxoplasma* Cysts*." *The Journal of Protozoology* 23 (4): 537–46. doi:10.1111/j.1550-

7408.1976.tb03836.x.

- Dubey, J. P., and C. A. Kirkbride. 1989. "Enzootic Toxoplasmosis in Sheep in North-Central United States." *The Journal of Parasitology* 75 (5): 673. doi:10.2307/3283047.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer. 1998. "Structures of *Toxoplasma Gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts." *Clinical Microbiology Reviews* 11 (2): 267–99.
- Dubey, J. P., J. K. Lunney, S. K. Shen, O. C. H. Kwok, D. A. Ashford, and P. Thulliez. 1996. "Infectivity of Low Numbers of *Toxoplasma Gondii* Oocysts to Pigs." *The Journal of Parasitology* 82 (3): 438. doi:10.2307/3284082.
- Dubey, J. P., Nancy L. Miller, and J. K. Frenkel. 1970. "THE TOXOPLASMA GONDII OOCYST FROM CAT FECES." *Journal of Experimental Medicine* 132 (4): 636–62. doi:10.1084/jem.132.4.636.
- Dubey, J. P., E. S. Morales, and T. Lehmann. 2004. "Isolation and Genotyping of *Toxoplasma Gondii* From Free-Ranging Chickens From Mexico." *Journal of Parasitology* 90 (2): 411–13. doi:10.1645/GE-194R.
- Dubey, J. P., C. A. Speer, S. K. Shen, O. C. H. Kwok, and J. A. Blixt. 1997. "Oocyst-Induced Murine Toxoplasmosis: Life Cycle, Pathogenicity, and Stage Conversion in Mice Fed *Toxoplasma Gondii* Oocysts." *The Journal of Parasitology* 83 (5): 870. doi:10.2307/3284282.
- Dubey, J. P., G. V. Velmurugan, C. Alvarado-Esquivel, D. Alvarado-Esquivel, S. Rodríguez-Peña, S. Martínez-García, A. González-Herrera, L. R. Ferreira, O. C. H. Kwok, and C. Su. 2009. "Isolation of *Toxoplasma Gondii* from Animals in Durango, Mexico." *Journal of Parasitology* 95 (2): 319–22. doi:10.1645/GE-1874.1.
- Dubey, J.P. 1998a. "Refinement of Pepsin Digestion Method for Isolation of *Toxoplasma Gondii* from Infected Tissues." *Veterinary Parasitology* 74 (1): 75–77.

doi:10.1016/S0304-4017(97)00135-0.

- Dubey, J.P. 1998b. "Advances in the Life Cycle of *Toxoplasma Gondii*." *International Journal for Parasitology* 28 (7): 1019–24. doi:10.1016/S0020-7519(98)00023-X.
- Dubey, J.P. 2009a. "History of the Discovery of the Life Cycle of *Toxoplasma Gondii*." *International Journal for Parasitology* 39 (8): 877–82. doi:10.1016/j.ijpara.2009.01.005.
- . 2009b. "Toxoplasmosis in sheep—The Last 20 Years." *Veterinary Parasitology* 163 (1–2): 1–14. doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.026.
- Dubey, J.P., C. Alvarado-Esquivel, V.H. Herrera-Valenzuela, J.J. Ortiz-Diaz, S. Oliveira, S.K. Verma, S. Choudhary, O.C.H. Kwok, and C. Su. 2013. "A New Atypical Genotype Mouse Virulent Strain of *Toxoplasma Gondii* Isolated from the Heart of a Wild Caught Puma (*Felis Concolor*) from Durango, Mexico." *Veterinary Parasitology* 197 (3–4): 674–77. doi:10.1016/j.vetpar.2013.06.005.
- Dubey, J.P., N. Sundar, D. Hill, G.V. Velmurugan, L.A. Bandini, O.C.H. Kwok, D. Majumdar, and C. Su. 2008. "High Prevalence and Abundant Atypical Genotypes of *Toxoplasma Gondii* Isolated from Lambs Destined for Human Consumption in the USA." *International Journal for Parasitology* 38 (8–9): 999–1006. doi:10.1016/j.ijpara.2007.11.012.
- Dunn, J.D., B. Butcher, E. Denkers, and J. Boothroyd. 2007. "Alterations in Host-Cell Biology due to *Toxoplasma Gondii*." In *Toxoplasma Gondii*, 317–40. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123695420500143>.
- Elsheikha, Hany M. 2014. "The Future of Parasitology: Challenges and Opportunities." *Frontiers in Veterinary Science* 1 (December). doi:10.3389/fvets.2014.00025.
- Endo, T., K.K. Sethi, and G. Piekarski. 1982. "Toxoplasma Gondii: Calcium Ionophore A23187-Mediated Exit of Trophozoites from Infected Murine Macrophages." *Experimental Parasitology* 53 (2): 179–88. doi:10.1016/0014-4894(82)90059-5.

- Escalante, Tania. 2009. "Un Ensayo Sobre Regionalización Biogeográfica." *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80 (2): 551–60.
- Escalante, Tania, Gerardo Rodríguez, and Juan J. Morrone. 2004. "The Diversification of Nearctic Mammals in the Mexican Transition Zone: NEARCTIC MEXICAN MAMMALS." *Biological Journal of the Linnean Society* 83 (3): 327–39. doi:10.1111/j.1095-8312.2004.00386.x.
- Ewing, Brent, and Phil Green. 1998. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. II. Error Probabilities." *Genome Research* 8 (3): 186–94. doi:10.1101/gr.8.3.186.
- Ewing, Brent, LaDeana Hillier, Michael C. Wendl, and Phil Green. 1998. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment." *Genome Research* 8 (3): 175–85. doi:10.1101/gr.8.3.175.
- Fazaeli, A., P.E. Carter, M.L. Darde, and T.H. Pennington. 2000. "Molecular Typing of *Toxoplasma Gondii* Strains by GRA6 Gene Sequence Analysis." *International Journal for Parasitology* 30 (5): 637–42. doi:10.1016/S0020-7519(00)00036-9.
- Ferguson, D. J., A. Birch-Andersen, J. C. Siim, and W. M. Hutchison. 1978. "Observations on the Ultrastructure of the Sporocyst and the Initiation of Sporozoite Formation in *Toxoplasma Gondii*." *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 86B (3): 165–67.
- . 1979a. "Ultrastructural Studies on the Sporulation of Oocysts of *Toxoplasma Gondii*. I. Development of the Zygote and Formation of the Sporoblasts." *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 87B (3): 171–81.
- . 1979b. "Ultrastructural Studies on the Sporulation of Oocysts of *Toxoplasma Gondii*. II. Formation of the Sporocyst and Structure of the Sporocyst Wall." *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 87B (3): 183–90.

- . 1979c. "Ultrastructural Studies on the Sporulation of Oocysts of *Toxoplasma Gondii*. III. Formation of the Sporozoites within the Sporocysts." *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 87 (4): 253–60.
- . 1979d. "An Ultrastructural Study on the Excystation of the Sporozoites of *Toxoplasma Gondii*." *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 87 (5): 277–83.
- Ferguson, D. J. P., and W. M. Hutchison. 1987a. "An Ultrastructural Study of the Early Development and Tissue Cyst Formation of *Toxoplasma Gondii* in the Brains of Mice." *Parasitology Research* 73 (6): 483–91. doi:10.1007/BF00535321.
- . 1987b. "The Host-Parasite Relationship of *Toxoplasma Gondii* in the Brains of Chronically Infected Mice." *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology* 411 (1): 39–43. doi:10.1007/BF00734512.
- Ferguson, D. J. P., W. M. Hutchison, and E. Pettersen. 1989. "Tissue Cyst Rupture in Mice Chronically Infected with *Toxoplasma Gondii*: An Immunocytochemical and Ultrastructural Study." *Parasitology Research* 75 (8): 599–603. doi:10.1007/BF00930955.
- Ferguson, David J.P., and Jean-François Dubremetz. 2014. "The Ultrastructure of *Toxoplasma Gondii*." In *Toxoplasma Gondii*, 19–59. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123964816000027>.
- Ferguson, D.J.P. 2004. "Use of Molecular and Ultrastructural Markers to Evaluate Stage Conversion of *Toxoplasma Gondii* in Both the Intermediate and Definitive Host." *International Journal for Parasitology* 34 (3): 347–60. doi:10.1016/j.ijpara.2003.11.024.
- Franco, E. L., K. W. Walls, and A. J. Sulzer. 1981. "Reverse Enzyme Immunoassay for Detection of Specific Anti-*Toxoplasma* Immunoglobulin M Antibodies." *Journal of Clinical Microbiology* 13 (5): 859–64.

- Frenkel, J. K. 1970. "Pursuing Toxoplasma." *Journal of Infectious Diseases* 122 (6): 553–59. doi:10.1093/infdis/122.6.553.
- Frenkel, J. K., J. P. Dubey, and N. L. Miller. 1969. "Toxoplasma Gondii: Fecal Forms Separated from Eggs of the Nematode Toxocara Cati." *Science* 164 (3878): 432–33. doi:10.1126/science.164.3878.432.
- . 1970. "Toxoplasma Gondii in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts." *Science* 167 (3919): 893–96. doi:10.1126/science.167.3919.893.
- Frenkel, J. K., and L. Jacobs. 1958. "Ocular Toxoplasmosis; Pathogenesis, Diagnosis and Treatment." *A.M.A. Archives of Ophthalmology* 59 (2): 260–79.
- Fuentes, I, M Rodriguez, C J Domingo, F del Castillo, T Juncosa, and J Alvar. 1996. "Urine Sample Used for Congenital Toxoplasmosis Diagnosis by PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 34 (10): 2368–71.
- Fulton, J.D., and J.L. Turk. 1959. "DIRECT AGGLUTINATION TEST FOR TOXOPLASMA GONDII." *The Lancet* 274 (7111): 1068–69. doi:10.1016/S0140-6736(59)91535-1.
- Furtado, G. C., Y. Cao, and K. A. Joiner. 1992. "Laminin on Toxoplasma Gondii Mediates Parasite Binding to the Beta 1 Integrin Receptor Alpha 6 Beta 1 on Human Foreskin Fibroblasts and Chinese Hamster Ovary Cells." *Infection and Immunity* 60 (11): 4925–31.
- García-Márquez, Luis Jorge, Miguel Angel Gutiérrez-Díaz, Dolores Correa, Héctor Luna-Pastén, and José Manuel Palma. 2007. "Prevalence of Toxoplasma Gondii Antibodies and the Relation to Risk Factors in Cats of Colima, Mexico." *Journal of Parasitology* 93 (6): 1527–28. doi:10.1645/GE-1097.1.
- Garnham, P. C. C., J. R. Baker, and R. G. Bird. 1962. "Fine Structure of Cystic Form of Toxoplasma Gondii." *BMJ* 1 (5271): 83–82. doi:10.1136/bmj.1.5271.83.
- Gold, Daniel A., Aaron D. Kaplan, Agnieszka Lis, et al. 2015. "The Toxoplasma Dense

Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole.” *Cell Host & Microbe* 17 (5): 642–52. doi:10.1016/j.chom.2015.04.003.

Goldman, Morris, Russell K. Carver, and Alexander J. Sulzer. 1958. “Reproduction of *Toxoplasma Gondii* by Internal Budding.” *The Journal of Parasitology* 44 (2): 161. doi:10.2307/3274692.

Gordon, David, Chris Abajian, and Phil Green. 1998. “*Consed*: A Graphical Tool for Sequence Finishing.” *Genome Research* 8 (3): 195–202. doi:10.1101/gr.8.3.195.

Green, Michael R., Joseph Sambrook, and Joseph Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Grigg, M. E., and J. C. Boothroyd. 2001. “Rapid Identification of Virulent Type I Strains of the Protozoan Pathogen *Toxoplasma Gondii* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis at the B1 Gene.” *Journal of Clinical Microbiology* 39 (1): 398–400. doi:10.1128/JCM.39.1.398-400.2001.

Grogan, Laura F., Lee Berger, Karrie Rose, Victoria Grillo, Scott D. Cashins, and Lee F. Skerratt. 2014. “Surveillance for Emerging Biodiversity Diseases of Wildlife.” Edited by Glenn F. Rall. *PLoS Pathogens* 10 (5): e1004015. doi:10.1371/journal.ppat.1004015.

Halffter, Gonzalo, Jorge Llorente-Bousquet, and Juan J. Morrone. 2008. “La Perspectiva Biogeográfica Histórica.” In *Capital Natural de México*, edited by Alfonso García Aldrete, Adolfo Navarro-Sigüenza, and José Ramírez Pulido, Vol. I. Conocimiento actual de la biodiversidad:67–86. México: Conabio. http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/I02_Laperspectivab.pdf.

Hartl, Daniel L., and Andrew G. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4th ed.

Sunderland, Massachusetts: Sinauer.

- He, Xiao-lin, Michael E. Grigg, John C. Boothroyd, and K. Christopher Garcia. 2002. "Structure of the Immunodominant Surface Antigen from the *Toxoplasma Gondii* SRS Superfamily." *Nature Structural Biology*, July. doi:10.1038/nsb819.
- Hehl, A. B., C. Lekutis, M. E. Grigg, P. J. Bradley, J.-F. Dubremetz, E. Ortega-Barria, and J. C. Boothroyd. 2000. "Toxoplasma Gondii Homologue of Plasmodium Apical Membrane Antigen 1 Is Involved in Invasion of Host Cells." *Infection and Immunity* 68 (12): 7078–86. doi:10.1128/IAI.68.12.7078-7086.2000.
- Hernández-Cortazar, Ivonne, Karla Y. Acosta-Viana, Antonio Ortega-Pacheco, Eugenia del S. Guzman-Marin, Armando J. Aguilar-Caballero, and Matilde Jiménez-Coello. 2015. "Toxoplasmosis in Mexico: Epidemiological Situation in Humans and Animals." *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo* 57 (2): 93–103. doi:10.1590/S0036-46652015000200001.
- Holliman, R. E., J. D. Johnson, and D. Savva. 1990. "Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Association with AIDS Using the Polymerase Chain Reaction." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 22 (2): 243–44.
- Holliman, R., J. Johnson, D. Savva, N. Cary, and T. Wreghitt. 1992. "Diagnosis of Toxoplasma Infection in Cardiac Transplant Recipients Using the Polymerase Chain Reaction." *Journal of Clinical Pathology* 45 (10): 931–32.
- Homan, W.L, M Vercammen, J De Braekeleer, and H Verschueren. 2000. "Identification of a 200- to 300-Fold Repetitive 529 Bp DNA Fragment in *Toxoplasma Gondii*, and Its Use for Diagnostic and Quantitative PCR1Note: Nucleotide Sequence Data Reported in This Paper Have Been Submitted to GenBank™ Database with the Accession Number AF146527 (*Toxoplasma Gondii* Genomic Repetitive 529 Bp fragment).1." *International Journal for Parasitology* 30 (1): 69–75. doi:10.1016/S0020-

7519(99)00170-8.

- Howe, D. K., S. Honoré, F. Derouin, and L. D. Sibley. 1997. "Determination of Genotypes of *Toxoplasma Gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis." *Journal of Clinical Microbiology* 35 (6): 1411–14.
- Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1995. "Toxoplasma Gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease." *Journal of Infectious Diseases* 172 (6): 1561–66. doi:10.1093/infdis/172.6.1561.
- Hugh-Jones, Martin E., William T. Hubbert, and Harry V. Hagstad, eds. 2000. "Principles of Zoonoses Control and Prevention." In *Zoonoses*, 79–120. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press. <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470390368.ch4>.
- Hutchison, W. M., J. F. Dunachie, J. Chr. Siim, and K. Work. 1970. "Coccidian-like Nature of *Toxoplasma Gondii*." *BMJ* 1 (5689): 142–44. doi:10.1136/bmj.1.5689.142.
- Huynh, My-Hang, and Vern B. Carruthers. 2006. "Toxoplasma MIC2 Is a Major Determinant of Invasion and Virulence." *PLoS Pathogens* 2 (8): e84. doi:10.1371/journal.ppat.0020084.
- Ichikawa-Seki, Madoka, Azirwan Guswanto, Puttik Allamanda, Euis Siti Mariamah, Putut Eko Wibowo, Ikuo Igarashi, and Yoshifumi Nishikawa. 2015. "Seroprevalence of Antibody to TgGRA7 Antigen of *Toxoplasma Gondii* in Livestock Animals from Western Java, Indonesia." *Parasitology International* 64 (6): 484–86. doi:10.1016/j.parint.2015.07.004.
- Jacobs, Leon. 1973. "New Knowledge of *Toxoplasma* and *Toxoplasma* and Toxoplasmosis." In *Advances in Parasitology*, 11:631–69. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08601943>.
- Jacobs, Leon, Jack S. Remington, and Marjorie L. Melton. 1960. "The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma Gondii*." *The Journal of Parasitology* 46 (1): 11. doi:10.2307/3275325.

- Jacquet, Alain, Ludivine Coulon, Joël De Nève, Véronique Daminet, Michèle Haumont, Lida Garcia, Alex Bollen, Margarita Jurado, and Ralph Biemans. 2001. "The Surface Antigen SAG3 Mediates the Attachment of *Toxoplasma Gondii* to Cell-Surface Proteoglycans." *Molecular and Biochemical Parasitology* 116 (1): 35–44. doi:10.1016/S0166-6851(01)00297-3.
- Johnson, M., I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezhuk, S. McGinnis, and T. L. Madden. 2008. "NCBI BLAST: A Better Web Interface." *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server): W5–9. doi:10.1093/nar/gkn201.
- Kaufman, Herbert E., Marjorie L. Melton, Jack S. Remington, and Leon Jacobs. 1959. "Strain Differences of *Toxoplasma Gondii*." *The Journal of Parasitology* 45 (2): 189. doi:10.2307/3286527.
- Kaufman, Herbert E., Jack S. Remington, and Leon Jacobs. 1958. "Toxoplasmosis: The Nature of Virulence*." *American Journal of Ophthalmology* 46 (5): 255–61. doi:10.1016/0002-9394(58)90805-5.
- Kelen, A. E., L. Ayllon-Leindl, and N. A. Labzoffsky. 1962. "INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY METHOD IN SERODIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS." *Canadian Journal of Microbiology* 8 (4): 545–54. doi:10.1139/m62-071.
- Kessler, H., A. Herm-Gotz, S. Hegge, M. Rauch, D. Soldati-Favre, F. Frischknecht, and M. Meissner. 2008. "Microneme Protein 8 - a New Essential Invasion Factor in *Toxoplasma Gondii*." *Journal of Cell Science* 121 (7): 947–56. doi:10.1242/jcs.022350.
- Khan, A., B. Fux, C. Su, J. P. Dubey, M. L. Darde, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, and L. D. Sibley. 2007. "Recent Transcontinental Sweep of *Toxoplasma Gondii* Driven by a Single Monomorphic Chromosome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (37): 14872–77. doi:10.1073/pnas.0702356104.
- Khan, Asis. 2006. "Genetic Divergence of *Toxoplasma Gondii* Strains Associated with Ocular

- Toxoplasmosis, Brazil.” *Emerging Infectious Diseases* 12 (6): 942–49. doi:10.3201/eid1206.060025.
- Khan, Asis, J.P. Dubey, Chunlei Su, James W. Ajioka, Benjamin M. Rosenthal, and L. David Sibley. 2011. “Genetic Analyses of Atypical *Toxoplasma Gondii* Strains Reveal a Fourth Clonal Lineage in North America.” *International Journal for Parasitology* 41 (6): 645–55. doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.005.
- Koch, Mo, Rr Weiss, Aa Cruz, Vt Soccol, Ka Gonçalves, Maf Bertol, Oc Beltrame, and Rl Dittrich. 2016. “Detection and Isolation of *Toxoplasma Gondii* from Fresh Semen of Naturally Infected Dogs in Southern Brazil.” *Reproduction in Domestic Animals* 51 (4): 550–54. doi:10.1111/rda.12718.
- Kohler, S. 1997. “A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites.” *Science* 275 (5305): 1485–89. doi:10.1126/science.275.5305.1485.
- Lainson, R. 1958. “Observations on the Development and Nature of Pseudocysts and Cysts of *Toxoplasma Gondii*.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 52 (5): 396–407. doi:10.1016/0035-9203(58)90123-8.
- Lamarque, Mauld, Sébastien Besteiro, Julien Papoin, et al. 2011. “The RON2-AMA1 Interaction Is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites.” Edited by Dominique Soldati-Favre. *PLoS Pathogens* 7 (2): e1001276. doi:10.1371/journal.ppat.1001276.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, et al. 2007. “Clustal W and Clustal X Version 2.0.” *Bioinformatics* 23 (21): 2947–48. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- Lehmann, T., C. R. Blackston, S. F. Parmley, J. S. Remington, and J. P. Dubey. 2000. “Strain Typing of *Toxoplasma Gondii*: Comparison of Antigen-Coding and Housekeeping Genes.” *The Journal of Parasitology* 86 (5): 960. doi:10.2307/3284807.
- Lehmann, T, D Graham, E Dahl, L Bahiaoliveira, S Gennari, and J Dubey. 2004. “Variation in

the Structure of *Toxoplasma Gondii* and the Roles of Selfing, Drift, and Epistatic Selection in Maintaining Linkage Disequilibria.” *Infection, Genetics and Evolution* 4 (2): 107–14. doi:10.1016/j.meegid.2004.01.007.

Lehmann, T., P. L. Marcet, D. H. Graham, E. R. Dahl, and J. P. Dubey. 2006. “Globalization and the Population Structure of *Toxoplasma Gondii*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (30): 11423–28. doi:10.1073/pnas.0601438103.

Lescault, Pamela J., Ann B. Thompson, Veerupaxagouda Patil, Dario Lirussi, Amanda Burton, Juan Margarit, Jeffrey Bond, and Mariana Matrajt. 2010. “Genomic Data Reveal *Toxoplasma Gondii* Differentiation Mutants Are Also Impaired with Respect to Switching into a Novel Extracellular Tachyzoite State.” Edited by Alexander Idnurm. *PLoS ONE* 5 (12): e14463. doi:10.1371/journal.pone.0014463.

Leung, Jacqueline M., Mark A. Rould, Christoph Konradt, Christopher A. Hunter, and Gary E. Ward. 2014. “Disruption of TgPHIL1 Alters Specific Parameters of *Toxoplasma Gondii* Motility Measured in a Quantitative, Three-Dimensional Live Motility Assay.” Edited by Anthony Sinai. *PLoS ONE* 9 (1): e85763. doi:10.1371/journal.pone.0085763.

Librado, P., and J. Rozas. 2009. “DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data.” *Bioinformatics* 25 (11): 1451–52. doi:10.1093/bioinformatics/btp187.

Lindsay, D.S., J.P. Dubey, J.M. Butler, and B.L. Blagburn. 1997. “Mechanical Transmission of *Toxoplasma Gondii* Oocysts by Dogs.” *Veterinary Parasitology* 73 (1–2): 27–33. doi:10.1016/S0304-4017(97)00048-4.

Lindström, I., N. Sundar, J. Lindh, F. Kironde, J. D. Kabasa, O. C. H. Kwok, J. P. Dubey, and J. E. Smith. 2008. “Isolation and Genotyping of *Toxoplasma Gondii* from Ugandan Chickens Reveals Frequent Multiple Infections.” *Parasitology* 135 (1). doi:10.1017/S0031182007003654.

- MacConaill, M. A., P. S. Martin, and H. E. Wright. 1968. "Pleistocene Extinctions: The Search for a Cause." *Man* 3 (4): 665. doi:10.2307/2798599.
- Mackenzie, John S. 2011. "Responding to Emerging Diseases: Reducing the Risks through Understanding the Mechanisms of Emergence." *Western Pacific Surveillance and Response Journal* 2 (1): e1–e1. doi:10.5365/wpsar.2011.2.1.005.
- Maddison, D. R., and W. P. Maddison. 2016a. *Chromaseq: A Mesquite Package for Analyzing Sequence Chromatograms*. (version 1.2). <http://mesquiteproject.org/packages/chromaseq>.
- Maddison, W. P., and D. R. Maddison. 2016b. *Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis*. (version 3.10). <http://mesquiteproject.org>.
- Manger, I. D., A. B. Hehl, and J. C. Boothroyd. 1998. "The Surface of *Toxoplasma* Tachyzoites Is Dominated by a Family of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Antigens Related to SAG1." *Infection and Immunity* 66 (5): 2237–44.
- McIntyre, K.M., C. Setzkorn, M. Wardeh, P.J. Hepworth, A.D. Radford, and M. Baylis. 2014. "Using Open-Access Taxonomic and Spatial Information to Create a Comprehensive Database for the Study of Mammalian and Avian Livestock and Pet Infections." *Preventive Veterinary Medicine* 116 (3): 325–35. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.002.
- Melo, Edésio José Tenório d, Tecia Ulisses de carvalho, and Wanderley de Souza. 1992. "Penetration of *Toxoplasma Gondii* into Host Cells Induces Changes in the Distribution of the Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum." *Cell Structure and Function* 17 (5): 311–17. doi:10.1247/csf.17.311.
- Melo, E.J.L., M. Attias, and W. De Souza. 2000. "The Single Mitochondrion of Tachyzoites of *Toxoplasma Gondii*." *Journal of Structural Biology* 130 (1): 27–33. doi:10.1006/jsbi.2000.4228.
- Merianos, Angela. 2007. "Surveillance and Response to Disease Emergence." In *Wildlife and*

Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission, edited by James E. Childs, John S. Mackenzie, and Jürgen A. Richt, 315:477–509. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-70962-6_19.

Miller, M.A, M.E Grigg, C Kreuder, E.R James, A.C Melli, P.R Crosbie, D.A Jessup, J.C Boothroyd, D Brownstein, and P.A Conrad. 2004. "An Unusual Genotype of *Toxoplasma Gondii* Is Common in California Sea Otters (*Enhydra Lutris Nereis*) and Is a Cause of Mortality." *International Journal for Parasitology* 34 (3): 275–84. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.008.

Miller, M, W Miller, P Conrad, E James, A Melli, C Leutenegger, H Dabritz, A Packham, D Paradies, and M Harris. 2008a. "Type X *Toxoplasma Gondii* in a Wild Mussel and Terrestrial Carnivores from Coastal California: New Linkages between Terrestrial Mammals, Runoff and Toxoplasmosis of Sea Otters." *International Journal for Parasitology* 38 (11): 1319–28. doi:10.1016/j.ijpara.2008.02.005.

Miller, Melissa, Patricia Conrad, E.R. James, Andrea Packham, Sharon Toy-Choutka, Michael J. Murray, David Jessup, and Michael Grigg. 2008b. "Transplacental Toxoplasmosis in a Wild Southern Sea Otter (*Enhydra Lutris Nereis*)." *Veterinary Parasitology* 153 (1–2): 12–18. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.015.

Mital, J. 2005. "Conditional Expression of *Toxoplasma Gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion." *Molecular Biology of the Cell* 16 (9): 4341–49. doi:10.1091/mbc.E05-04-0281.

Montoya, Jg, and O Liesenfeld. 2004. "Toxoplasmosis." *The Lancet* 363 (9425): 1965–76. doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X.

Montoya, Jose G, Steve Parmley, Oliver Liesenfeld, Glenn J Jaffe, and Jack S Remington. 1999. "Use of the Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Ocular

Toxoplasmosis☆.” *Ophthalmology* 106 (8): 1554–63. doi:10.1016/S0161-6420(99)90453-0.

Mordue, Dana G., Sebastian Håkansson, Ingrid Niesman, and L. David Sibley. 1999. “Toxoplasma Gondii Resides in a Vacuole That Avoids Fusion with Host Cell Endocytic and Exocytic Vesicular Trafficking Pathways.” *Experimental Parasitology* 92 (2): 87–99. doi:10.1006/expr.1999.4412.

Morrison, D. A. 2005. “How Old Are the Extant Lineages of Toxoplasma Gondii?” *Parassitologia* 47 (2): 205–14.

Morrisette, Naomi S., and James W. Ajioka. 2009. “The Early Years of Toxoplasma Research: What’s Past Is Prologue.” *International Journal for Parasitology* 39 (8): 865–69. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.010.

Morrisette, N. S., J. M. Murray, and D. S. Roos. 1997. “Subpellicular Microtubules Associate with an Intramembranous Particle Lattice in the Protozoan Parasite Toxoplasma Gondii.” *Journal of Cell Science* 110 (Pt 1) (January): 35–42.

Morrone, Juan J. 2015. “Biogeographical Regionalisation of the World: A Reappraisal.” *Australian Systematic Botany* 28 (3): 81. doi:10.1071/SB14042.

Moudy, Robin, Timothy J. Manning, and Con J. Beckers. 2001. “The Loss of Cytoplasmic Potassium upon Host Cell Breakdown Triggers Egress of *Toxoplasma Gondii*.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (44): 41492–501. doi:10.1074/jbc.M106154200.

Murphy, Frederick A. 1999. “The Threat Posed by the Global Emergence of Livestock, Food-Borne, and Zoonotic Pathogens.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 894 (1 FOOD AND AGRI): 20–27. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08039.x.

Nagamune, Kisaburo, Leslie M. Hicks, Blima Fux, Fabien Brossier, Eduardo N. Chini, and L. David Sibley. 2008. “Abscisic Acid Controls Calcium-Dependent Egress and Development in Toxoplasma Gondii.” *Nature* 451 (7175): 207–10.

doi:10.1038/nature06478.

Naot, Y., and J. S. Remington. 1980. "An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of IgM Antibodies to *Toxoplasma Gondii*: Use for Diagnosis of Acute Acquired Toxoplasmosis." *The Journal of Infectious Diseases* 142 (5): 757–66.

Nicolle, C., and L. Manceaux. 1909. *Sur Un Protozoaire Nouveau Du Gondi: Toxoplasma N. Gen.* Masson.

Nicolle, Charles, and Louis Herbert Manceux. 2009. "On a Leishman Body Infection (or Related Organisms) of the Gondi." *International Journal for Parasitology* 39 (8): 863–64. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.001.

NOM-033-ZOO-1995. 2014. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5376424&fecha=18/12/2014.

O'Brien, Stephen J., Warren Johnson, Carlos Driscoll, Joan Pontius, Jill Pecon-Slattery, and Marilyn Menotti-Raymond. 2008. "State of Cat Genomics." *Trends in Genetics* 24 (6): 268–79. doi:10.1016/j.tig.2008.03.004.

Ogino, N., and C. Yoneda. 1966. "The Fine Structure and Mode of Division of *Toxoplasma Gondii*." *Archives of Ophthalmology* 75 (2): 218–27. doi:10.1001/archopht.1966.00970050220015.

Owen, M. R., M. J. Clarkson, and A. J. Trees. 1998. "Diagnosis of *Toxoplasma* Abortion in Ewes by Polymerase Chain Reaction." *The Veterinary Record* 142 (17): 445–48.

Owen, M. R., and A. J. Trees. 1999. "Genotyping of *Toxoplasma Gondii* Associated with Abortion in Sheep." *The Journal of Parasitology* 85 (2): 382. doi:10.2307/3285654.

Patz, Jonathan A., Peter Daszak, Gary M. Tabor, et al. 2004. "Unhealthy Landscapes: Policy Recommendations on Land Use Change and Infectious Disease Emergence." *Environmental Health Perspectives* 112 (10): 1092–98. doi:10.1289/ehp.6877.

Pfefferkorn, Lorraine C., and E.R. Pfefferkorn. 1980. "*Toxoplasma Gondii*: Genetic

- Recombination between Drug Resistant Mutants.” *Experimental Parasitology* 50 (3): 305–16. doi:10.1016/0014-4894(80)90034-X.
- Piekarski, G., B. Pelster, and H. M. Witte. 1971. “[Endopolygeny in *Toxoplasma gondii*].” *Zeitschrift Fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 36 (2): 122–30.
- Radke, J. 2001. “Defining the Cell Cycle for the Tachyzoite Stage of *Toxoplasma Gondii*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 115 (2): 165–75. doi:10.1016/S0166-6851(01)00284-5.
- Radke, Jay R, and Michael W White. 1998. “A Cell Cycle Model for the Tachyzoite of *Toxoplasma Gondii* Using the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 94 (2): 237–47. doi:10.1016/S0166-6851(98)00074-7.
- “Resumen. Colima.” 2017. Accessed September 15. <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/col/default.aspx?tema=me%26e=06>.
- Rico-Torres, Claudia Patricia, Alejandra Del Viento-Camacho, Heriberto Caballero-Ortega, Alejandro Besné-Mérida, Héctor Luna-Pastén, Dolores Correa, and José Manuel Palma-García. 2015. “First Isolation of *Toxoplasma Gondii* from Cats of Colima, Mexico: Tissue Distribution and Genetic Characterization.” *Veterinary Parasitology* 209 (1–2): 125–28. doi:10.1016/j.vetpar.2015.02.004.
- Rico-Torres, Claudia Patricia, Ricardo Figueroa-Damián, Carlos López-Candiani, Héctor Alberto Macías-Avilés, Carlos Cedillo-Peláez, Irma Cañedo-Solares, Héctor Luna-Pastén, Blanca Luz Tecuatl-Herrada, and Dolores Correa. 2012. “Molecular Diagnosis and Genotyping of Cases of Perinatal Toxoplasmosis in Mexico.” *The Pediatric Infectious Disease Journal* 31 (4): 411–13. doi:10.1097/INF.0b013e318241f564.
- Robert-Gangneux, F., and M.-L. Darde. 2012. “Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis.” *Clinical Microbiology Reviews* 25 (2): 264–96.

doi:10.1128/CMR.05013-11.

- Rodriguez-Prado, U., D. E. Jimenez-Gonzalez, G. Avila, et al. 2014. "Genetic Variation of *Echinococcus Canadensis* (G7) in Mexico." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 91 (6): 1149–53. doi:10.4269/ajtmh.14-0317.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. "MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space." *Systematic Biology* 61 (3): 539–42. doi:10.1093/sysbio/sys029.
- Ruffolo, Bruno Bergamo, Roberta dos Santos Toledo, Felipe Danyel Cardoso Martins, Felipe Monteiro Bugni, Letícia da Costa, Elizabete Regina Marangoni Marana, Itamar Teodorico Navarro, João Luis Garcia, Chunlei Su, and Roberta Lemos Freire. 2016. "ISOLATION AND GENOTYPING OF *Toxoplasma Gondii* IN SERONEGATIVE URBAN RATS AND PRESENCE OF ANTIBODIES IN COMMUNICATING DOGS IN BRAZIL." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 58. doi:10.1590/S1678-9946201658028.
- Sabin, A. B., and H. A. Feldman. 1948. "Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*)." *Science* 108 (2815): 660–63. doi:10.1126/science.108.2815.660.
- Schultz, Jürgen. 2005. *The Ecozones of the World: The Ecological Divisions of the Geosphere*. Springer Science & Business Media.
- Sheffield, H. G., and M. L. Melton. 1969. "*Toxoplasma Gondii*: Transmission through Feces in Absence of *Toxocara Cati* Eggs." *Science* 164 (3878): 431–32. doi:10.1126/science.164.3878.431.
- Sheffield, Harley G., and Marjorie L. Melton. 1968. "The Fine Structure and Reproduction of *Toxoplasma Gondii*." *The Journal of Parasitology* 54 (2): 209. doi:10.2307/3276925.

- Shen, Bang, and L David Sibley. 2012. "The Moving Junction, a Key Portal to Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites." *Current Opinion in Microbiology* 15 (4): 449–55. doi:10.1016/j.mib.2012.02.007.
- Sibley, L. D., A. Khan, J. W. Ajioka, and B. M. Rosenthal. 2009. "Genetic Diversity of *Toxoplasma Gondii* in Animals and Humans." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1530): 2749–61. doi:10.1098/rstb.2009.0087.
- Sibley, L. David, and John C. Boothroyd. 1992. "Virulent Strains of *Toxoplasma Gondii* Comprise a Single Clonal Lineage." *Nature* 359 (6390): 82–85. doi:10.1038/359082a0.
- Speer, C. A., S. Clark, and J. P. Dubey. 1998. "Ultrastructure of the Oocysts, Sporocysts, and Sporozoites of *Toxoplasma Gondii*." *The Journal of Parasitology* 84 (3): 505. doi:10.2307/3284713.
- Speer, C. A., and J. P. Dubey. 1998. "Ultrastructure of Early Stages of Infections in Mice Fed *Toxoplasma Gondii* Oocysts." *Parasitology* 116 (1): 35–42. doi:10.1017/S0031182097001959.
- Speer, C.A., and J.P. Dubey. 2005. "Ultrastructural Differentiation of *Toxoplasma Gondii* Schizonts (Types B to E) and Gamonts in the Intestines of Cats Fed Bradyzoites." *International Journal for Parasitology* 35 (2): 193–206. doi:10.1016/j.ijpara.2004.11.005.
- Splendore, Alfonso. 2009. "A New Protozoan Parasite in Rabbits." *International Journal for Parasitology* 39 (8): 861–62. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.002.
- Su, C. 2003. "Recent Expansion of *Toxoplasma* Through Enhanced Oral Transmission." *Science* 299 (5605): 414–16. doi:10.1126/science.1078035.
- Su, C., A. Khan, P. Zhou, et al. 2012. "Globally Diverse *Toxoplasma Gondii* Isolates Comprise Six Major Clades Originating from a Small Number of Distinct Ancestral Lineages." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (15): 5844–49.

doi:10.1073/pnas.1203190109.

- Su, C., E. K. Shwab, P. Zhou, X. Q. Zhu, and J. P. Dubey. 2010. "Moving towards an Integrated Approach to Molecular Detection and Identification of *Toxoplasma Gondii*." *Parasitology* 137 (1): 1. doi:10.1017/S0031182009991065.
- Su, C., X. Zhang, and J.P. Dubey. 2006. "Genotyping of *Toxoplasma Gondii* by Multilocus PCR-RFLP Markers: A High Resolution and Simple Method for Identification of Parasites." *International Journal for Parasitology* 36 (7): 841–48. doi:10.1016/j.ijpara.2006.03.003.
- Sumner, B., and M. L. Ackland. 1999. "Toxoplasma Gondii Antibody in Domestic Cats in Melbourne." *Australian Veterinary Journal* 77 (7): 447–49.
- Suss-Toby, E., J. Zimmerberg, and G. E. Ward. 1996. "Toxoplasma Invasion: The Parasitophorous Vacuole Is Formed from Host Cell Plasma Membrane and Pinches off via a Fission Pore." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16): 8413–18.
- Tanabe, Kazuyuki, Toshihiro Mita, Thibaut Jombart, et al. 2010. "Plasmodium Falciparum Accompanied the Human Expansion out of Africa." *Current Biology* 20 (14): 1283–89. doi:10.1016/j.cub.2010.05.053.
- Thompson, R. C. A., and A. J. Lymbery, eds. 1995. *Echinococcus and hydatid disease*. Oxon: Cab.
- Tibayrenc, M. 1993. "Entamoeba, Giardia and Toxoplasma: Clones or Cryptic Species?" *Parasitology Today* 9 (3): 102–5. doi:10.1016/0169-4758(93)90217-4.
- Tibayrenc, M., and F.J. Ayala. 1991. "Towards a Population Genetics of Microorganisms: The Clonal Theory of Parasitic Protozoa." *Parasitology Today* 7 (9): 228–32. doi:10.1016/0169-4758(91)90234-F.
- Tibayrenc, Michel. 2012. "Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious

- Diseases.” In *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*, edited by Serge Morand, François Beaudeau, and Jacques Cabaret, 29–43. Dordrecht: Springer Netherlands. http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-007-2114-2_3.
- VanWormer, Elizabeth, Melissa A. Miller, Patricia A. Conrad, Michael E. Grigg, Daniel Rejmanek, Tim E. Carpenter, and Jonna A. K. Mazet. 2014. “Using Molecular Epidemiology to Track *Toxoplasma Gondii* from Terrestrial Carnivores to Marine Hosts: Implications for Public Health and Conservation.” Edited by Elodie Ghedin. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (5): e2852. doi:10.1371/journal.pntd.0002852.
- Velasco-Castrejón, O., B. Salvatierra-Izaba, J. L. Valdespino, A. M. Sedano-Lara, S. Galindo-Virgen, C. Magos, A. Llausás, R. Tapia-Conyer, G. Gutiérrez, and J. Sepúlveda. 1992. “[Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico].” *Salud Pública De México* 34 (2): 222–29.
- Ven, E. van de, W. Melchers, J. Galama, W. Camps, and J. Meuwissen. 1991. “Identification of *Toxoplasma Gondii* Infections by BI Gene Amplification.” *Journal of Clinical Microbiology* 29 (10): 2120–24.
- Vourc’h, Gwenaël, Olivier Plantard, and Serge Morand. 2012. “How Does Biodiversity Influence the Ecology of Infectious Disease?” In *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*, edited by Serge Morand, François Beaudeau, and Jacques Cabaret, 291–309. Dordrecht: Springer Netherlands. http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-007-2114-2_13.
- Waaij, D. van der. 1959. “Formation, Growth and Multiplication of *Toxoplasma Gondii* Cysts in Mouse Brains.” 11: 345–360.
- Webb. 2006. “THE GREAT AMERICAN BIOTIC INTERCHANGE: PATTERNS AND PROCESSES ¹.” *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93 (2): 245–57.

doi:10.3417/0026-6493(2006)93[245:TGABIP]2.0.CO;2.

- Wendte, Jered M., Amanda K. Gibson, and Michael E. Grigg. 2011. "Population Genetics of *Toxoplasma Gondii*: New Perspectives from Parasite Genotypes in Wildlife." *Veterinary Parasitology* 182 (1): 96–111. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.018.
- Wolf, A., D. Cowen, and B. Paige. 1939a. "HUMAN TOXOPLASMOSIS: OCCURRENCE IN INFANTS AS AN ENCEPHALOMYELITIS VERIFICATION BY TRANSMISSION TO ANIMALS." *Science* 89 (2306): 226–27. doi:10.1126/science.89.2306.226.
- Wolf, A., D. Cowen, and B. H. Paige. 1939b. "Toxoplasmic Encephalomyelitis: III. A New Case of Granulomatous Encephalomyelitis due to a Protozoon." *The American Journal of Pathology* 15 (6): 657–694.11.
- Work, K., and W. M. Hutchison. 2009. "THE NEW CYST OF TOXOPLASMA GONDII." *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 77 (3): 414–24. doi:10.1111/j.1699-0463.1969.tb04248.x.
- Zhuo, Xunhui, Hongchao Sun, Zhi Zhang, Jiaqing Luo, Ying Shan, and Aifang Du. 2017. "Development and Application of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Mag1 for Serodiagnosis of *Toxoplasma Gondii* In Dogs." *Journal of Parasitology* 103 (3): 237–42. doi:10.1645/16-89.

14. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo para concentrar quistes tisulares de T. gondii a partir de una muestra de tejido.

1. homogenizar 5g de tejido en 25 ml de agua bidestilada con una licuadora manual por dos minutos.
2. Filtrar el homogeneizado a través de un tamiz⁹ metálico de laboratorio con apertura de 180 micras (Newark wire cloth company, NJ, USA).
3. Transferir el líquido a un tubo cónico de 50 ml y aforar con agua bidestilada a su máxima capacidad, para realizar 2 lavados de 5 minutos a 3000 g.
4. Resuspender la pastilla obtenida en una solución de sacarosa con densidad relativa de 1.2, colocar una campana de Ferreira ajustando el volumen a 50 ml para centrifugar 3 minutos a 1500 g.
5. Transferir 500 µl del sobrenadante del interior de la campana a un tubo de 1.5 ml, ajustando con agua bi-destilada el volumen a su máxima capacidad para realizar 2 lavados de 10 minutos a 14000 RPM. La pastilla obtenida fué utilizada para realizar la extracción de DNA.

⁹ Utensilio que se usa para separar las partes finas de las gruesas y que está formado por una tela metálica con una apertura graduada.

Protocolo de extracción de DNA a partir de muestras pequeñas usando solventes orgánicos

1. Agregar 500 μ l de la solución de lisis SNET (con proteinasa K a una concentración final de 400 μ g/ml) preparada al momento incubar a 55°C toda la noche o hasta que la pastilla no sea visible.
2. Dejar enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y agregar 1 volumen equivalente de fenol saturado. Sellar y colocar en un equipo con vaivén por 25 minutos para que se forme una emulsión con las dos fases.
3. Centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad, posteriormente transferir la fase acuosa (superior) a un tubo estéril de 1.5 ml evitando no transferir nada de la fase orgánica (inferior) y desechar la fase orgánica.
4. Agregar un volumen equivalente de fenol-cloroformo y repetir los pasos 3 y 4.
5. Agregar un volumen equivalente de cloroformo-alcohol isoamílico y repetir los pasos 3 y 4.
6. Precipitar con un volumen equivalente de isopropanol absoluto, agitar suavemente por inversión e incubar por 15 minutos en baño de hielo.
7. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a máxima velocidad y descartar el isopropanol.
8. Agregar 700 μ l de etanol al 70 % y agitar suavemente por inversión.
9. Centrifugar a 4°C por 5 minutos a máxima velocidad y descartar el etanol, procurando retirar las gotas de etanol con una micropipeta.
10. Colocar el tubo abierto e invertido sobre un papel absorbente por 5-10 minutos.
11. Agregar 50 μ l de buffer TE o solución para rehidratar DNA e incubar la muestra a 95°C por una hora, dejar enfriar a temperatura ambiente y almacenar a -20°C hasta su uso.

*Anexo 3**Protocolo para extraer DNA con el sistema comercial Gentra a partir de tejidos*

1. Separar 250 mg de tejido y macerar con pistilo.
2. Agregar 300 μ l de la solución de lisis y 15 μ l de proteinasa K (incluidos en el kit), e incubar a 55°C toda la noche o hasta que el tejido se desintegre.
3. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 150 μ l de la solución para precipitar proteínas (incluida en el kit) y vortexear a máxima velocidad por 20 segundos. Y repetir el paso.
4. Centrifugar 5 min a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo estéril.
5. Agregar 1 volumen de isopropanol absoluto e incubar a 4°C toda la noche.
6. Mezclar por inversión suave hasta que se observe el DNA y centrifugar 3 min a máxima velocidad.
7. Descartar el sobrenadante y agregar 700 μ l de etanol al 70 %, mezclar por inversión suave y centrifugar 2 min a máxima velocidad.
8. Descartar el sobrenadante e invertir el tubo sobre un papel absorbente durante 5-10 minutos.
9. Agregar 100 μ l de una dilución 1:10 de la solución para rehidratar DNA (incluida en el kit) e incubar a 95°C por 1 hora.
10. Guardar la muestra a -20°C.

Genotyping *Toxoplasma gondii* with the *B1* Gene in Naturally Infected Sheep from an Endemic Region in the Pacific Coast of Mexico

Williams Arony Martínez-Flores,¹ José Manuel Palma-García,² Heriberto Caballero-Ortega,³ Alejandra Del Viento-Camacho,² Eduardo López-Escamilla,¹ Fernando Martínez-Hernández,¹ Pablo Vinuesa,⁴ Dolores Correa,³ and Pablo Maravilla¹

Abstract

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite with a broad ecological valence, which has been detected in a wide range of hosts and landscapes. Although the genus is considered monospecific, in recent years it has been demonstrated to exhibit more genetic variability than previously known. In Mexico, there are few genotyping studies, which suggest that classical, autochthonous, and atypical strains are circulating. The goal of this study was to describe *T. gondii* genetic diversity in naturally infected sheep from Colima, Mexico. This is a good site to study ecological aspects of this parasite since it is located between the Nearctic and Neotropical ecozones and it includes domestic and wild risks for transmission. We analyzed 305 tissue samples of semicaptive sheep from six coastal and central zones of Colima and border zones of Michoacán. We used an 803 bp amplicon of the *B1* gene to genotype *T. gondii* and seroprevalence was determined by ELISA. Indexes for genetic diversity and genetic differentiation were calculated and compared with reference strains from North America (NA) and South America (SA). Twenty-three tissue samples were positive for the *B1* gene by PCR, which were sequenced. Crude prevalence was 24.4%. The genetic analysis showed 16 variable sites along the 803 bp region that grouped all sequences into 13 haplotypes in the phylogenetic tree. Bayesian and haplotype network analysis showed nine new *B1*-types, of which three were frequent and six had unique alleles. Comparisons among sequence sets revealed that the Mexican population had lower differentiation than SA and an intermediate genetic variability between South America and North America. The *B1* gene analysis showed new *T. gondii* haplotypes in naturally infected sheep; therefore, this marker could be initially used in molecular screening studies to identify potentially virulent genotypes of this parasite using natural host samples directly.

Keywords: *B1* gene, genotyping, haplotypes, population, sheep, *Toxoplasma gondii*

Introduction

TOXOPLASMA GONDII is a protozoan parasite from the phylum Apicomplexa (Levine 1977). Its life cycle has a sexual phase within the intestinal epithelium of the definitive hosts (Dubey 1970, Dubey et al. 1970, Frenkel et al. 1970, Miller et al. 1972) and an asexual phase in virtually any nucleated cell of all intermediate hosts (Długońska 2014). Earlier genotyping studies suggested clonal populations conformed by three main lineages traditionally known as

types I, II, and III (Howe and Sibley 1995). In recent decades, studies in wildlife and natural landscapes using single and multilocus markers have increased our knowledge about the diversity and distribution of *T. gondii*, and showed that there is more genetic variability than formerly thought (Burg et al. 1989, Grigg and Boothroyd 2001, Ajzenberg et al. 2002, Su et al. 2006, 2012, Khan et al. 2007).

In consequence, it has been argued that different parasite populations are predominant in the sylvatic and domestic cycles, but which can traverse from one to the other, like in

¹Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General "Dr. Manuel Gea González," Ciudad de México, México.

²Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Colima, Colima, México.

³Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México.

⁴Centro de Ciencias Genómicas, Programa de Ingeniería Genómica, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

other emerging infectious diseases (Ambrose-Thomas 2000, Daszak 2000, Robertson et al. 2000, Polley 2005, Roche and Guégan 2011, Wendte et al. 2011, Grogan et al. 2014).

The genetic diversity of *T. gondii* has not been well studied in Mexico, although some reports show the presence of archetypal and atypical genotypes (Dubey et al. 2004, 2009, 2013, Cedillo-Peláez et al. 2011, Rico-Torres et al. 2012, 2015). As an example, a strain isolated from a wild puma (*Felis concolor*) from northern Mexico was typed as ToxoDB #222, a new atypical genotype, virulent for mice (Dubey et al. 2013). Epidemiological surveys in human populations have revealed toxoplasmosis to be endemic in the whole country, being higher in the subtropical areas (Velasco-Castrejón et al. 1992, Caballero-Ortega et al. 2012). Specifically, in the Pacific Coast, the Gulf of Mexico and the Yucatan Peninsula, the human infection exceeds 70% (Caballero-Ortega et al. 2012).

It also has been reported that exposure to *T. gondii* displays a stratified prevalence in sheep flocks, being higher in lowlands than in highlands (Caballero-Ortega et al. 2008). These patterns may be of global relevance since biogeographically this region borders a transitional area between the Nearctic and Neotropical eozones (Fosberg 1976, Olson and Dinerstein 1998, Olson et al. 2001, Morrone 2015), which has been related to differential *T. gondii* distribution and genetic diversity (Khan et al. 2007, Su et al. 2012).

The division caused by the mountain ranges represent physical and ecological barriers that isolate natural populations at both sides (Morrone 2015), which has let a great variety of potential intermediate hosts, including the six species of wild felids (Ceballos and Oliva 2005), as well as, domestic cats freely roaming in the rural, semiurban, and urban areas (García-Márquez et al. 2007, Caballero-Ortega et al. 2008, Rico-Torres et al. 2015). In light of these findings, the aim of this study was to describe the genetic diversity of *T. gondii* in a pacific coastal region of Mexico in semicaptive sheep by direct DNA analysis using the *B1* gene, due to its effectiveness to identify virulent or new genotypes (Grigg and Boothroyd 2001, VanWormer et al. 2014).

Materials and Methods

The present study was approved by the *Use of Laboratory Animals Care* and the *Research Committees* of the Instituto Nacional de Pediatría (reference number 013/2012).

Sample collection

Small pieces of muscle tissue from the leg, diaphragm, and heart, as well as ~20 mL of peripheral blood for serology screening, were collected from March 2013 to March 2014 from the municipal slaughterhouse of Colima, according to the Mexican official standard NOM-033-ZOO-1995. All biological samples belong to semicaptive animals destined for human consumption; therefore, no sheep was euthanized for this study. Fresh tissue samples were washed in a commercial solution of 1% disinfectant (VIRKON S, BAYER, Mexico) and placed in individual bags to avoid cross contamination. Sample sets were transported by air cargo within 24 h post-collection and carried in cold chain until DNA extraction was made in the laboratory in Mexico City. Metadata for the animals (age, sex, and flock location) were recorded during

sample collection. Serum samples were tested by a previously standardized indirect ELISA (Caballero-Ortega et al. 2008).

DNA extraction

Before DNA extraction, samples were processed with a tissue cyst concentration technique based on density gradient centrifugation by sucrose surface flotation. Briefly, 5 g of pooled tissues were minced with a hand blender in 40 mL of bidistilled water for 2 min. Homogenates were filtered through a sieve with 180 µm opening (Newark Wire Cloth Company, NJ, USA) and poured into 50-mL conical centrifuge tubes.

After filtration, two 5-min washing steps at 3000 g were made with bidistilled water. The pellet was resuspended in a sucrose solution (specific gravity = 1.2); volume was adjusted to 50 mL and centrifuged at 1500 g for 3 min. Five hundred microliters of the supernatant were transferred to 1.5-mL microcentrifuge tubes to make two washings with bidistilled water at 184,800 g for 10 min. Resulting pellets were subjected to DNA extraction using a protocol to process small samples with organic solvents (Green and Sambrook 2012). DNA was dissolved in 50 µL DNA hydration solution (QIAGEN, Germany), incubated at 65°C for 1 h, and stored at -20°C.

Genetic diversity and phylogenetic analysis

Direct DNA amplification was performed by established nested-PCR protocols, PCR-screening for *T. gondii* infection and genotyping was done by endpoint PCR of 362 bp (Rico-Torres et al. 2012) and ~500 bp (Grigg and Boothroyd 2001) fragments, both of the *B1* locus. In addition, haplogroup identification was attempted by PCR sequencing of intronic regions with a set of eight unlinked markers (Khan et al. 2007).

T. gondii DNA of RH strain was used as positive controls. PCR amplification was carried out in 25 µL mixes and 35 cycles for the external primers, and 100 µL with 25 cycles for internal primers in the nested PCR. For all set of primers, concentration of reagents was calculated for 100 µL volume reaction and were as follows: 1×PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 25 pmol of each primer, 1×enhancer buffer with Betaine (Promega, USA); BSA 0.4% (vol/vol); and 200 µM of each dNTP and 3 U of Taq polymerase. Template DNA ranged from 200 ng to 1.0 µg for each pair of primers. PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) and sequenced by a commercial supplier.

To analyze the polymorphic sites, chromatograms were evaluated with the Mesquite software (Maddison and Maddison 2016b) using the Chromaseq package (Maddison and Maddison 2016a) that partially makes use of the Phred and Phrap algorithms for base calling, assigning quality values to each called base, and assembling contigs (Ewing and Green 1998, Ewing et al. 1998, Gordon et al. 1998). BLASTN searches were run using the complete sequence of the *B1* locus reported for the RH strain (Burg et al. 1989) as the query (GenBank: AF179871.1) against the Whole-Genome Shotgun (WGS) Contigs projects from the 16 *T. gondii* genomes hosted at the NCBI.

Sequence alignments were made with ClustalW version 2.1 (Larkin et al. 2007). Phylogenetic reconstruction was

computed with MrBayes Software version 3.2.6 (Ronquist et al. 2012). Sequence data were partitioned by intron and exon, analysis was performed for 10 million generations, posterior probability distribution and diagnostic frequency were sampled every 1000 and 100,000 generations, respectively, substitution model was implemented during analysis by reversible jump, trees were summarized with a postburnin sample of 50% and modified with Figtree v1.4.2 ("FigTree," n.d.). Unrooted haplotype networks were computed using NETWORK version 4.611 ("fluxus-engineering.com," n.d.) and nested according to the rules in median-joining networks (Bandelt et al. 1999).

DNA polymorphism analysis was performed in DnaSP v5.10.01, which included estimation of nucleotide diversity (π), haplotype diversity (H_T), gene flow (Nm), and genetic differentiation (H_{ST}). Permutation test was computed to define significance levels (Librado and Rozas 2009). The common values used for genetic differentiation were: 0–0.05, small; 0.05–0.15, moderate; 0.15–0.25, great; values above 0.25 indicate huge genetic differentiation. The gene flow or migration index (Nm) refers to the movement of organisms among subpopulations; those strongly differentiated have an $Nm \ll 1$, whereas an $Nm > 4$ behaves as a single panmictic unit (Hartl and Clark 2007).

Results

We obtained tissue samples from 305 semicaptive sheep destined for human consumption during 1 year, from 27 locations of Colima and two of Michoacán, Mexico. Based on their distance from the coastal line and the geographical location, sampling zones were grouped into six sites (S). Sites S1 to S4 and S6 are located ~2, ~14, ~13, ~54, and ~29 km away, respectively, from the coastal line in the state of Colima, whereas S5 was located ~10 km away from the coastal line in a border area between both states (Fig. 1).

From the whole set of samples, 275 were obtained from S1, S2, S3, and S5, whereas 30 were gathered from S4 and S6; 64% ($n=196$) were males, 32% ($n=99$) females, and 4% ($n=10$) fetuses of undefined sex. Four age groups were established: 6% fetuses, 68% <1 year, 15% >2 and <4 years, and 11% >4 years. The frequency of antibodies was 24.4%, like in a previous study in the same area, 9 years ago (Caballero-Ortega et al. 2008). From the total DNA set of samples, 23 were positive for the multicopy *B1* locus in both contiguous regions of ~500 and 362 bp; therefore, concatenated sequences of 803 bp were analyzed (Supplementary Table S1; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/vbz). From those PCR-positive samples, only four were positive for ELISA.

Chromatogram analysis in both forward and reverse sequence trace files from each sample, revealed high-quality scores, good intensities, and well-defined peaks with no background noise in the position of interest, showing new sequence haplotypes for 13 samples, of which, three sequences uncovered unresolved nucleotides (Estacion101 and Camalote102 position 305 C/t; EIReal109 position 754 A/g).

Samples with new haplotypes were resequenced at least three times; the pattern and quality remained in chromatograms, even in those with unresolved nucleotide positions for three samples, in which two sequences (A and B) were generated. Sequences obtained were submitted to the Gen-

Bank database and are publicly available with accession numbers KX270363–KX270388. No useful DNA products or sequences were obtained with any of the eight unlinked markers used to type haplogroups. During the BLAST searches against NCBI nucleotide databases, we found whole *B1* gene sequences for 16 different strains; detailed information is provided in the Supplementary Table S2. No manual edition was needed for the DNA alignments.

The haplotype network tree showed the existence of 16 variable sites along the 803 bp region that grouped the 40 sequences into 13 haplotypes (Fig. 2). Polymorphic sites were positioned within the 2214 bp sequence tandem of the *B1* locus; only polymorphic sites 504 (G/c) and 754 (A/g) of the original report documented by (Burg et al. 1989), were identified in the present study. All sequences from sheep were similar to type I alleles, but new single nucleotide polymorphisms at different sites were recognized at position 172 (C/t) for the Hap6 (in four samples), 305 (C/t) for the Hap7 (in two samples), and 679 (C/t) for the Hap8 (in two samples). Sequences of the reference strains were clustered within Hap1–Hap5, whereas those obtained in the present study were grouped within Hap1, as well as in Hap6–Hap13 (Supplementary Table S1).

Based on sequence comparisons of the *B1* gene from the *T. gondii* WGS-projects available, we found that the complete 2214 bp region presents 26 polymorphic sites that can distinguish every strain from others, except for TgCatBr5 and MAS strains, which have identical sequences (Supplementary Table S3).

The Bayesian phylogeny (Fig. 3) showed that seventeen of our samples were clustered with sequences that exhibited the type I alleles, including Hap9–Hap12, identified by the network tree as unique haplotypes (Fig. 2). Sequences belonging to haplotypes 6, 7, and 8 from the network tree were also grouped as separate clades in the Bayesian reconstruction. Finally, the sequence corresponding to haplotype 13 was included in another branch that groups most of the nontype I reference strains within independent clusters.

Values for H_{ST} and Nm indexes showed low levels of genetic differentiation ($H_{ST} \sim 0.05$, $Nm \sim 8$) for comparisons between sequences reported here and those from South America (SA) or North America (NA), respectively. Although, nucleotide and haplotype polymorphism values were similar among the three geographical regions ($\pi \sim 0.001$, $\Theta \sim 0.002$), the SA dataset showed higher genetic variability, followed by Colima and NA, respectively (Supplementary Table S4).

Discussion

Knowledge about the genetic structure of parasite populations could be an important tool applied to their control because genetic variation within and among populations could determine evolutionary changes, genetic differentiation, and speciation events (Thompson and Lymbery 1995, Rodríguez-Prado et al. 2014). To increase the knowledge of the genetic diversity of *T. gondii*, we chose ovines kept under semicaptive conditions from a hyperendemic area in Mexico, because they are good sentinels of environmental contamination with oocysts and may be mediating two-way domestic–wild cycles crossing (Velasco-Castrejón et al. 1992, García-Márquez et al. 2007, Caballero-Ortega et al. 2008, 2012).

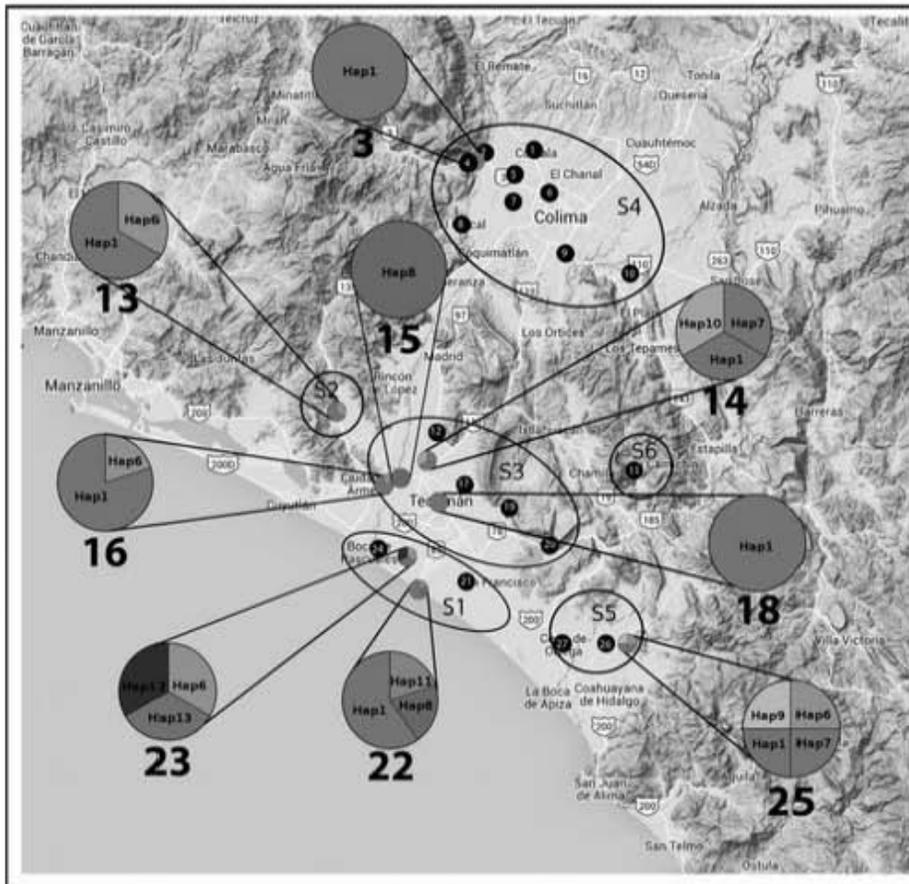


FIG. 1. Distribution of locations and haplotypes of *Toxoplasma gondii* in a Pacific coastal region from Mexico. Sampled locations were positioned by its geographic coordinates and grouped into S1 to S6 by its proximity. Locations in which samples could be sequenced are represented with pie charts that match haplotype frequency, whereas solid black charts represent sampled locations from where no sequences could be gathered. Enlarged pie chart size was normalized for a better view.

Based on Bayesian reconstruction and haplotype network, we found a type I-like gene pool in our samples; however, it was possible to identify new haplotypes by direct DNA analysis of the *BI* locus; therefore, our data are complementary to those reports which described the existence of archetypal lineage I infecting hosts in Mexico (Cedillo-Peláez et al. 2011, Rico-Torres et al. 2012).

Since the Nearctic and Neotropical ecozones converge in Mexico, specific settings of geographical and ecological features are present, exhibiting variable climates and biomes. Also, mountain ranges are playing the role of physical barriers that might facilitate the isolation of hosts and consequently parasite populations between these ecozones (de Meêus et al. 1998, Bozick and Real 2015). In

contrast, a high gene flow and scarce differentiation within population of each ecozone were observed; our data of huge gene flow between samples suggest that *T. gondii* in the Pacific coastal region acts like a metapopulation (ensemble of interacting populations with a finite lifetime) and it implies a link with the processes of population turnover, extinction, and establishment of new populations (Levins 1969, Hanski and Gilpin 1991).

A recent study performed in cats of different locations of Colima also shows the existence of a type I gene pool in this Neotropical ecozone (Rico-Torres et al. 2015). In contrast, studies with animals performed in the northern state of Durango, Mexico, placed in the Nearctic area showed dominance of the clonal Type III lineage (Dubey et al. 2004, 2009).

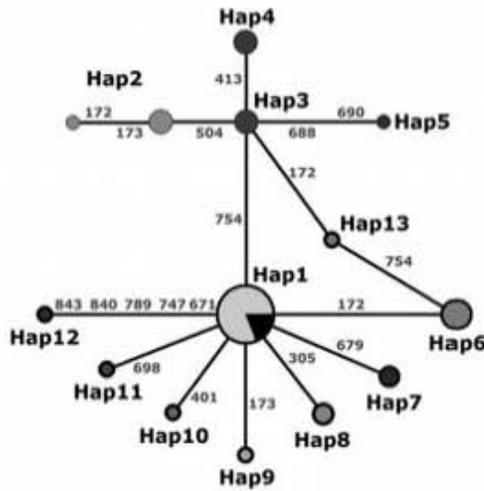


FIG. 2. Haplotype network of the *B1* gene sequences. Pie chart sizes are proportional to haplotype frequencies. Haplotypes (Hap) identified in the present study are represented by pie charts with bold outline, whereas those from online databases are delimited by thin lines. The black portion in the type 1 chart indicates those sequences from online databases. Numbers indicate single nucleotide polymorphism positions within the 2214 bp tandem of the *B1* gene.

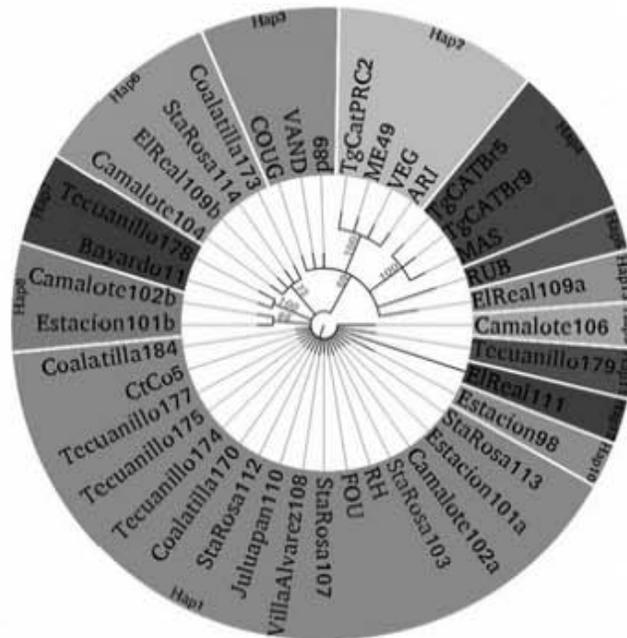
Although the presence of geographical barriers strengthens the separation of parasite populations between Nearctic and Neotropical ecozones, it is logical to assume that gene flow might be occurring within those available convergence zones. In the neighboring states of Colima and Michoacán, a stratified prevalence on sheep flocks related to the altitude has been found; in the former, rates were higher in lowlands than in highlands, whereas in the latter, an opposite phenomenon was described (Caballero-Ortega et al. 2008, Alvarado-Esquivel et al. 2013), showing the relevance of the local biomes for transmission and epidemiology of this parasite. Furthermore, the role of the definitive host in the transmission of the infection in this area should be emphasized.

In this regard, an epidemiological survey in cats from urban and periurban microzones of Colima City showed that prevalence was mainly related to raw meat consumption, as opposed to commercial food feeding (García-Márquez et al. 2007). In addition, ToxoDB #28 was demonstrated in the first genetically characterized *T. gondii* isolate from Colima, which was different from others of the country, but similar to those of USA, Brazil, and Colombia (Howe and Sibley 1995, Dubey et al. 2006, 2008, Rico-Torres et al. 2015).

Although our data suggest clonality within population of a given ecozone, when the π , Θ , H_{ST} , and N_m indexes were compared with sequences of strains from NA and SA, the results exhibited a lower differentiation between the Pacific coastal region and the SA, than between Colima and NA, suggesting similitude of biomes along the Neotropical ecozone of Central and South America.

Downloaded by 177.234.2.94 from online.liebertpub.com at 07/17/17. For personal use only.

FIG. 3. Phylogenetic tree of all sequences with the MrBayes algorithm. Clustering of haplotypes (Hap1 to Hap13) found in semicaptive sheep from Colima and their relationship with reference strain sequences. Numbers indicate support values for each cluster; the reference numbers or name of strains are placed at the end of each branch; bold names represent sequences from this study. Haplotype code names match those in Figures 1 and 2.



An initial plus stated for the present study was to genotype without isolation in mice. As it is known, isolation success in rodents depends on the virulence and parasite load, avirulent strains resulting in chronic infections with a low number and nonhomogeneous tissue cyst distribution, whereas virulent parasites give rise to rapid host death because of a disseminated toxoplasmosis. Thus, this approach could bias isolation to certain strains over others (Lindström et al. 2008, Sibley et al. 2009), and real genetic variability may be underestimated, resulting in descriptions of clonal populations.

To avoid this bias, the first-approach direct genotyping, like the one performed herein, can be used. Before DNA extraction, we attempted to concentrate tissue cysts from host tissue to increase parasite DNA and improve PCR-based results; however, genotyping from direct DNA analysis was rather difficult. These results might be influenced by several factors, such as number, distribution, and age of the tissue cysts, copy number of the loci used and parasite DNA required to sequencing, as well as the age of the sheep analyzed (Lundén et al. 1994, Dubey 1998, Lindström et al. 2008, Sibley et al. 2009, Costa and Bretagne 2012, Robert-Gangneux and Darde 2012).

BI gene genotyping presents some advantages over those single-copy multilocus approaches due to its simplicity, higher sensitivity, cost effectiveness, and reproducibility, without the need for isolation. However, in comparison with single-copy markers, it lacks genotyping resolution, so results must be interpreted with caution, since sequencing alone cannot differentiate polymorphisms from coinfections (Sibley et al. 2009, Su et al. 2010).

Certainly, there is a limited understanding of how genetic polymorphisms influence virulence or parasite epidemiology in *T. gondii*; therefore, we propose that *BI* gene could be used as a first approach marker for screening prevalent genotypes in new hosts or landscapes. Then, finer multilocus nested PCR-restriction fragment length polymorphism-sequence analysis (Su et al. 2010) can be attempted in conjunction with the methodology to concentrate intramuscular tissue cysts used in the present study.

Conclusion

We identified new genotypes related to the type I lineage of *T. gondii* by direct DNA analysis using the *BI* locus, infecting sheep destined for human consumption in a Pacific coastal region from Mexico. In this area, Nearctic and Neotropical ecozones converge, landscaping to parasite populations as a metapopulation, maintaining some levels of gene flow with populations from South America.

Acknowledgments

This work was supported by INP grant 013/2012 for sampling collection, analysis, and interpretation of the data, as well as writing and publication of this article. Williams Arony Martínez-Flores is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships 245622 and 22961 (CB-2011/168619) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ajzenberg D, Bañuls A-L, Tibayrenc M, Dardé ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 2002; 32:27–38.
- Alvarado-Esquivel C, Silva-Aguilar D, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Michoacán State, Mexico. *Prev Vet Med* 2013; 112:433–437.
- Ambrose-Thomas P. Emerging parasite zoonoses: The role of host-parasite relationship. *Int J Parasitol* 2000; 30:1361–1367.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Medians-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 37–48.
- Bozick BA, Real LA. The role of human transportation networks in mediating the genetic structure of seasonal influenza in the United States. *PLoS Pathog* 2015; 11:e1004898.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1787–1792.
- Caballero-Ortega H, Palma JM, García-Márquez LJ, Gildo-Cárdenas A, et al. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology* 2008; 135:1385.
- Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Peláez C, et al. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: Analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106:653–659.
- Ceballos G, Oliva G. (Eds.). *Los mamíferos silvestres de México*/Gerardo Ceballos, Gisselle Oliva, coordinadores. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, 2005.
- Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Salas-Garrido CG, Correa D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Vet Parasitol* 2011; 180:368–371.
- Costa J-M, Bretagne S. Variation of *BI* Gene and *AF146527* repeat element copy numbers according to *Toxoplasma gondii* strains assessed using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2012; 50:1452–1454.
- Daszak P. Emerging infectious diseases of wildlife—Threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; 287:443–449.
- de Meeüs T, Michalakakis Y, Renaud F. Santa Rosalia revisited: Or why are there so many kinds of parasites in ‘The Garden of Earthly Delights’? *Parasitol Today* 1998; 14:10–13.
- Długońska H. *Toxoplasma gondii* and the host cells. *Ann Parasitol* 2014; 60:83–88.
- Dubey J. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1998; 28:1019–1024.
- Dubey JP. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 1970; 132:636–662.
- Dubey JP, Alvarado-Esquivel C, Herrera-Valenzuela VH, Ortiz-Díaz JJ, 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. *Vet Parasitol* 2013; 197:674–677.

- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1970; 56: 447.
- Dubey JP, Morales ES, Lehmann T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J Parasitol* 2004; 90:411–413.
- Dubey JP, Su C, Cortés JA, Sundar N, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet Parasitol* 2006; 141:42–47.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *J Parasitol* 2009; 95:319–322.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HPJ, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 157:299–305.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998; 8: 186–194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998; 8:175–185.
- FigTree. (n.d.). Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- fluxus-engineering.com. (n.d.). Available at www.fluxus-engineering.com/
- Fosberg FR. A Classification of the Biogeographical Provinces of the World, by M. D. F. Udvardy. (IUCN Occasional Paper 18.) International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Morges, Switzerland: 49 pp., maps, 29×20×0.4cm (mimeogr., no price indicated), 1975. *Environ Conserv* 1976; 3:313.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as Coccidian oocysts. *Science* 1970; 167:893–896.
- García-Márquez LJ, Gutiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico. *J Parasitol* 2007; 93:1527–1528.
- Gordon D, Abajian C, Green P. *Consed*: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 1998; 8:195–202.
- Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th edition). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- 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. *J Clin Microbiol* 2001; 39:398–400.
- Grogan LF, Berger L, Rose K, Grillo V, et al. Surveillance for emerging biodiversity diseases of wildlife. *PLoS Pathog* 2014; 10:e1004015.
- Hanski I, Gilpin M. Metapopulation dynamics: Brief history and conceptual domain. *Biol J Linn Soc* 1991; 42:3–16.
- Hartl DL, Clark AG. *Principles of Population Genetics* (4th edition). Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 2007.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995; 172:1561–1566.
- Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104:14872–14877.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23:2947–2948.
- Levine ND. Taxonomy of *Toxoplasma*. *J Protozool* 1977; 24: 36–41.
- Levins R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull Entomol Soc America* 1969; 15:237–240.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009; 25:1451–1452.
- Lindström I, Sundar N, Lindh J, Kironde F, et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology* 2008; 135: 39–45.
- Lundén A, Näsholm A, Uggla A. Long-term study of *Toxoplasma gondii* infection in a Swedish sheep flock. *Acta Vet Scand* 1994; 35:273–281.
- Maddison DR, Maddison WP. Chromaseq: A Mesquite package for analyzing sequence chromatograms. (Version 1.2). 2016a. Available at <http://mesquiteproject.org/packages/chromaseq>
- Maddison WP, Maddison DR. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. (Version 3.10). 2016b. Available at <http://mesquiteproject.org>
- Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J Parasitol* 1972; 58:928.
- Morrone JJ. Biogeographical regionalisation of the world: A reappraisal. *Aust Syst Bot* 2015; 28:81.
- Olson DM, Dinerstein E. The Global 200: A representation approach to conserving the Earth's most biologically valuable ecoregions. *Conserv Biol* 1998; 12:502–515.
- Olson DM, Dinerstein E, Wikramanayake ED, Burgess ND, et al. Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on earth. *BioScience* 2001; 51:933.
- Polley L. Navigating parasite webs and parasite flow: Emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife origin. *Int J Parasitol* 2005; 35:1279–1294.
- Rico-Torres CP, Del Viento-Camacho A, Caballero-Ortega H, Besné-Mérida A, et al. First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: Tissue distribution and genetic characterization. *Vet Parasitol* 2015; 209:125–128.
- Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, et al. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal *Toxoplasmosis* in Mexico. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:411–413.
- Robert-Gagneux F, Darde M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for *Toxoplasmosis*. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:264–296.
- Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30:1369–1377.
- Roche B, Guégan J-F. Ecosystem dynamics, biological diversity and emerging infectious diseases. *C R Biol* 2011; 334:385–392.
- Rodríguez-Prado U, Jiménez-González DE, Avila G, González AE, et al. Genetic variation of *Echinococcus canadensis* (G7) in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91: 1149–1153.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 2012; 61: 539–542.
- Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2009; 364:2749–2761.

- Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109:5844–5849.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 2010; 137:1.
- Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 2006; 36: 841–848.
- Thompson RCA, Lymbery AJ. (Eds.). *Echinococcus and Hydatid Disease*. Oxon: Cab, 1995.
- VanWormer E, Miller MA, Conrad PA, Grigg ME, et al. Using molecular epidemiology to track *Toxoplasma gondii* from terrestrial carnivores to marine hosts: Implications for public health and conservation. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2852.
- Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, et al. [Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico]. *Salud Pùbl México* 1992; 34:222–229.
- Wendte JM, Gibson AK, Grigg ME. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Vet Parasitol* 2011; 182:96–111.

MARTÍNEZ-FLORES ET AL.

Address correspondence to:

Pablo Maravilla
 Departamento de Ecología de Agentes Patógenos
 Hospital General "Dr. Manuel Gea González"
 Calzada de Tlalpan 4800
 Col. Sección XVI, C.P. 14080
 Delegación Tlalpan
 Ciudad de México
 México

E-mail: maravillap@yahoo.com

Dolores Correa
 Laboratorio de Inmunología Experimental
 Instituto Nacional de Pediatría
 Insurgentes Sur No. 3700-C
 Col. Insurgentes Cuicuilco
 Delegación Coyoacán, C.P. 04530
 Ciudad de México
 México

E-mail: mariadol@yahoo.com