



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**GENOTIPOS DE *Toxoplasma gondii* EN CARNÍVOROS DEL
SURESTE MEXICANO**

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

**PRESENTA:
LUIS FERNANDO VALENZUELA MORENO**

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTOR:
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

DR. DIEGO SANTIAGO ALARCÓN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

El proyecto se realizó con el apoyo de la M.V.Z. Gabriela Lara Martínez del Parque Eco-arqueológico Xcaret y la MPA María Eréndira Reyes Martínez de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNACH de donde se obtuvieron las muestras evaluadas durante el estudio; la M. en C. Sara Teresa Méndez Cruz del laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría donde se realizaron los ensayos de clonación; el H.T. José Eduardo Farfán Morales del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Pediatría donde se procesaron los cortes para histopatología; la Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, Dra. Solange Maria Gennari y la M. en C. Bruna Farias Alves de la Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil donde se realizó la genotipificación mediante microsatélites y análisis bioinformáticos.

Trabajo financiado con Recursos Fiscales del Programa E022 Investigación y Desarrollo Tecnológico en Salud mediante los proyectos “Polimorfismo genético y filogeografía de *Toxoplasma gondii* en diferentes regiones climáticas de México” registro INP 013/2012 y “Diversidad genética de *Toxoplasma gondii* en hospederos definitivos e intermediarios del sureste mexicano”. Parcialmente financiado por CONACyT, proyectos 139721 y A1-S-21955.

Alumno becario del CONACyT, de agosto de 2015 a julio de 2019 con número de registro 421186.

Dedicatoria

A Pacho y el Gato por que sin su apoyo, paciencia, esfuerzo, tiempo, dinero estaría a punto de lograr un objetivo más en mi vida.

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

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

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

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

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

A Mom, Pili, Ra y a todos los miembros de la familia Lacy, porque siempre me han recibido con los brazos abiertos y me han aceptado como un miembro más de su familia

Y muy especialmente a Lolo y Chelo, que aunque ya no están conmigo en este momento, me acompañaron desde mi formación como Médico Veterinario, Maestro y ahora Doctor. A ustedes les agradezco infinitamente que siempre estuvieron a mi lado y me animaron. Más adelante nos volveremos a reunir...

Agradecimientos

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

A mis tutores y mentores el M. en C. Heriberto Caballero y la Dra. Correa que me ayudaron y orientaron lo necesario para poder llevar a cabo este proyecto; sin su punto de vista objetivo no hubiera podido terminar este trabajo y crecer tanto en lo profesional como lo profesional.

Al Dr. Antonio Verdugo por permitirme integrarme al seminario del laboratorio de Microbiología Molecular y por sus comentarios que me ayudaron a mejorar cada semestre.

Al Dr. Diego Santiago por todos los comentarios, críticas y aportaciones al desarrollo del proyecto.

A Carlos, que más que compañero de laboratorio es mi asesor y amigo. Muchas gracias por todo y finalmente... ¡tenías razón!

A todos mis compañeros del LIE (Belinda, Irma, Héctor, Claus, Lulú, Tocayo, Fernanda, Mónica A., Lizbet, Anita y José Antonio), por que cada uno de ustedes me enseñó y ayudó siempre en el día a día.

Karinne, muito obrigado por toda a sua atenção e por abrir as portas de sua residência junto de sua família. E por disponibilizar o seu tempo, no breve período em que passei em São Paulo.

Renato, muito obrigado por ser o grande intermediador com todos, no laboratório! E por estar sempre ao meu lado quando precisei. Obrigado!

Doutoras Solange e Hilda: Agradeço imensamente por me receberem no laboratório e poderem compartilhar os seus conhecimentos.

A Clarita por todo el apoyo, ayuda y amistad que me ha brindado durante mi maestría y doctorado.

Al jurado de mi examen por la revisión y comentarios que ayudaron a enriquecer mas este trabajo de investigación: Dr. Guillermo Salgado Maldonado, Dra. Guillermina Ávila Ramírez, Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito y Dra. Guadalupe Prado Ochoa.

Resumen

La toxoplasmosis es una zoonosis causada por *Toxoplasma gondii*, que es capaz de infectar cualquier animal homeotermo incluido el ser humano. Hasta la fecha, se han descrito 298 genotipos en todo el mundo. La caracterización genética del parásito es de suma importancia porque el genotipo del parásito puede determinar la presentación y la gravedad de la toxoplasmosis. Según la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 2000 y 2006, el sureste mexicano tiene una frecuencia de infección de más del 70% en humanos y otros animales; además, hay siete especies de felinos, incluidos los gatos domésticos; por lo tanto, la hipótesis de esta tesis fue que esta región podría tener una alta diversidad genética. El objetivo del presente trabajo fue genotipificar a *T. gondii* y describir su diversidad genética a partir de gatos ferales y perros callejeros infectados de manera natural de los estados de Quintana Roo y Chiapas. Se capturaron once gatos ferales y once perros callejeros y se les tomó muestra de sangre para obtener la capa leucoplaquetaria; posteriormente fueron sometidos a manejo de eutanasia para obtener tejidos de órganos y extraer DNA. Las muestras fueron procesadas para diagnóstico por PCR y se genotipificó mediante PCR-RFLP de 10 marcadores de gen único y 15 microsatélites. Los productos atípicos de los genes *SAG3* y *GRA6* se clonaron y secuenciaron. Diez gatos y once perros fueron positivos por PCR en sangre; siete gatos y cuatro perros tuvieron infecciones mixtas. Además, se obtuvieron cuatro aislamientos de dos gatos y dos perros. Se detectaron al menos 27 genotipos diferentes, de los cuales 20 son nuevos en todo el mundo. A partir de la clonación y secuenciación del producto atípico del gen *GRA6*, se descubrió una infección mixta, debido a una cepa idéntica a GT1 y otra a la cepa VAND. Se identificó un nuevo alelo atípico para el marcador *SAG3*; la clonación y secuenciación revelaron otra infección mixta por una cepa idéntica a GT1 y otra recombinante intragénica I × II. El análisis de microsatélites reveló que los aislamientos obtenidos de los perros son atípicos. En conclusión, la diversidad genética de *T. gondii* en la región es alta y diferente de la de otras regiones, con genotipos nuevos exclusivos de México y algunos otros compartidos con Estados Unidos y Sudamérica. En las dos regiones estudiadas se encontró casi 70% de infecciones mixtas (hasta séptuples).

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, gatos ferales, perros callejeros, genotipificación, cepas atípicas, infecciones mixtas, Quintana Roo, Chiapas.

Abstract

Toxoplasmosis is a zoonosis caused by *Toxoplasma gondii* that infects homeothermic animals, including humans. To date, as many as 298 genotypes have been described worldwide. Genetic characterization of the parasite is crucial because the parasite type can determine the presentation and severity of toxoplasmosis. According to the last national serosurvey, the Southeast region of Mexico has a frequency of infection over 70% in humans and other animals; moreover, there are seven species of felids, including domestic cats; accordingly, we hypothesized that this might be a region with a high diversity of the parasite. Thus, the aim of this study was to genotype *T. gondii* from naturally infected feral cats and stray dogs of Quintana Roo and Chiapas, and to describe its genetic diversity. Eleven feral cats and eleven stray dogs were captured and bled to obtain the buffy coat; then, they were euthanized to collect target organs or tissues to extract DNA. Samples were processed by PCR for diagnosis, and ten polymorphic markers were genotyped by PCR-RFLP and 15 by microsatellite analysis. Atypical *SAG3* and *GRA6* gene products were cloned and sequenced. Ten cats and eleven dogs were PCR positive for toxoplasmosis in blood; of these, seven cats and four dogs had mixed infections. Also, four isolates were obtained from two cats and two dogs. At least 27 different genotypes were detected, from which 20 are new worldwide. From the atypical *GRA6* gene cloning and sequencing analysis, a mixed infection was discovered, due to one strain identical to GT1 and another to VAND. A new RFLP atypical allele for the *SAG3* marker was observed; cloning and sequencing analysis of this locus revealed another mixed infection by a strain identical to GT1, and one type I × II intragenic recombinant. The microsatellite analysis revealed that both dog isolates are atypical. In conclusion, *T. gondii* genetic diversity in the region is high and different from that of other regions, with new genotypes exclusive to México and some others shared with USA and South America. In the two regions studied, almost 70% of mixed infections were found (up to sevenfold).

Keywords: *Toxoplasma gondii*, feral cats, stray dogs, genotyping, atypical strains, mixed infections, Quintana Roo, Chiapas.

Contenido

	Página
1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Antecedentes históricos	2
1.3 Biología	3
1.4 Ciclo de vida	3
1.5 Transmisión	6
1.6 Invasión celular	7
1.7 Respuesta inmune contra <i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.8 Presentaciones clínicas de la toxoplasmosis	14
1.8.1 Adultos y niños inmunocompetentes	14
1.8.2 Toxoplasmosis ocular	14
1.8.3 Pacientes inmunocomprometidos	15
1.8.4 Toxoplasmosis congénita	15
1.8.5 Toxoplasmosis en perros y gatos	16
1.8.6 Toxoplasmosis en fauna silvestre	16
1.9 Genética y diversidad genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
1.9.1 Genotipificación	17
1.9.2 Microsatélites	18
1.9.3 PCR-RFLP	18
1.9.4 Tipificación multilocus de secuencias (MLST)	19
1.9.5 Análisis de fusión de alta resolución (HRM)	19
1.9.6 Estructura poblacional de <i>T. gondii</i>	19
1.9.7 Factores que influyen en la diversidad genética de <i>T. gondii</i>	22
1.9.8 Diversidad genética de <i>T. gondii</i> en México	24
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivo General	28
4.1 Objetivo Particular	28

5. Metodología	29
5.1 Procedencia de las muestras	29
5.2 Técnicas de laboratorio	30
5.2.1 Histopatología	30
5.2.2 Inmunohistoquímica	30
5.2.3 ELISA indirecto	31
5.2.4 Aislamiento en ratón	32
5.2.5 Diagnóstico molecular y genotipificación	33
5.2.5.1 Extracción de DNA	33
5.2.5.2 PCR en punto final	33
5.2.5.3 PCR en tiempo real	34
5.2.5.4 Genotipificación	34
5.2.6 Clonación y secuenciación	35
5.2.7 Análisis bioinformático	36
6. Resultados	37
6.1 Playa del Carmen, Quintana Roo	37
6.1.1 Histopatología	37
6.1.2 Serología	41
6.1.3 Bioensayo en ratón	41
6.1.4 PCR punto final y tiempo real	41
6.1.5 Carga parasitaria en sangre de gatos ferales de Quintana Roo	42
6.1.6 Genotipificación por PCR-RFLP	42
6.1.7 Clonación y secuenciación	43
6.2 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	50
6.2.1 Histopatología	50
6.2.2 Serología	50
6.2.3 Bioensayo en ratón	50
6.2.4 PCR punto final y tiempo real	50
6.2.5 Cuantificación de la carga parasitaria en sangre de perros ferales de Chiapas	50

6.2.6 Genotipificación mediante PCR-RFLP	51
6.2.7 Clonación y secuenciación	52
6.2.8 Genotipificación de aislamientos de <i>T. gondii</i> mediantes microsatélites	54
6.3 Bioinformática	57
6.3.1 Red filogenética de <i>T. gondii</i> (RFLP)	57
6.3.2 Análisis de genealogía	58
7. Discusión	61
7.1 Serología	61
7.2 Biología molecular	62
7.2.1 Determinación de carga parasitaria	64
7.2.2 Genotipificación mediante PCR-RFLP	64
7.2.3 Genotipificación mediante microsatélites	68
7.2.4 Clonación y secuenciación	68
7.2.5 Bioinformática	70
7.2.6 Histopatología	71
8. Conclusiones	74
9. Productos del doctorado	74
9.1 Publicaciones derivadas del proyecto de investigación	74
9.2 Publicaciones como colaborador	75
9.3 Publicaciones en bases de datos internacionales de DNA	75
10. Referencias	77
Anexo 1: Histopatología	94
Anexo 2: Protocolo de inmunohistoquímica para detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	96
Anexo 3: ELISA indirecto para detección de anticuerpos IgG Anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	98
Anexo 4: Extracción de DNA genómico a partir de tejidos	99
Anexo 5: Biología molecular	100
Anexo 6: Soluciones	104
Anexo 7: Publicaciones	106

Lista de cuadros

	Página
Cuadro 1. Composición del genoma de <i>Toxoplasma gondii</i> en comparación con otros apicomplexa.	17
Cuadro 2. Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> descritos en México.	25
Cuadro 3. Resultados de serología y PCR de gatos.	41
Cuadro 4. Genotipos de <i>T. gondii</i> en sangre de gatos ferales de Quintana Roo.	49
Cuadro 5. Resultados de serología y PCR de perros.	55
Cuadro 6. Genotipos de <i>T. gondii</i> en sangre de perros callejeros de Chiapas.	56
Cuadro 7. Genotipificación de aislamientos de <i>T. gondii</i> de perros ferales de Chiapas mediante microsatélites.	53
Cuadro Anexo1. Iniciadores para la genotipificación mediante MnPCR-RFLP (Su et al., 2010).	102
Cuadro Anexo 2. Iniciadores para la genotipificación mediante microsatélites (Ajzenberg et al., 2010).	103

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. División de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> en el interior de células VERO.	1
Figura 2. Ciclo sexual de <i>Toxoplasma gondii</i> .	4
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .	6
Figura 4. Invasión de <i>Toxoplasma gondii</i> a la célula huésped.	9
Figura 5. Susceptibilidad a la presentación clínica de la toxoplasmosis en animales domésticos y silvestres.	10
Figura 6. Procesamiento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> en células dendríticas.	12
Figura 7. Estructura genética de los aislamientos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	22
Figura 8. Genotipos de <i>T. gondii</i> descritos en México a partir de aislamientos y muestras clínicas obtenidas de animales domésticos, silvestres y humanos.	26
Figura 9. Estrategia general del proyecto de investigación.	29
Figura 10. Inmunohistoquímica de sección de hígado (gato 1) con pseudoquiste de <i>T. gondii</i> .	38
Figura 11. Inmunohistoquímica de sección de hígado (gato 1) con zona de infiltrado inflamatorio.	39
Figura 12. Inmunohistoquímica de sección de bazo (gato 2) con presencia de pseudoquistes de <i>T. gondii</i> .	40
Figura 13. Patrones de PCR-RFLP representativos de infección mixta de <i>T. gondii</i> en sangre de gatos ferales.	43
Figura 14. PCR-RFLP del marcador <i>GRA6</i> de <i>T. gondii</i> .	44
Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias del locus <i>GRA6</i> de <i>T. gondii</i> .	45

Figura 16. RFLP para el gen <i>SAG3</i> del producto de 226 pb de los gatos 3 y 6 en los que se evidenció infección mixta.	45
Figura 17. RFLP para el gen <i>SAG3</i> del producto de 226 pb de las clonas obtenidas a partir de la muestra de sangre del gato 3 de Playa del Carmen.	45
Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias del locus <i>SAG3</i> de <i>T. gondii</i> .	46
Figura 19. RFLP para el gen <i>SAG3</i> del producto de 226 pb de las clonas obtenidas a partir de la muestra de sangre del gato 6 de Playa del Carmen.	47
Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias del locus <i>SAG3</i> de <i>T. gondii</i> .	48
Figura 21. Patrones de PCR-RFLP representativos de infección mixta de <i>T. gondii</i> en sangre de perros ferales.	52
Figura 22. Patrones de PCR-RFLP y digestión virtual del gen <i>SAG3</i> de <i>T. gondii</i> a partir de clonas bacterianas transformadas con productos de amplificación del perro 2.	53
Figura 23. Alineamiento múltiple de secuencias del locus <i>SAG3</i> de <i>T. gondii</i> .	53
Figura 24. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR múltiplex de 15 microsatélites del aislamiento obtenido del perro 3 (TgDogMxChp3).	54
Figura 25. Red filogenética de aislamientos de México y cepas representativas de los haplogrupos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	58
Figura 26. Red de haplotipos obtenida con el método de parsimonia estadística con base en las secuencias del gen <i>GRA6</i> de <i>T. gondii</i> .	59
Figura 27. Red de haplotipos obtenida con el método de parsimonia estadística con base en las secuencias del gen <i>SAG3</i> de <i>T. gondii</i> .	60
Figura 28. Distribución geográfica de los genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> en México.	73

1. Introducción

1.1 Generalidades

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

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

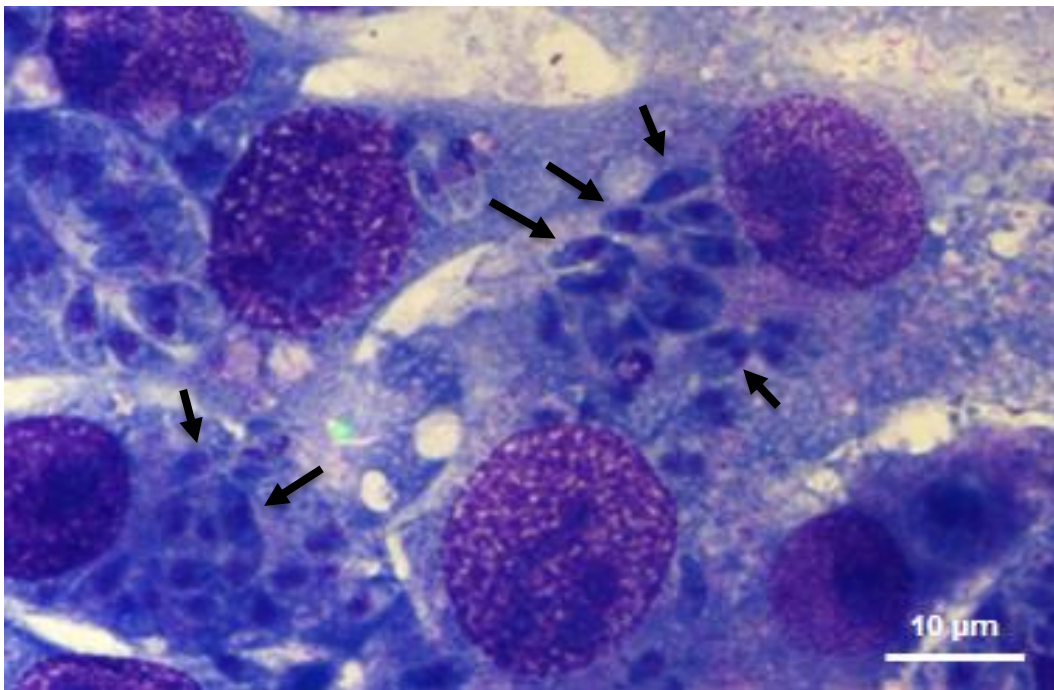


Figura 1. División de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* en el interior de células VERO. Los taquizoítos de *T. gondii* están señalados con flechas negras. Tinción de Wright. Foto cortesía de Héctor Luna Pastén, Laboratorio de Inmunología Experimental.

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

infectada con quistes tisulares o por agua contaminada con ooquistes. Los omnívoros, como el ser humano y el cerdo, tienen muchas posibilidades de contagio, ya que presentan los riesgos de los herbívoros y los carnívoros (Tenter et al., 2000). La susceptibilidad a la presentación clínica de la enfermedad varía dependiendo de la especie, ya que algunas raramente desarrollan la toxoplasmosis, mientras que otras son particularmente susceptibles, en muchas ocasiones con consecuencias fatales. Los signos clínicos pueden variar entre especies, pero principalmente son: diarrea, dificultad respiratoria, emaciación, ceguera, problemas neurológicos y muerte súbita (Miller et al., 2003). La patogenicidad de *T. gondii* varía como consecuencia de su virulencia y del estadio y dosis infectiva, así como del estado de salud y el fondo genético del hospedero (Dubey et al., 2004a; Pena et al., 2008). La virulencia se debe a la capacidad de los taquizoitos de invadir células, dividirse y causar lisis tisular. Ciertos alelos de genes relacionados con estos fenómenos han sido asociados a virulencia; por ejemplo, los alelos tipo I y II que codifican la proteína que codifica el gen *ROP18* participa en la fosforilación de las GTPasas relacionadas a la inmunidad (IRGs) que normalmente se unen a la vacuola parasitófora y su posterior inactivación, mientras que el alelo tipo III tiene una inserción en la región del promotor que atenúa la expresión del gen. La acción de *ROP18* por sí sola no es suficiente para evitar la acción de las IRGs en la membrana de la vacuola parasitófora, por lo que necesita de la pseudocinasa *ROP5* para regular su función, en este caso los alelos que tipo I y III son virulentos (en combinación con alelos funcionales de *ROP18*), mientras que el tipo II es avirulento sin importar que tipo de alelo *ROP18* porte la cepa (Reese y Boothroyd, 2011).

1.2 Antecedentes históricos

Toxoplasma gondii fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux, en bazo, hígado y sangre de gondis (*Ctenodactylus gundi*), roedores del norte de África. En el mismo año, Splendore descubrió al protozooario en tejidos de conejos de laboratorio en Brasil y Darling en Panamá, identificó quistes tisulares en humanos, denominándolos *Sarcosporidis* en ese tiempo. Nicolle y Manceaux

denominaron al género *Toxoplasma* debido a la morfología que presentan los protozoarios y *gondii* por el animal en el que lo encontraron (Black y Boothroyd, 2000; Kim y Weiss, 2009; Nicolle y Manceaux, 1909; Sukthana, 2006; Tenter et al., 2000).

1.3 Biología

Toxoplasma gondii pertenece al Phylum Apicomplexa (protozoarios que presentan complejo apical), Clase Aporozoasida, Subclase Coccidiasina, Orden Eucoccidiorida y Familia Sarcocystidae; describiéndose solamente una especie para el género (Montoya y Liesenfeld, 2004). Este Phylum de protozoarios abarca más de 5000 especies de parásitos intracelulares obligados, donde se encuentran otros protozoarios responsables de desarrollar enfermedad en animales y humanos, como son *Plasmodium*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cyclospora*, *Theileria* y *Eimeria* entre otros (Gardiner, 1988; Khan et al., 2005; Nishi et al., 2008; Saeij et al., 2005; Sibley, 2003).

1.4 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* es indirecto, cualquier miembro de la familia Felidae (felinos domésticos y silvestres) son los huéspedes definitivos y cualquier animal de sangre caliente, incluido el ser humano actúa como huésped intermediario (Dubey, 2010; Tenter et al., 2000).

En el intestino de los huéspedes definitivos se desarrolla la fase sexual, típica de todas las coccidias, que culmina con la producción de millones de esporozoítos contenidos en ooquistes que se liberan al medio. En los huéspedes intermediarios se efectúa la fase de reproducción extra-intestinal o asexual que culmina con la producción de quistes tisulares, repletos de bradizoítos; ambas formas son infectantes (Bowman, 2008; Dubey, 2010; Levine, 1988).

La reproducción sexual (**Figura 2**) tiene básicamente tres fases, dos que se desarrollan en el intestino delgado de los felinos, que reciben el nombre de esquizogonia y gametogonia y una fase que sucede en el ambiente conocida

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

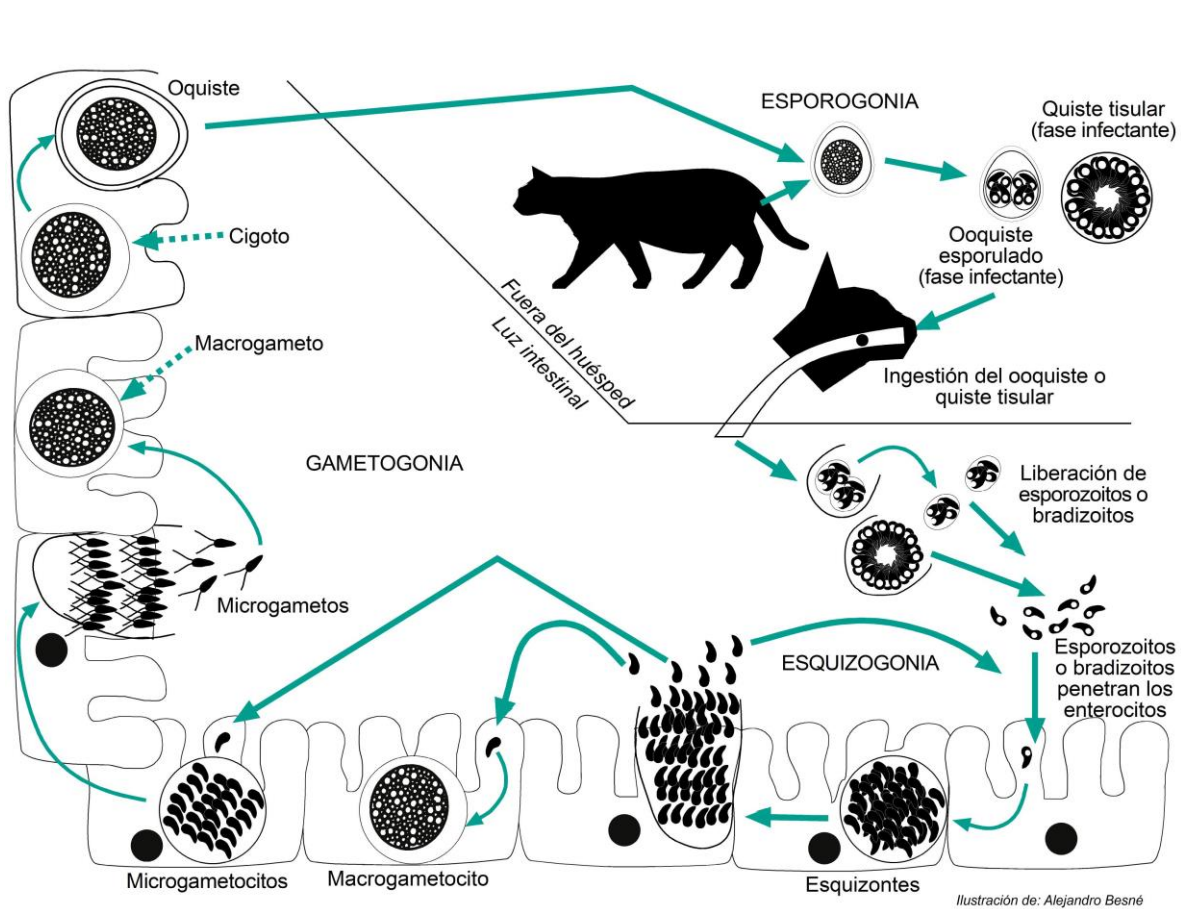


Figura 2. Ciclo sexual de *Toxoplasma gondii*. El quiste tisular es adquirido de los tejidos de huéspedes intermediarios y definitivos infectados. La esquizogonia se repite hasta 5 veces, antes de que los esquizontes se vuelvan microgametocitos (masculinos) o macrogametocitos (femeninos). La esporogonia se realiza en 24 a 48 horas dependiendo de la temperatura y la humedad ambiental. Ilustración original de Besné-Mérida (2010).

Una vez que el ooquiste esporula, puede ser ingerido por otro huésped; si éste es intermediario, los esporozoítos contenidos en los ooquistes atravesarán la pared intestinal y se diferenciarán a un estadio denominado taquizoíto, el cual se replica de manera rápida dentro de una vacuola parasitófora de cualquier célula nucleada por un mecanismo llamado endodiogenia, proceso en el que se forman dos células hijas en el interior de la célula madre usando los organelos y el citoesqueleto de ésta, para después separarse (Black y Boothroyd, 2000; Hu et al., 2006). Los taquizoítos se reproducen dentro de la célula huésped hasta destruirla y una vez liberados invaden otras células y repiten el proceso, el cual continúa hasta que el sistema inmune detiene la invasión (Black y Boothroyd, 2000; Dubey, 1998). En este punto, el parásito cambia nuevamente de forma, esta vez a un estadio denominado bradizoíto, que es una estructura similar al taquizoíto pero un poco más grande y de reproducción lenta. Los bradizoítos forman quistes principalmente en músculo estriado esquelético y cardíaco, sistema nervioso central, linfonodos, bazo, hígado y ojos, pero pueden hacerlo en cualquier otro tejido (Dubey, 1998; Tenter et al., 2000). Estos fenómenos también ocurren en los felinos simultáneamente al proceso de reproducción sexual en el intestino (Dubey, 2010).

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

El ciclo se completa cuando algún huésped potencial ingiere cualquiera de las fases mencionadas (**Figura 3**):

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

- Bradizoítos: Fase de reproducción asexual lenta que se encuentra en la etapa crónica de la enfermedad.

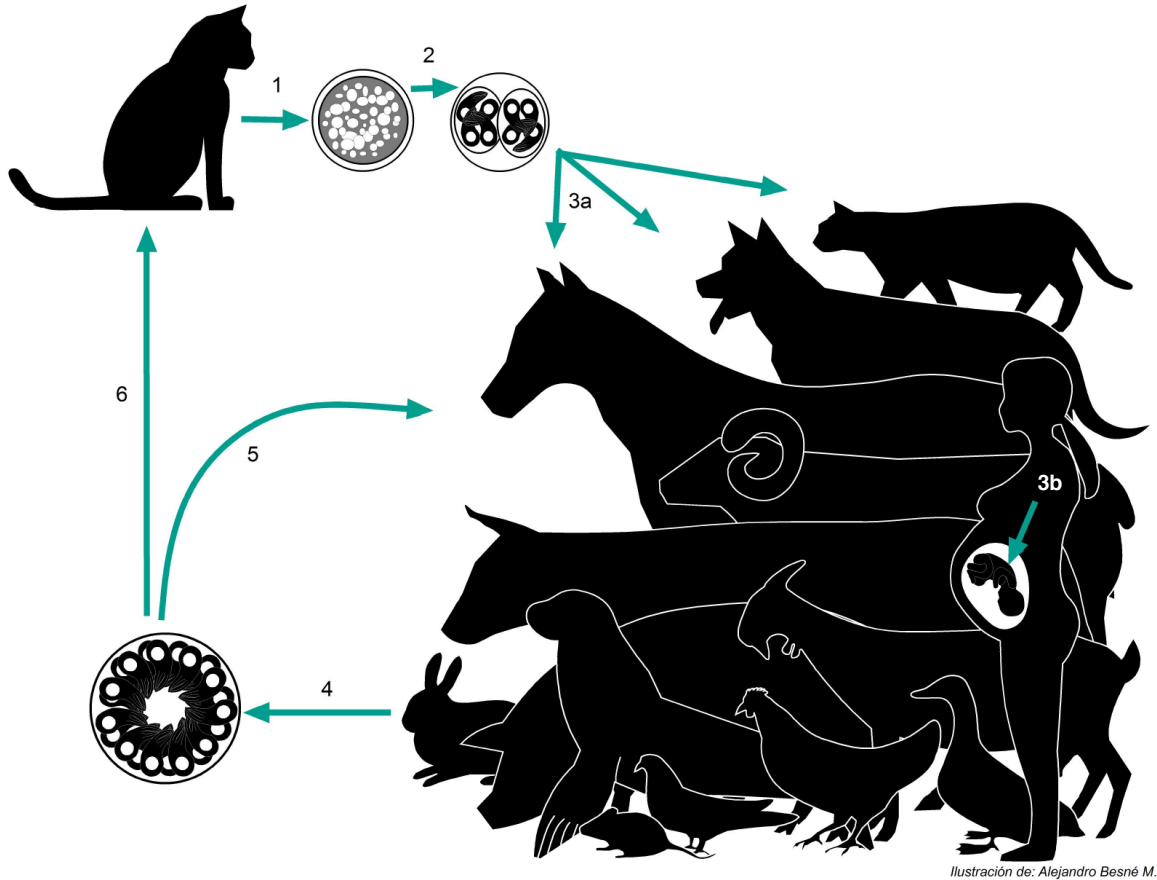


Figura 3. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. (1) Eliminación del oociste no esporulado, (2) Esporulación del oociste, (3a) Ingestión del oociste esporulado y comienzo de la reproducción sexual y asexual, (3b) transmisión placentaria, (4) Formación de los quistes tisulares, (5 y 6) ingestión del quiste tisular. Ilustración original de Besné-Mérida (2010).

1.5 Transmisión

Existen tres formas principales de transmisión de *T. gondii*, dos horizontales, por ingestión de tejidos con quistes y consumo de alimento o agua contaminada con oocistos y una vertical, transplacentaria (Dubey, 2009; Montoya y Liesenfeld, 2004; Tenter et al., 2000). También hay registros de infección ocasionada por trasplante de órganos y por consumo de leche sin pasteurizar (Tenter et al., 2000). Los felinos tanto domésticos como silvestres son muy importantes dentro de la cadena epidemiológica de *T. gondii*, debido a que son los únicos que eliminan oocistos en las heces. El periodo de eliminación de éstos en general es de 3 a 18

días, y varía según la fase ingerida y el estado inmunológico del felino, siendo más largo cuando la infección se origina por quistes tisulares y más corto cuando fueron ingeridos ooquistes esporulados (Dubey y Carpenter, 1993; Dubey, 1998; Greene, 2011).

1.6 Invasión celular

Toxoplasma gondii tiene la capacidad de invadir cualquier célula nucleada (se ha descrito que también puede invadir eritrocitos y salir de los mismos sin ocasionar lisis de la célula (Tanabe et al., 1979)) de organismos homeotermos. La invasión es un proceso activo que depende de la motilidad del parásito y la secreción secuencial de proteínas provenientes de organelos secretores como los micronemas, las roptrias y los gránulos densos. El primer paso es el anclaje del parásito a la membrana celular de la célula huésped mediante el reconocimiento de receptores de superficie (proteoglicanos) por los antígenos de superficie del parásito (SAG1, SAG2 y SAG3) y la posterior secreción de adhesinas dependientes de calcio de los micronemas, MIC2, los cuales reconocen los receptores en la célula y promueve la reorientación y anclaje del parásito (Blader et al., 2015; Carruthers y Boothroyd, 2007; Robert-Gangneux y Dardé, 2012). La invasión recae en la interacción compleja entre la superficie de la célula huésped y el parásito, en un proceso llamado “gliding” en el cual el parásito hace un movimiento de flexión y rotación, empuja la membrana celular y la invagina; la duración del proceso completo de entrada es de 15-30 segundos aproximadamente. *Toxoplasma gondii* forma una asociación estrecha entre su borde apical y la membrana celular de la célula llamado “unión móvil” (moving junction en inglés). Esta unión se mueve desde el borde apical hasta el polo posterior del parásito, induciendo la internalización de éste a la vacuola parasitófora, la cual es de tipo no fusogénica (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Durante este proceso los micronemas secretan la proteína AMA1 (antígeno de membrana apical 1), la cual se distribuye sobre toda la superficie del parásito; las roptrias secretan proteínas contenidas en el cuello de las mismas y se insertan en la membrana de la célula que será invadida. La formación de la membrana de la

vacuola parasitófora requiere de la secreción de proteínas del bulbo de las roptrias. Recientemente, se ha descrito la función principal de las proteínas pertenecientes a la familia ROP. Por ejemplo, ROP5 y ROP18 se asocian a la cara citosólica de la membrana de la vacuola parasitófora, tienen actividad de cinasas, y se relacionan con el crecimiento del parásito y su virulencia (Behnke et al., 2015; Robert-Gangneux y Dardé, 2012; Shwab et al., 2016); ROP16 es capaz de manipular la expresión de genes y de esta manera modificar la secreción de interleucinas (El Hajj et al., 2007).

Instantes después de la penetración de *T. gondii*, se secretan las proteínas provenientes de los gránulos densos (GRA's), las cuales modifican las condiciones de la vacuola parasitófora y reclutan a las mitocondrias y al retículo endoplásmico rugoso de la célula huésped, favoreciendo la obtención de nutrientes necesarios para la subsistencia y replicación del parásito. Durante el proceso de invasión la mayoría de las proteínas transmembranales son desmontadas de la membrana de la vacuola parasitófora; esto previene la fusión con lisosomas o cualquier otra vesícula citoplasmática. La secreción de los gránulos densos también promueve el desarrollo de una compleja red túbulo-vesicular que se extiende de la membrana de la vacuola hasta el lumen de la misma. Esta red participa en el intercambio de nutrientes del citosol de la célula y exportando proteínas o lípidos hacia la membrana de la vacuola o hacia el citosol de la célula invadida. Los taquizoítos se dividen en el interior de la vacuola parasitófora cada 6-9 horas mediante endodiogenia (Contreras-Ochoa et al., 2013; Robert-Gangneux y Dardé, 2012; **Figura 4**).

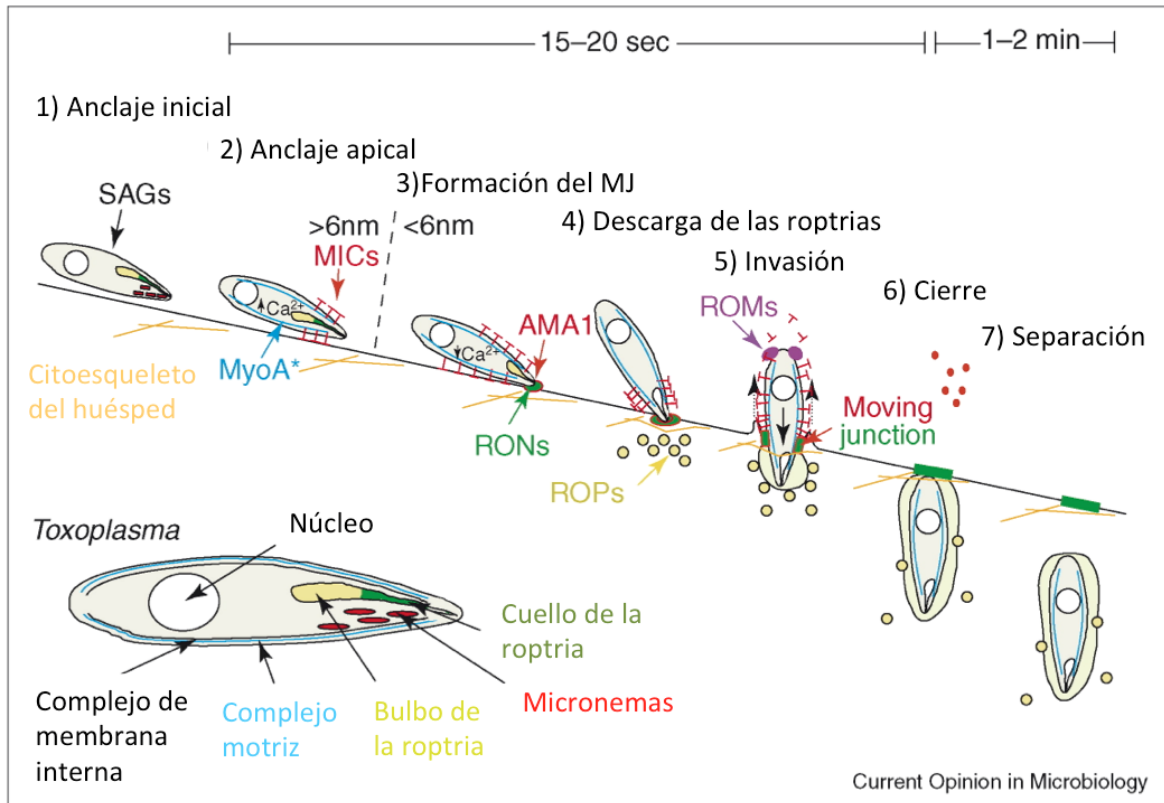


Figura 4. Invasión de *Toxoplasma gondii* a la célula huésped. El anclaje inicial comienza cuando los SAGs reconocen receptores de superficie en la célula. En seguida, las proteínas dependientes de calcio de los micronemas (MICs) son liberadas y se acumulan en la superficie apical del parásito. La unión móvil (moving junction, MJ) se forma por la liberación de las proteínas del cuello de las roptrias (RONs), las cuales se asocian con la proteína AMA1 para crear una unión estrecha y formar una estructura en forma de anillo. De manera casi simultánea se inyectan las proteínas de las roptrias al citoplasma de la célula huésped; algunas se mantendrán en vesículas y se fusionarán con la vacuola parasitófora, mientras que otras viajarán al núcleo de la célula. El parásito penetra de manera activa al jalar las proteínas MIC y la unión móvil (MJ) e invaginando la membrana plasmática de la célula para crear la vacuola parasitófora. Tomado y modificado de Carruthers y Boothroyd (2007).

Los parásitos generalmente egresan de la célula cuando han alcanzado entre 32 y 128 copias dependiendo del tipo celular invadido (Blader et al., 2015; Robert-Gangneux y Dardé, 2012). El egreso del parásito es un proceso activo que puede activarse mediante diversos mecanismos. Los desencadenados por la célula huésped en presencia del sistema inmune mediante perforinas o el receptor letal (Fas/FasL) por daño intracelular seguido de la respuesta citotóxica de linfocitos T CD8⁺ (Persson et al., 2007). El daño celular conduce a la disminución de K⁺ intracelular lo cual desencadena el egreso. También existen mecanismos de egreso que no están relacionados con el sistema inmune; por ejemplo, el ácido abscísico (ABA) baja el pH de la vacuola parasitófora, activa a la proteína PLP1 de

los micronemas y se inserta en la membrana parasitófora y en la membrana plasmática de la célula huésped para formar poros y hacer un camino para el egreso del parásito (Blader et al., 2015; Kafsack et al., 2009; Moudy et al., 2001; Nagamune et al., 2008; Persson et al., 2007; Roiko et al., 2014).

1.7 Respuesta inmune contra *Toxoplasma gondii*

Como se mencionó, entre los diversos huéspedes de *T. gondii* hay diferencias naturales en la susceptibilidad a la presentación de la toxoplasmosis (**Figura 5**) y se sabe que la respuesta inmune innata juega un papel importante en la presentación clínica de la infección (Zhu et al., 2019).



Figura 5. Susceptibilidad a la presentación clínica de la toxoplasmosis en animales domésticos y silvestres. Tomado y modificado de Cedillo-Peláez (2015).

En ratones, la profilina del parásito interactúa con los receptores tipo-Toll TLR11 y TLR12 en células dendríticas para generar una respuesta potente de interleucina 12 (IL-12) dependiente de MyD88 (Koblansky et al., 2013; Yarovinsky et al., 2005). Adicional a este mecanismo, las células dendríticas pueden secretar IL-12 al ser estimuladas por la unión de la ciclofilina-18 (C-18) de *T. gondii* al receptor de

quimiocina CCR5 (Aliberti, 2005). Como una citocina proinflamatoria, la IL-12 estimula a las células NK y los linfocitos T CD4+ y CD8+ a expresar interferón gama (IFN- γ), el cual tiene un rol crucial para controlar al parásito durante la infección. Los neutrófilos también pueden producir IFN- γ en respuesta a la estimulación con IL-1 β y TNF- α . Además de la producción de IL-12, los neutrófilos están implicados en varios mecanismos para la eliminación del parásito, incluyendo la fagocitosis y la formación de redes extracelulares de DNA (Bliss et al., 1999, 2000). El IFN- γ propaga una señal para activar el transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1), el cual regula positivamente la producción de moléculas efectoras como el óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), controlando la invasión del parásito al tener un efecto inhibitorio en la replicación de *T. gondii* (Mordue y Sibley, 2003). El IFN- γ también activa la inducción de las GTPasas relacionadas a la inmunidad (IRG) y las proteínas de unión al guanilato (GBPs) para ocasionar la disrupción de la vacuola parasitófora (Gazzinelli et al., 2014; Howard et al., 2011; Figura 6). Después de que los parásitos son expuestos, pueden egresar de la célula y ser eliminados por la unión de anticuerpos y la fijación de Complemento o mediante mecanismos de autofagia de la célula huésped antes de egresar (Dupont et al., 2012).

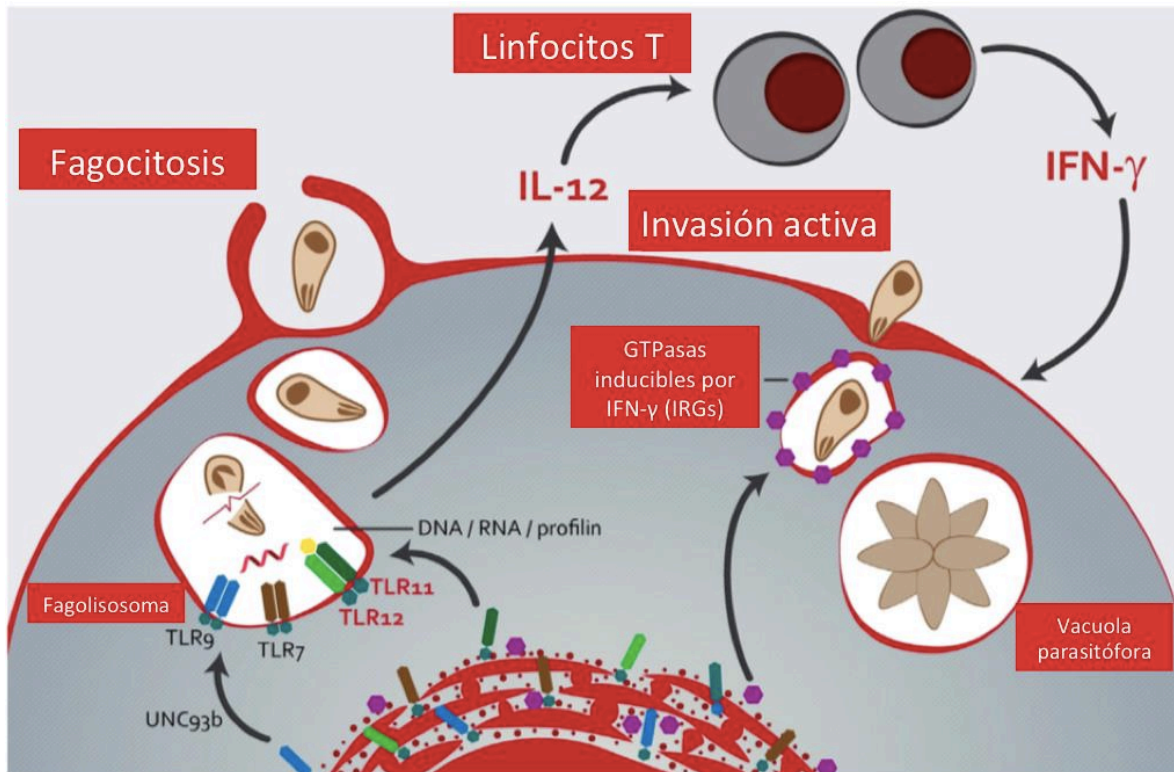


Figura 6. Procesamiento de taquizoítos de *T. gondii* en células dendríticas. La absorción de detritus del parásito o la destrucción de taquizoítos fagocitados lleva a la activación de TLR7, TLR9 y el heterodímero TLR11/TLR12. Estos inducen la producción de IL-12 en células dendríticas y la consecuente producción de IFN- γ por células NK y linfocitos T. El IFN- γ induce la expresión de IRGs que son reclutadas a la vacuola parasitófora para la destrucción de taquizoítos que invadieron células del huésped. UNC93b: chaperona que lleva los TLR7 y 9 del retículo endoplásmico al sistema endocítico. Tomado y modificado de Gazzinelli et al. (2014)

A diferencia de los ratones, los humanos son considerados resistentes a la infección por *T. gondii*. Debido a la falta de genes funcionales que codifican para los sensores innatos clave TLR11 y TLR12 (Gazzinelli et al., 2014), las células humanas tienen diferentes mecanismos para detectar al parásito. Algunos estudios recientes han revelado que la detección está basada en la molécula asociada a daño, la alarmina S100A11, liberada por células infectadas y la inducción de la quimiocina CCL2 dependiente de RAGE (Safronova et al., 2019). En estudios *in vitro* se ha descrito que las células humanas también dependen de la señalización de IFN- γ y STAT1 para el control de la replicación de *T. gondii* (Cerávolo et al., 1999). En líneas celulares de humanos (fibroblastos y células epiteliales de retina) se ha descrito que la indolamina oxidasa (IDO) es una de las principales moléculas efectoras para controlar la replicación del parásito después de la estimulación con IFN- γ *in vitro* (Zhu et al., 2019).

La respuesta inmune adaptativa, mediada por linfocitos T y B, también es importante para la resistencia a la infección por *T. gondii* tanto en humanos como en ratones, particularmente durante la fase crónica de la infección. Los linfocitos CD4⁺ son esenciales para la mediación de la respuesta de linfocitos B y CD8⁺ y también son los principales productores de IFN- γ , y CD40L durante la infección crónica (Reichmann et al., 2000). Las células dendríticas son consideradas las células más importantes dentro del grupo de presentadoras de antígenos, involucradas en la activación de linfocitos T CD4⁺ en respuesta a la infección por *T. gondii*, a pesar de que los linfocitos B y los macrófagos también pueden desempeñar esta función (Jenkins, 2001). Los linfocitos CD8⁺ también tienen una función crítica en la protección contra el parásito a través de la producción de IFN- γ , CD40L y vía lisis mediada de células infectadas por perforinas (Denkers et al., 1997). Algunos de los principales antígenos de *T. gondii* que estimulan a los linfocitos T CD8⁺ son SAG1, GRA4, GRA6 y ROP7 (Dupont et al., 2012). La inmunidad humoral también es importante para controlar la infección en ratones y humanos. Los anticuerpos proveen resistencia a través de la opsonización de los parásitos para facilitar la fagocitosis, neutralización de la invasión y activación de la vía clásica del complemento (revisado en Correa et al., 2007; Vercammen et al., 1999).

Toda esta cascada de eventos puede llevar a una respuesta exacerbada, que paradójicamente, puede ocasionar la muerte del huésped si no es regulada por las células Treg y las citocinas IL-10 y el TGF- β (Mosser, 2003; Ortiz-Alegría et al., 2010).

Después de 3-10 días de iniciada la infección, aparecen anticuerpos clase IgM en suero, los cuales pueden estar circulando durante meses, o incluso años. En las mucosas se secreta principalmente IgA, la cual inhibe la invasión del parásito a los enterocitos. En humanos, aparecen secuencialmente las cuatro subclases de IgG en suero a partir del día 10 post-infección. Las subclases IgG1 e IgG3 (IGG2a y 2b en ratones) tienen función de opsoninas que facilitan la fagocitosis y fijan complemento; mientras que las subclases IgG2 e IgG4 tienen función neutralizante contra la invasión; los anticuerpos de clase IgE normalmente son

indicadores de mal desenlace clínico, porque los efectos son dañinos y no controlan la replicación parasitaria (Cañedo-Solares et al., 2008; Correa et al., 2007; Dubey, 2010).

En individuos inmunocomprometidos (tratamiento con esteroides, trasplantes de órganos o médula, infecciones virales inmunodepresoras, etc.) se puede generar infección clínica severa, pues disminuye la respuesta protectora, que inicialmente es estimulada por las células infectadas, liberando quimiocinas que atraen células de la inmunidad innata.

1.8 Presentaciones clínicas de la toxoplasmosis

Las presentaciones clínicas principales de la toxoplasmosis en humanos incluyen la forma ocular, la encefálica y la pulmonar (Montoya y Liesenfeld, 2004). Esto está influenciado por diferentes factores como la dosis infectiva, el estadio y el genotipo del parásito, el genotipo del huésped y otros factores que afectan el estado inmunológico, especialmente las co-infecciones con otros patógenos (Wendte et al., 2011).

1.8.1 Adultos y niños inmunocompetentes

Generalmente la toxoplasmosis es asintomática y autolimitante con signos clínicos inespecíficos de enfermedad, muchas veces inaparentes. En los pacientes sintomáticos, el signo clínico más frecuente es linfadenopatía cervical y occipital. En casos de toxoplasmosis diseminada puede haber miocarditis, polimiositis, neumonía, hepatitis o encefalitis (Montoya y Liesenfeld, 2004). Más recientemente, se ha asociado la toxoplasmosis grave en individuos inmunocompetentes a genotipos atípicos o recombinantes altamente virulentos, frecuentes en Sudamérica (Weiss y Kim, 2013).

1.8.2 Toxoplasmosis ocular

La corioretinitis toxoplásmica puede ser el resultado de una infección adquirida de manera congénita o postnatal. El involucramiento del ojo ocurre durante la fase aguda de la infección o la reactivación de una infección de curso crónico. En casos

de toxoplasmosis aguda diseminada también puede haber corioretinitis; esto se ha descrito en brotes epidémicos y se ha asociado a cepas altamente virulentas en Brasil (Grigg y Sundar, 2009; Montoya y Liesenfeld, 2004; Weiss y Kim, 2013).

1.8.3 Pacientes inmunocomprometidos

En contraste con los individuos inmunocompetentes, la toxoplasmosis puede ser mortal en pacientes inmunocomprometidos. La gran mayoría de los casos se dan por reactivación de una infección crónica latente. Los principales afectados son individuos con SIDA, o bajo tratamiento con esteroides por trasplantes de órganos o terapia inmunosupresora (Montoya y Liesenfeld, 2004).

1.8.4 Toxoplasmosis congénita

Los fetos con toxoplasmosis congénita generalmente son asintomáticos, si se infectan en el último trimestre de gestación (Rico-Torres et al., 2016). En caso de daño congénito algunos hallazgos clínicos en el ultrasonido incluyen: calcificaciones intracraneanas, dilatación ventricular, hepatomegalia y ascitis. En neonatos con infección congénita las manifestaciones clínicas varían ampliamente pero incluyen: hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones intracraneales, retinocoroiditis, ceguera, epilepsia, estrabismo, retraso psicomotor, entre otras (Montoya y Liesenfeld, 2004). En algunos casos, los niños nacen asintomáticos pero la reactivación de la infección con manifestaciones clínicas se puede dar desde el primer año de edad hasta los 17 años.

Además de estas presentaciones se ha descrito una nueva patología que afecta a personas inmunocompetentes: la toxoplasmosis amazónica, la cual generalmente requiere atención médica intensiva y ha resultado en muertes por falla multiorgánica con daño severo en pulmones. Estos casos han sido asociados a cepas atípicas y altamente virulentas aisladas en Guyana Francesa (Cañón-Franco et al., 2013; Galal et al., 2019; Shwab et al., 2018).

1.8.5 Toxoplasmosis en perros y gatos

Los casos de toxoplasmosis clínica son más frecuentes en gatos que en perros. Una gran cantidad de éstos se presentan en gatos sometidos a terapia inmunosupresora. Los perros raramente sufren de toxoplasmosis clínica y en la mayoría de los casos se debe a inmunosupresión o a co-infección con el virus del moquillo canino. Los principales signos clínicos son convulsiones, temblor muscular, ataxia, paresia o parálisis por encefalomielitis; también se han observado manifestaciones cutáneas después de tratamientos con inmunosupresores. En los gatos se ha asociado a co-infecciones con retrovirus como los del SIDA felino y el de la leucemia viral felina (Calero-Bernal y Gennari, 2019).

1.8.6 Toxoplasmosis en fauna silvestre

Las descripciones de toxoplasmosis en animales silvestres son escasas y generalmente están limitadas a estudios *postmortem*, especies de alta importancia por encontrarse en peligro de extinción o en animales de zoológicos (cautiverio o semi cautiverio). Las manifestaciones de la toxoplasmosis en animales son similares a los cuadros observados en humanos, con daño en pulmón, cerebro y ojos, principalmente. Hay especies que son altamente susceptibles a la infección por *T. gondii* como los gatos de Pallas, los canarios, las suricatas, los monos del nuevo mundo y los lémures, que pueden morir de toxoplasmosis aguda (Miller et al., 2003). Los marsupiales australianos también son especies altamente susceptibles, pero algunos estudios recientes han demostrado que pueden estar multi-infectados y no morir de toxoplasmosis aguda; lo que sugiere que algunas especies de fauna silvestre se adaptan a algunos genotipos, pero son sensibles a variantes virulentas y sucumben ante éstas (Pan et al., 2012).

1.9 Genética y diversidad genética de *Toxoplasma gondii*

El genoma de *T. gondii* es haploide la mayor parte del tiempo, volviéndose diploide solo en el intestino de los felinos cuando se fusionan el micro y el macrogameto. El genoma nuclear está compuesto por 14 cromosomas (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI y XII (Khan et al., 2005). El tamaño del genoma y el número de

genes codificantes varía dependiendo de la cepa (**Cuadro 1**); por ejemplo, la cepa más estudiada, la “Me49” (tipo II) tiene 65.67 Mb y 8,322 genes codificantes, mientras que la cepa tipo I “RH” tiene 69.35 Mb y 7,860 genes codificantes. El genoma de *T. gondii* es de mayor tamaño y contiene más genes codificantes que *Neospora caninum* y *Plasmodium falciparum*, parásitos del Phylum Apicomplexa relevantes en la salud animal y humana (Lau et al., 2016; Reid et al., 2012).

Cuadro 1. Composición del genoma de *Toxoplasma gondii* en comparación con otros apicomplexa

Detalles	<i>T. gondii</i> RH	<i>T. gondii</i> GT1	<i>T. gondii</i> Me49	<i>T. gondii</i> VEG	<i>N. caninum</i> Liv	<i>P. falciparum</i> 3D7
Tamaño del genoma (Mb)	69.35	63.95	65.67	64.52	59.1	23.3
Contenido de G+C (%)	52	52.4	52.3	52.4	54.8	19.4
Genes codificantes	7,860	8,460	8,322	8,410	7,122	5,383
Cromosomas	14	14	14	14	14	14

Mb: megabases

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

1.9.1 Genotipificación

Desde la década de los años 90 se han utilizado diversas técnicas para la tipificación de *T. gondii*. La primera clasificación de las cepas se realizó con base en estudios de virulencia en ratones, y poco después, de isoenzimas, usando seis sistemas enzimáticos polimórficos: la aspartato aminotransferasa, la glutatión reductasa, la amilasa, la glucosa fosfato isomerasa, la fosfatasa ácida y la

propionil esterasa con sólo 2 o 3 isoformas en 83 cepas analizadas (Ajzenberg et al., 2002a; Dardé, 1996; Darde et al., 1988, 1992). Actualmente se han desarrollado diversas técnicas moleculares que ayudan a identificar el genotipo del parásito, como el análisis por microsatélites, la reacción en cadena de la polimerasa seguida del análisis de polimorfismo de patrones de restricción (PCR-RFLP), la tipificación multilocus de secuencias (MLST) y el análisis de fusión de alta resolución (HRM) (Liu et al., 2015).

1.9.2 Microsatélites

Los microsatélites son secuencias cortas de dos a seis nucleótidos que se repiten en tándem. Son hipervariables debido a la acumulación de mutaciones de longitud por el deslizamiento de las hebras de DNA en el apareamiento (intra-allelic polymerase slippage) durante la replicación. Las tasas altas de mutación de los microsatélites los hace ideales para la identificación de aislamientos individuales de *T. gondii*, especialmente en estudios de epidemiología molecular (Dardé et al., 2007). Actualmente se utiliza una batería de 15 microsatélites, en la cual ocho marcadores diferencian los linajes clásicos I, II y III de los genotipos atípicos (*TUB2*, *W35*, *TgM-A*, *B18*, *B17*, *M33*, *IV.1*, y *XI.1*) y los siete marcadores restantes (*M48*, *M102*, *N60*, *N82*, *AA*, *N61*, y *N83*) determinan la huella génica, incrementando la resolución del ensayo y permitiendo diferenciar aislamientos muy cercanos dentro de un haplogrupo o linaje clonal (Ajzenberg et al., 2010).

1.9.3 PCR-RFLP

Esta técnica se basa en la habilidad de las endonucleasas de restricción en reconocer secuencias específicas y digerir productos de amplificación de la PCR para posteriormente visualizar distintos patrones de bandas en geles de agarosa después de la electroforesis. Se desarrolla una PCR anidada multilocus (Mn-PCR-RFLP) usando 10 marcadores genéticos del genoma nuclear y uno del apicoplasto (*SAG1*, *SAG2 5' 3'*, *SAG2 alt.*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* y *Apico*) (Su et al., 2010). Gracias a la PCR anidada el umbral de detección se incrementa hasta 10 veces en comparación con la PCR-RFLP convencional,

permitiendo la genotipificación de muestras clínicas, en las cuales la cantidad de DNA del parásito es baja o está muy diluida con el DNA del huésped. Con esta metodología se pueden identificar los genotipos clásicos I, II y III, recombinantes y atípicos (alelos nuevos y polimorfismos únicos) (Dardé et al., 2007; Liu et al., 2015).

1.9.4 Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

El MLST está basado en polimorfismos de las secuencias de DNA, incluyendo los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) e inserciones y deleciones de nucleótidos, lo que la convierte en la técnica de tipificación de mayor resolución (Liu et al., 2015).

1.9.5 Análisis de fusión de alta resolución (HRM)

El HRM es una metodología post-PCR que analiza variaciones genéticas y que puede caracterizar polimorfismos basados en la temperatura de disociación de una cadena de DNA, longitud y contenido de GC. En este análisis se comparan los patrones de disociación de cepas de referencia con las muestras problema y se identifica el alelo que poseen (Liu et al., 2015).

1.9.6 Estructura poblacional de *T. gondii*

El primer acercamiento a la estructura poblacional de *T. gondii* se llevó a cabo cuando Sibley y Boothroyd (1992) tipificaron tres marcadores genéticos mediante PCR-RFLP de 27 aislamientos, de los cuales nueve tenían patrón de restricción idéntico y fueron virulentos en ratón. Al incrementar el número de marcadores para RFLP (*SAG1*, *SAG2*, *850*, *ROP1*, *L328* y *62*) y de aislamientos (106) provenientes principalmente de Estados Unidos y Francia, Howe y Sibley (1995) llegaron a la conclusión de que la estructura poblacional de *T. gondii* era clonal y el 84% (89/106) de los aislamientos fueron clasificados en tres tipos: I, II y III, y el resto fueron clasificados como recombinantes o atípicos. Ajzenberg et al. (2002a, 2002b) evidenciaron diferencias genéticas en aislamientos pertenecientes a estos tres linajes clásicos mediante tipificación de alta resolución por microsatélites, los

cuales son ideales para diferenciar aislamientos muy relacionados genéticamente (mismo genotipo por RFLP) y en casos de brotes. Posteriormente se incrementó el número de aislamientos y el número de regiones de procedencia, incluyendo a Sudamérica, África y Asia, y se utilizó la secuenciación de cinco intrones (*UPRT*, *MIC*, *BTUB*, *HP* y *EF*) identificando 15 haplogrupos, con los linajes clásicos designados como haplotipos I, II y III y las cepas atípicas distribuidas entre los haplogrupos 4 al 15 (Dubey et al., 2011; Khan et al., 2007; Khan et al., 2011a; Khan et al., 2011b; Mercier et al., 2010; Minot et al., 2012; Rajendran et al., 2012; Wendte et al., 2011).

Los análisis posteriores indicaron que los haplogrupos pudieron derivarse de la combinación de 6 cepas ancestrales. Estos 15 haplogrupos tienen distinta distribución geográfica: los grupos 1, 2, 3, 7, 11 y 12 están confinados principalmente en Norteamérica y Europa; los grupos 4, 5 y 8 a 10 en Sudamérica; el 13 en Asia y el 14 y 15 en África (Gabón). El haplogrupo 6 se encuentra distribuido mundialmente (Minot et al., 2012). Más recientemente, Su y colaboradores (2012) usaron los tres métodos de genotipificación de *T. gondii* (PCR-RFLP, microsatélites y secuenciación de marcadores de intrones de genes altamente conservados) para analizar 956 aislamientos de todo el mundo, lo que dio como resultado 138 genotipos, agrupados en 6 clados. El clado "A" es el grupo con la distribución más amplia y descrito previamente en África (haplogrupos 6 y 14), Sudamérica (haplogrupo 6) y Norteamérica (haplogrupo 1); aparentemente estos haplogrupos comparten un ancestro en común. El clado "B" está compuesto por los haplogrupos 4 y 8 y está prácticamente confinado a Sudamérica; estos haplogrupos han sido asociados previamente a enfermedad ocular grave en los seres humanos (Khan et al., 2006). El clado "C" contiene al haplogrupo 3, mientras que el clado "D" comprende dos grupos clonales relacionados, el 2 y el 12 y muestra el nivel más alto de divergencia. El clado "E" contiene al haplogrupo 9 y el clado "F" es el más diverso genéticamente, compuesto por cepas aisladas previamente de la región del Amazonas de la Guyana Francesa (haplogrupos 5 y 10) y un grupo único de cepas (haplogrupo 15) principalmente originadas de

animales domésticos de Brasil (**Figura 7**). Dada la diversidad genética de los haplogrupos 7, 11 y 13, no fueron agrupados en ninguno de los seis clados.

Más recientemente Lorenzi y colaboradores (2016) secuenciaron los genomas completos de 62 aislamientos y determinaron que éstos se mantenían agrupados en 6 clados, pero con un haplogrupo adicional resultando en 16.

En Norteamérica, Europa, África y Asia la estructura poblacional del parásito es dominada por unas cuantas cepas clonales, mientras que en Sudamérica hay una gran diversidad genética del parásito y sin el predominio de alguna cepa en particular (Bertranpetit et al., 2017; Shwab et al., 2014). Hoy en día hay más de 298 genotipos descritos a partir de muestras clínicas y aislamientos del parásito (www.toxodb.org).

Actualmente se propone incrementar la batería de genotipificación de RFLP de 10 a 22 marcadores polimórficos (*Ia-P89*, *AK2*, *II-C35*, *BSR4*, *AK126*, *SRS4*, *UPRT-1*, *ROP1*, *MIC5*, *ROP16*, *ROP18* y *ROP5*) la cual incluye marcadores presentes en cada uno de los 14 cromosomas y el apicoplasto, lo cual daría mayor resolución y ayudaría a identificar eventos de recombinación cromosómica. Usando esta metodología, Shwab (2015) logró identificar 41 genotipos nuevos a partir de 142 genotipos que solo habían sido tipificados usando los 10 marcadores descritos por Su et al. (2010), con lo que lograron diferenciar varias cepas que compartían el genotipo original, resultando en 183 genotipos diferentes. Cabe resaltar que la batería de genotipificación mediante PCR-RFLP incluye a los marcadores *ROP5* y *ROP18* que tienen alelos asociados a presentaciones clínicas más agresivas de toxoplasmosis y resistencia del parásito a la respuesta inmune innata.

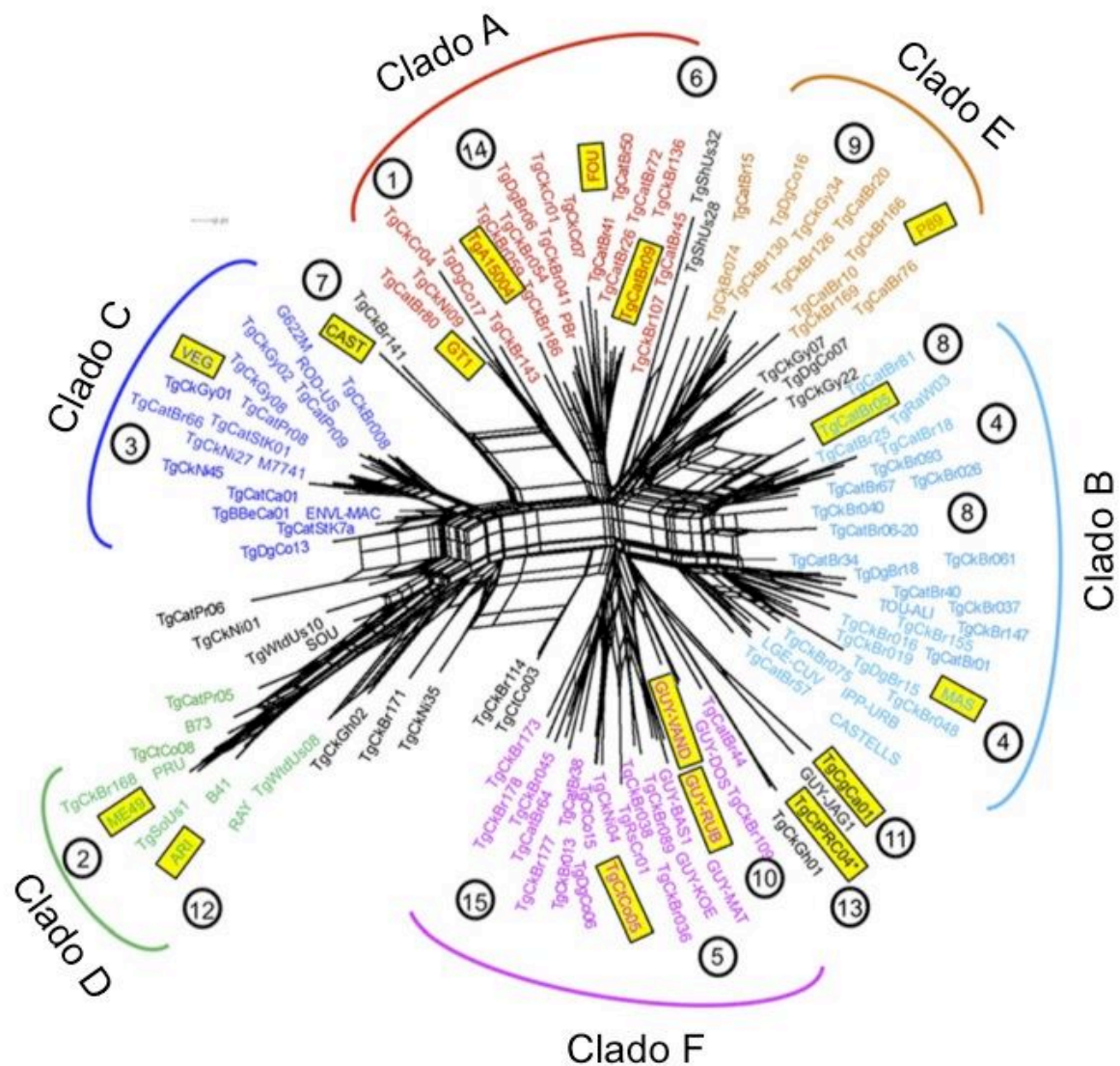


Figura 7. Estructura genética de los aislamientos de *Toxoplasma gondii*. Los haplogrupos fueron clasificados en 6 clados principales. Las cepas en letra negra representan aislamientos que no corresponden a algún clado. Los haplogrupos se muestran en círculos en la base de la estructura. Las cepas representativas de cada haplogrupo se encuentran en cajas resaltadas en color amarillo. Tomado y modificado de Su et al. (2012)

1.9.7 Factores que influyen en la diversidad genética de *T. gondii*

Hay diversos factores que afectan (limitan o favorecen) el intercambio genético; por un lado, la transmisión vertical del parásito de la madre al feto, el carnivorismo y la carroñería en huéspedes intermediarios limitan la diversidad genética, ya que por estas vías *T. gondii* se propaga clonalmente. La autofertilización, es decir, la fecundación de los gametos masculino y femenino originados de una sola cepa en el intestino de un felino también limita la diversidad genética del protozooario; a

pesar de que se reproducen sexualmente, pues se obtendrá progenie casi idéntica (Weiss y Kim, 2013; Wendte et al., 2011). Por otra parte, un factor ambiental de gran importancia que genera diversidad genética del parásito es la población de felinos presente en una región dada (densidad poblacional, diversidad de especies y hábitos alimentarios), la riqueza o diversidad de presas y los rangos territoriales de los felinos, así como sus patrones de dispersión (Gilot-Fromont et al., 2012; Weiss and Kim, 2013).

En áreas urbanas generalmente hay un número limitado de huéspedes definitivos (generalmente sólo el gato doméstico o feral), así como pocas especies de animales de consumo humano y mamíferos peri-domésticos y aves que forman parte del ciclo de transmisión del parásito. Algunos autores sugieren que los tres linajes clásicos de *T. gondii* se han adaptado exitosamente a estos huéspedes domésticos, ya que, estos linajes divergieron hace aproximadamente 10,000 años, dato que aparentemente coincide con la domesticación de animales de compañía y de producción (Lehmann et al., 2003). En áreas rurales conviven felinos domésticos con roedores peri-domésticos y aves, los cuales son reservorios de infección y pueden dispersar los genotipos clásicos a la fauna silvestre circundante y de esta manera limitar la variabilidad genética del parásito (Lehmann et al., 2003; Weiss and Kim, 2013). En áreas tropicales remotas o aisladas que suelen ser hábitats de una amplia diversidad de especies de aves y mamíferos y que generalmente albergan diversas especies de felinos silvestres, se podría favorecer el flujo genético, los patrones de hibridación de *T. gondii* y en consecuencia una estructura genética poblacional más diversa del parásito. Los huéspedes definitivos tienen mayor probabilidad de ser infectados por diversos genotipos contenidos en las presas, los cuales se recombinan en el intestino del felino antes de la transmisión a nuevos huéspedes intermediarios (incluido el ser humano). La reinfección por diferentes cepas, puede ser otro factor que ayude a incrementar la diversidad genética (Gilot-Fromont et al., 2012; Pan et al., 2012). Las cepas provenientes de ambientes perturbados por la presencia o actividad humana se agrupan en unos cuantos linajes ampliamente distribuidos, a diferencia de las aisladas a partir de fauna silvestre, las cuales no presentan una estructura

poblacional que tienda a agruparse, lo que confirma la hipótesis de que estas cepas han sufrido varios eventos de recombinación en ecosistemas no perturbados (Weiss and Kim, 2013). Un escenario intermedio se da en países en los que hay grandes extensiones de tierra que no han sido perturbadas por el ser humano (EUA, Canadá) y en las que la diversidad genética de *T. gondii* que circula en la fauna silvestre coexiste con los linajes clonales de las áreas urbanas. En este escenario, algunos animales silvestres pueden merodear regiones urbanas y los animales domésticos (perros y gatos principalmente, aunque también los propios humanos) entran en contacto con cepas de origen silvestre al beber de cuerpos de agua, ríos o participar con el ser humano en la cacería deportiva, en la cual podría haber hibridación de genotipos provenientes del ciclo doméstico y silvestre o flujo de cepas del ciclo silvestre al doméstico y viceversa (Weiss and Kim, 2013).

1.9.8 Diversidad genética de *T. gondii* en México

Los estudios acerca de la diversidad genética de *T. gondii* en México son escasos y se han centrado en el análisis de diez *loci* nucleares y uno del aplicoplasto. A la fecha sólo existen siete publicaciones originales en la literatura científica, cuatro tesis de maestría y una de doctorado que reportan la genotipificación de este protozooario en el país. Los resultados se resumen en el **Cuadro 2** y la **Figura 8**.

Cuadro 2. Genotipos de *Toxoplasma gondii* descritos en México.

Especie	n	Genotipo	ToxoDB**	Región	Año
Gallina (<i>Gallus gallus</i>)	4	Tipo III	#2	Valle de México	Dubey (2009)
Perro (<i>Canis familiaris</i>) y gato doméstico (<i>Felis catus</i>)	9	3 recombinantes y 1 atípico	#73, #74, #155 y #9	Durango	Dubey (2009)
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	1	Tipo I	#10	Hidalgo	Chávez-Crisóstomo (2010) ⁺
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	2	Tipo I* y recombinante	-	CDMX	Pacheco-Coronel (2010) ⁺
Paloma (<i>Columba livia</i>)	1	Atípico	#9	Durango	Alvarado-Esquivel (2011)
Mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>)	2	Tipo I	#10	CDMX	Cedillo-Peláez (2011)
Puma (<i>Puma concolor</i>)	1	Atípico	#222	Durango	Dubey (2013)
Muflón (<i>Ovis musimon</i>) y león (<i>Panthera leo</i>)	4	Multi-infección I+II+III	-	Puebla	Valenzuela-Moreno (2014)
Wallaby (<i>Macropus rufogriseus</i>)	2	Recombinante	-	Puebla	NP
Gato (<i>Felis catus</i>)	1	Tipo I variante atípica*	-	Hidalgo	Ramírez-Pérez (2014) ⁺
Gato (<i>Felis catus</i>)	1	Recombinante	-	Hidalgo	NP
Gato (<i>Felis catus</i>)	2	Tipo III* y recombinante	#28	Colima	Besné-Mérida (2015)
Fauna silvestre	12	Tipo I, I atípico, Tipo III*	-	CDMX y Jalisco	Cedillo-Peláez (2015)
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	4	Tipo I o variantes atípicas*	-	CDMX	Rico-Torres (2012)
Humano (<i>Homo sapiens</i>) [^]	9	Tipo I, recombinantes y multi-infección I+II y I+III	#10 y nuevos	Valle de México	Rico-Torres (2018)

*Genotipificados por 4 marcadores genéticos (*GRA6*, *SAG2* Alt., *SAG3* y *βTUB*)

NP: no publicado

⁺Tesis

**Clasificación de PCR-RFLP de acuerdo a Toxo Database (www.toxodb.org)

[^]Binomios madre e hijo

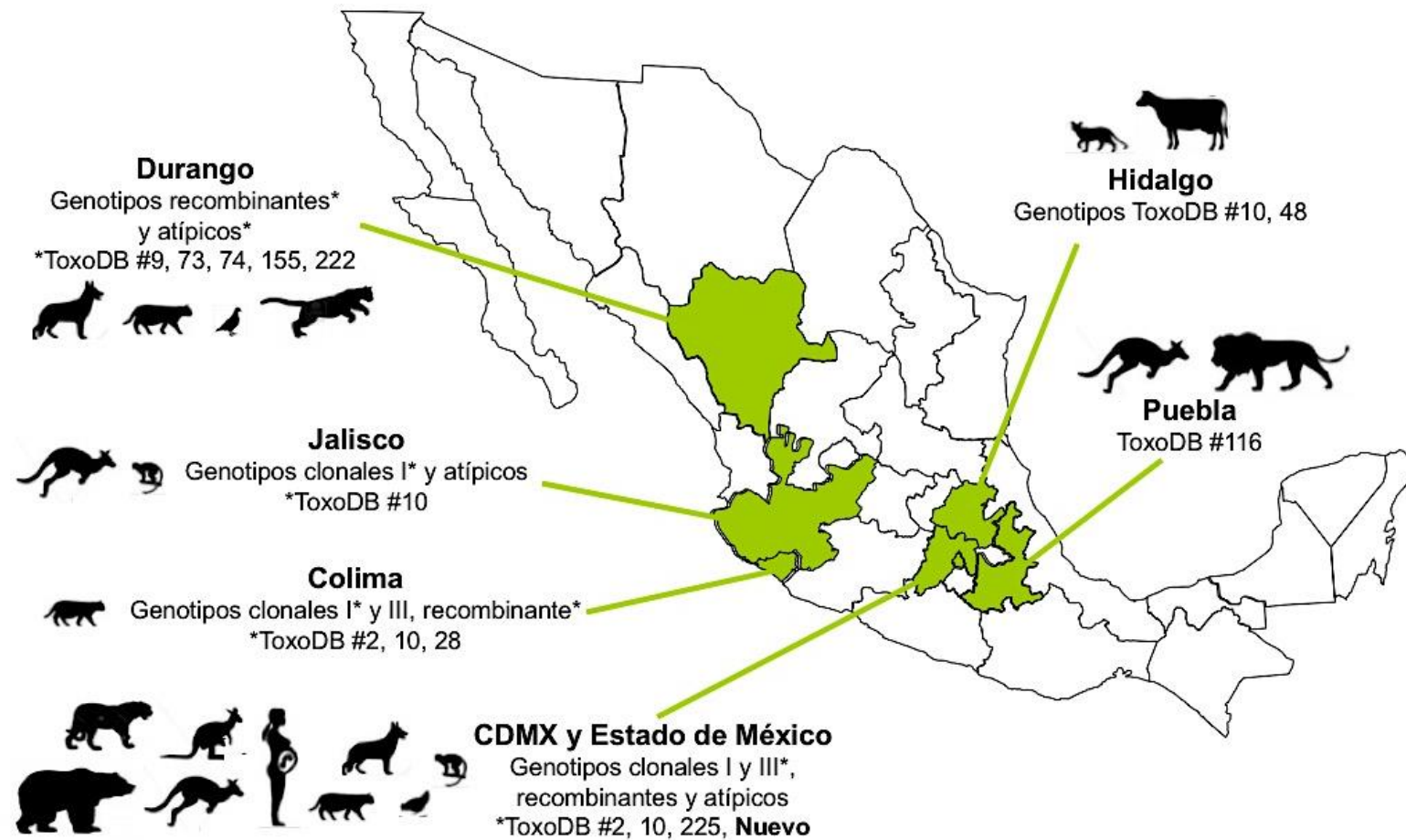


Figura 8. Genotipos de *T. gondii* descritos en México a partir de aislamientos y muestras clínicas obtenidas de animales domésticos, silvestres y humanos (*denotan genotipos parciales).

2. Justificación

Aunque *T. gondii* es prevalente en nuestro país, se sabe muy poco de los genotipos que circulan y causan infección. La toxoplasmosis puede ocasionar problemas clínicos en seres humanos y otros huéspedes; esto depende de la capacidad de la respuesta inmune del huésped y de la carga parasitaria, pero también de la virulencia del parásito; ya que se ha asociado la severidad de la enfermedad al genotipo del parásito, por lo que es importante determinar el mismo. En la presente propuesta, hemos elegido obtener muestras de felinos ferales y caninos callejeros de los estados de Quintana Roo y Chiapas. Los primeros porque juegan un papel muy importante en el ciclo de vida de este protozoo, no sólo por ser los huéspedes definitivos y ser los únicos en diseminar ooquistes, sino que al alojar las formas sexuales, son la fuente de cepas recombinantes. Por su parte los caninos ferales, huéspedes intermediarios de *T. gondii*, pueden consumir presas infectadas con este parásito, lo que los hace una especie apta para el estudio de la diversidad genética.

Es importante resaltar que dado que *T. gondii* no tiene preferencia por algún tipo de huésped, en principio no es relevante la especie animal de donde se obtenga la cepa del parásito o su DNA; es más importante su localización geográfica, ya que como se mencionó, las cepas de *T. gondii* pueden variar dependiendo del clima de una región a otra. Los estados del sureste mexicano (Chiapas y Quintana Roo) son de particular interés para este estudio, ya que, por un lado, son regiones de alta prevalencia del parásito en seres humanos y otras especies (Castillo-Morales et al., 2012; Cubas-Atienzar et al., 2018; Dzib-Paredes et al., 2016; Hernández-Cortazar et al., 2016; Ortega-Pacheco et al., 2017, 2013; Torres-Castro et al., 2016) y por el otro, no hay reportes de caracterización de cepas de *T. gondii* en estas áreas del país. Los estudios realizados en Centroamérica (Guatemala, Nicaragua y Costa Rica) revelaron la presencia de genotipos únicos (recombinantes y atípicos) (Rajendran et al., 2012). Derivado de los estudios mencionados y aquellos de regiones más lejanas como Brasil y Colombia, que tienen un clima tropical similar al del sureste mexicano, y en los cuales hay una frecuencia alta de variantes agresivas en comparación con Estados Unidos o

Europa, creímos que en el sureste de México, zona Neotropical, podríamos encontrar cepas atípicas endémicas, diferentes incluso de algunas reportadas en regiones más secas del Neártico en México; hallazgo que resultaría de gran interés científico y con potencial para intensificar programas de control para la salud humana y animal.

3. Hipótesis

Los genotipos de *T. gondii* que infectan a las diversas especies de animales del sureste de México, serán diferentes a los reportados hasta el momento en nuestro país, a los del Continente Americano y a otras partes del mundo.

4. Objetivo General

Caracterizar genéticamente a *Toxoplasma gondii* presente en muestras de carnívoros procedentes del sureste de México.

4.1 Objetivo particular

Asociar la presencia del parásito con las lesiones que se encuentren en distintas especies y tejidos.

5. Metodología

En la **Figura 9** se muestra un esquema de la estrategia general del estudio.

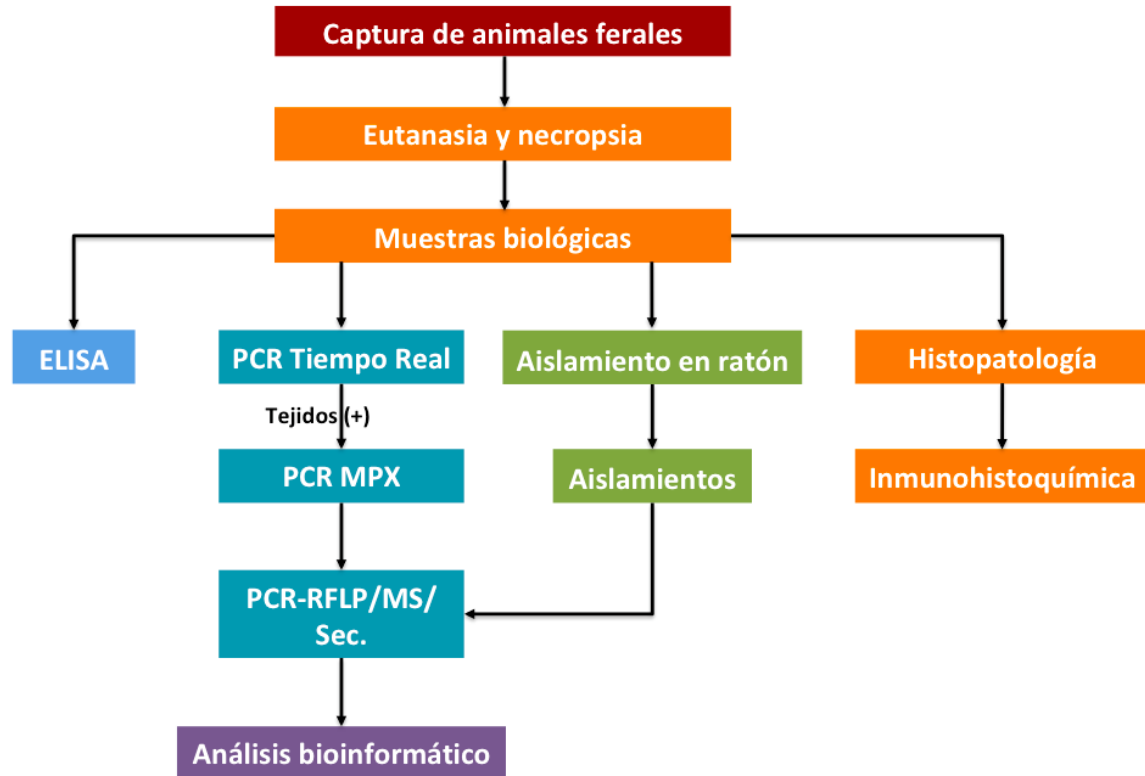


Figura 9. Estrategia general del proyecto de investigación.

5.1 Procedencia de las muestras

Playa del Carmen, Quintana Roo: se obtuvieron muestras de 11 gatos feroces (Parque Ecoarqueológico Xcaret) usando trampas Tomahawk para mamíferos medianos (Tomahawk Live Trap Co., Tomahawk, WI 54487, USA) cebadas con sardina. Los gatos fueron anestesiados con 9.7 mg/kg de Tiletamina/Zolacepam (Zoletil 100®, Virbac). Se tomó muestra de sangre de la vena yugular (6 mL de sangre completa y 6 mL de sangre con anticoagulante) y posteriormente se sometieron a manejo de eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico intracardiaco (3 mL Dolethal®, Vetoquinol).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: con la colaboración de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chiapas se obtuvieron muestras de sangre y tejidos de 11 perros callejeros empleados en práctica de

necropsia de la asignatura de patología general. A cada cadáver evaluado se le inspeccionó la piel, el pelo y los orificios naturales y se realizó el estudio sistemático de necropsia siguiendo la metodología descrita por Schuneman y Constantino (2002). Durante la necropsia, se recolectaron muestras representativas de diferentes aparatos y sistemas de los animales sometidos a manejo de eutanasia, incluyendo secciones de pulmón, corazón (ventrículos y septo interventricular), hígado, bazo, riñón, diafragma, músculo gracilis y encéfalo. Los tejidos colectados se depositaron en bolsas de plástico tipo Ziploc® manteniéndose en refrigeración hasta su remisión al laboratorio para su procesamiento.

Una parte de los órganos se fijaron por inmersión en formalina amortiguada (pH 7.2) al 10% y posteriormente se remitieron para su procesamiento histológico al Laboratorio de Patología Molecular del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Pediatría. Otra parte de las muestras se mantuvo fresca para la extracción de DNA y su posterior análisis por PCR y PCR-RFLP. Una parte más fue empleada en los bioensayos en roedores.

5.2 Técnicas de laboratorio

5.2.1 Histopatología

Los tejidos colectados durante la necropsia se procesaron con la técnica de rutina para histología y se evaluaron microscópicamente de acuerdo con lo descrito anteriormente (Cedillo-Peláez, 2009; Prophet, 1995; Anexo 1). Se buscaron intencionalmente lesiones asociadas a la infección por *T. gondii*, así como la presencia de estadios parasitarios, principalmente quistes tisulares en los tejidos evaluados. Así mismo se describieron otras alteraciones y lesiones presentes en los órganos de los animales evaluados (Apéndice 1).

5.2.2 Inmunohistoquímica

Para la identificación específica y morfológica de los taquizoítos, pseudoquistes o quistes tisulares de *T. gondii* en los tejidos afectados, se empleó la técnica de

inmunohistoquímica, utilizando como anticuerpo primario un suero de ratón positivo a *T. gondii* previamente probado por ELISA indirecto y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa. (Cedillo-Peláez, 2015; Lindsay y Dubey, 1989; Ramos-Vara, 2005). Como testigos positivos se emplearon secciones de hígado o bazo de ratón infectados con taquizoítos de *T. gondii* cepa Me49, en las cuales se identificó previamente la presencia de quistes y pseudoquistes de este protozooario con la misma técnica. Como testigos negativos se emplearon secciones del mismo tejido, sustituyendo el anticuerpo primario por PBS. La metodología completa de la inmunohistoquímica se encuentra en el Anexo 2.

5.2.3 ELISA indirecto

Para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* de gatos y perros, se empleó un conjugado anti-IgG de gato (Abcam, Cambridge, MA, USA, producto ab112801) y anti IgG de perro (Sigma, St. Louis, Missouri) respectivamente, ambos acoplados a peroxidasa y siguiendo la metodología descrita anteriormente en el laboratorio (Cedillo-Peláez, 2015; Valenzuela-Moreno, 2014). Brevemente, las placas de ELISA se sensibilizaron con 100 µL de un extracto crudo a 2 µg/mL, elaborado a partir de taquizoítos de la cepa RH (tipo I) disuelto en amortiguador de carbonatos 15 mM, pH 9.6, durante toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con albúmina sérica bovina (Euro-Clone, Italy) al 1% y las muestras de suero de gato y perro fueron diluidas 1:200 y 1:400, respectivamente en amortiguador de fosfatos 10 mM, con cloruro de sodio (NaCl) 0.15 M, pH 7.2 (PBS) con Tween-20® al 0.05% (PBS-T20); posteriormente se agregó el conjugado específico correspondiente (anti-IgG de gato o de perro) diluidos 1:15,000 y 1:2,500 en el mismo amortiguador, respectivamente. Entre cada cambio de reactivo, se llevaron a cabo 5 lavados con 200 µL de PBS-T20. La detección de los complejos antígeno-anticuerpo se llevó a cabo mediante una solución cromógeno-sustrato O-fenilendiamina (4mg)- peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, P8287-100TAB) disueltos en amortiguador de citratos 0.1 M; la reacción fue detenida con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. Los valores de absorbancia fueron obtenidos a 490 nm

de longitud de onda con un lector de ELISA Turner Biosystems, (Sunnyvale, California). Como testigos positivos y negativos se usaron sueros de gatos y perros domésticos previamente confirmados mediante ELISA (**Anexo 3**).

El punto de corte se calculó obteniendo el promedio de la absorbancia de los sueros de perros o gatos negativos más 2 desviaciones estándar. La absorbancia de los sueros problema fue dividida entre el punto de corte para establecer el índice de reactividad (IR). Los sueros con IR entre 0.9 y 1.1 fueron considerados sospechosos y los superiores a 1.1 fueron clasificados como positivos.

5.2.4 Aislamiento en ratón

El aislamiento de *T. gondii* en ratón se realizó siguiendo la metodología descrita por Rico-Torres y colaboradores (2015). Brevemente, el cerebro y una mezcla de corazón y diafragma de cada gato y perro fueron homogenizados manualmente en PBS estéril y penicilina G (10,000 UI/mL); después dos ratones BALB/c por muestra fueron inoculados intraperitonealmente (0.5 mL) con cada homogenado. Los ratones fueron examinados todos los días y sometidos a manejo de eutanasia si desarrollaban signos clínicos de infección por *T. gondii*. Una semana después de la inoculación se realizaron lavados peritoneales con PBS estéril para obtener taquizoítos. Los ratones sobrevivientes fueron sometidos a manejo de eutanasia 45 días después de la inoculación y fueron considerados infectados si se visualizaban taquizoítos o quistes tisulares en sus tejidos. En todos los casos, se realizaron improntas de pulmón y cerebro de los ratones en laminillas de vidrio y se observaron en microscopio óptico en busca de taquizoítos o quistes tisulares de *T. gondii*. Los aislamientos fueron nombrados de acuerdo a la nomenclatura internacional, la cual incluye las iniciales del parásito, la especie a partir de la cual se obtuvo el aislamiento, el país de procedencia, la región y el número de animal (identificación), es decir, TgCatMxQR para los gatos y TgDogMxChp para los perros.

5.2.5 Diagnóstico molecular y genotipificación

5.2.5.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de muestras de sangre periférica se siguió la metodología descrita por Brenier-Pinchart y colaboradores (2015) con algunas modificaciones. Las muestras de sangre colectadas previo al estudio *postmortem*, se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma, la capa leucoplaquetaria y los eritrocitos. Posteriormente el plasma se retiró y la capa leucoplaquetaria se transfirió a un tubo tipo Falcon de 15 mL; los eritrocitos restantes se lavaron 4 veces con solución de lisis de glóbulos rojos y posteriormente se homogenizaron en 1.3 mL de solución comercial de lisis celular (Qiagen Puregene Tissue, Hilden, Germany) y 15 µL de proteinasa K (20 mg/mL) dejándose en incubación a 55°C durante toda la noche. Posteriormente se adicionaron 2 mL de solución precipitadora de proteínas (Qiagen Puregene Tissue, Hilden, Germany), se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a otro tubo tipo Falcon de 15 mL nuevo al que se adicionaron 2 mL de isopropanol, se homogenizaron por inversión 20 veces y se dejaron 2 horas a -20°C. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue desechado. Después se agregaron 2 mL de etanol al 70% y se homogenizaron en vórtex hasta resuspender el DNA, se centrifugaron a 4000 rpm y el sobrenadante fue desechado. Finalmente, los tubos se dejaron secar, invertidos sobre papel secante y el DNA se homogenizó en 100 µL de solución de hidratación (Qiagen Puregene Tissue, Hilden, Germany; **Anexo 4**). La concentración y pureza del DNA se determinó mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) a 260 y 280 nm, depositando 1 µL de cada muestra sobre el pedestal del equipo. El DNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.2.5.2 PCR en punto final

Para la amplificación de DNA por PCR se emplearon los marcadores *B1* y una región no codificante del genoma de *T. gondii* que se repite de 200 a 300 veces

(SeqRep529). Se consideraron casos positivos aquellos animales de cuyas muestras se lograron amplificar bandas cercanas al peso esperado para uno o más marcadores moleculares (Anexo 5).

5.2.5.3 PCR en tiempo real

El diagnóstico molecular de *T. gondii* en las muestras de los carnívoros se llevó a cabo mediante un ensayo presencia-ausencia del gen *B1* y de la secuencia repetitiva (SeqRep529) de *T. gondii* por PCR en tiempo real (Kompalic-Cristo et al., 2007; Robert-Gangneux et al., 2010). Las muestras fueron probadas por triplicado y cada ensayo de PCR incluyó DNA de las cepas RH (tipo I) y Me49 (tipo II) como testigos positivos. Las muestras que tuvieran al menos un resultado positivo, fueron incluidas en la PCR múltiplex para genotipificación mediante PCR-RFLP. La carga parasitaria fue determinada usando curvas patrón siguiendo la metodología descrita por Cedillo-Peláez (2015) (Anexo 5).

5.2.5.4 Genotipificación

Las muestras positivas se sometieron a PCR múltiplex (Su et al., 2010) para la amplificación de nueve marcadores nucleares (*SAG1*, *SAG2* Alt., *SAG3*, *GRA6*, *BTUB*, *c22-8*, *c29-2*, *L358* y *PK1*) y uno del aplicoplasto (*Apico*) usando iniciadores externos a 55°C y, posteriormente, la amplificación de cada marcador por separado usando iniciadores internos a 60°C (el marcador *Apico* se amplifica a 58°C) (**Cuadro Anexo 1**). Para los ensayos de RFLP, los productos obtenidos después de la amplificación anidada fueron digeridos con enzimas de restricción específicas para cada marcador. Para visualizar los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para PCR y para RFLP al 3% teñidos con bromuro de etidio y digitalizados mediante un fotodocumentador de luz ultravioleta (Bio-Doct, UVP®).

Las muestras que tuvieron patrón de restricción diferente al de las cepas de referencia se consideraron atípicos (u-1) y las que tenían más de un patrón de RFLP semejante al de las cepas de referencia en la misma muestra se consideró como infección mixta.

Adicionalmente, los dos aislamientos obtenidos de los perros #3 y #11 mediante bioensayo se sometieron a la genotipificación de 15 microsatélites (*TUB2*, *W35*, *TgM-A*, *B18*, *B17*, *M33*, *IV.1*, *XL.1*, *M48*, *M102*, *N60*, *N82*, *AA*, *N61* and *N83*) siguiendo la metodología descrita por Ajzenberg et al. (2010) (**Cuadro Anexo 2**). Brevemente, se realizó una PCR múltiplex para los 15 microsatélites adicionando 30 iniciadores marcados con tres fluorocromos diferentes (solo los iniciadores sentido están marcados con el fluorocromo; 6-FAM, HEX y NED, Applied Biosystems) y 5 µL de DNA genómico de los dos aislamientos obtenidos de los perros #3 y #11 en una reacción final de 25 µL. Después de la reacción de PCR múltiplex se realizó una dilución en proporción 1:2 en formamida desionizada y se adicionó 1 µL de esta dilución, 0.5 µL de estándar de peso molecular (ROX 250; Applied Biosystems) y 23.5 µL de formamida desionizada. La mezcla fue desnaturalizada a 95°C por 5 minutos y luego sometida a electroforesis usando un secuenciador automático (3500 Genetic Analyzer AB Hitachi). El tamaño de los alelos en pares de bases fue estimado usando el software Gener Mapper analysis v 4.0 (Applied Biosystems)

5.2.6 Clonación y secuenciación

Las muestras que presentaron patrones de RFLP diferentes a los de las cepas de referencia (atípicos) o con infección triple (patrón de restricción de los tres alelos en la misma muestra) fueron amplificadas nuevamente, cortadas del gel de agarosa, purificadas y clonadas en el plásmido pJet 1.2/blunt Cloning Vector, para posteriormente transformar bacterias *E. coli* cepa TOP usando un estuche comercial (GeneJet® PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, Cat. K1231). Las bacterias transformadas fueron sembradas en agar Luria Bertani (LB) con ampicilina (100 µg/mL final) y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se seleccionaron colonias individuales y se resembraron en medio líquido LB incubándose a 37°C toda la noche. Se realizó PCR de las colonias aisladas usando los iniciadores internos específicos de los genes *GRA6* y *SAG3* de *T. gondii* descritos por Su y colaboradores (2010) y a las que amplificaron los productos esperados se les realizó extracción y purificación de plásmido usando

un estuche comercial (GeneJet Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific, Cat. K0503). La pureza de los mismos fue evaluada mediante espectrofotometría (Nanodrop 1000) y fueron enviados a secuenciar al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y al Instituto de Biología de la UNAM. Los cromatogramas resultantes fueron analizados con el programa SnapGene viewer® v 4.1.4.

5.2.7 Análisis bioinformático

En las muestras que amplificaron al menos 4 marcadores genéticos mediante PCR-RFLP, se infirió su genotipo usando la base de datos del genoma de *T. gondii* (*Toxoplasma* genome database -www.toxodb.org-). Con los genotipos obtenidos de los aislamientos (gato 1, gato 5, perro 3 y perro11) se construyó una red filogenética (SplitsTree4), en la cual se incluyeron otros aislamientos obtenidos en nuestro laboratorio, los reportados previamente en México, así como las cepas representativas de cada haplogrupo (GT1, Me49, VEG, ARI, CAST, Cougar, CtCo5, FOU, GAB2-2007-GAL-DOM2, MAS, p89, RUB, TgCatBr5, TgCatBr9, TgCatPRc2, TgCkUg2 y VAND). Las secuencias obtenidas mediante clonación y secuenciación de los genes *SAG3* (226 pb) y *GRA6* (344 pb) fueron alineadas en el programa DNAsp v 5.10 usando el algoritmo ClustalW® y se compararon con las de cepas representativas de los distintos haplogrupos, así como las disponibles en el GenBank®. Posteriormente se realizó el análisis de haplogrupos y recombinación genética. Finalmente, con las secuencias alineadas se determinaron las relaciones genealógicas entre las diversas secuencias usando el programa TCS v 1.21 y PopArt v 1.7 mediante parsimonia estadística. Las digestiones virtuales se realizaron con la herramienta Benchling (www.benchling.com) usando las secuencias de las cepas de referencia GT1, Me49 y VEG.

6. Resultados

6.1 Playa del Carmen, Quintana Roo

Todos los gatos capturados (n=11) tenían condición física de regular a buena; externamente no se encontraron cambios en piel o apéndices corporales. La edad estimada de los felinos iba de 6 meses a 2 años. Durante la necropsia no se encontraron lesiones compatibles con infección aguda o crónica por *T. gondii*.

6.1.1. Histopatología

En los cortes histológicos obtenidos a partir de los tejidos colectados durante la necropsia y teñidos por la técnica de hematoxilina y eosina, no fue posible identificar estructuras parasitarias de fase aguda o crónica compatibles con *Toxoplasma gondii*. Mediante inmunohistoquímica se puso en evidencia la presencia de estructuras inmunopositivas en hígado y bazo de los gatos 1 y 5 (animales de los cuales se obtuvieron aislamientos), compatibles con pseudoquistes de *T. gondii* (**Figuras 10-12**). En el resto de los tejidos no se encontraron estructuras inmunopositivas. Los hallazgos histopatológicos no relacionados con *T. gondii* se describen en el **Apéndice 1**.

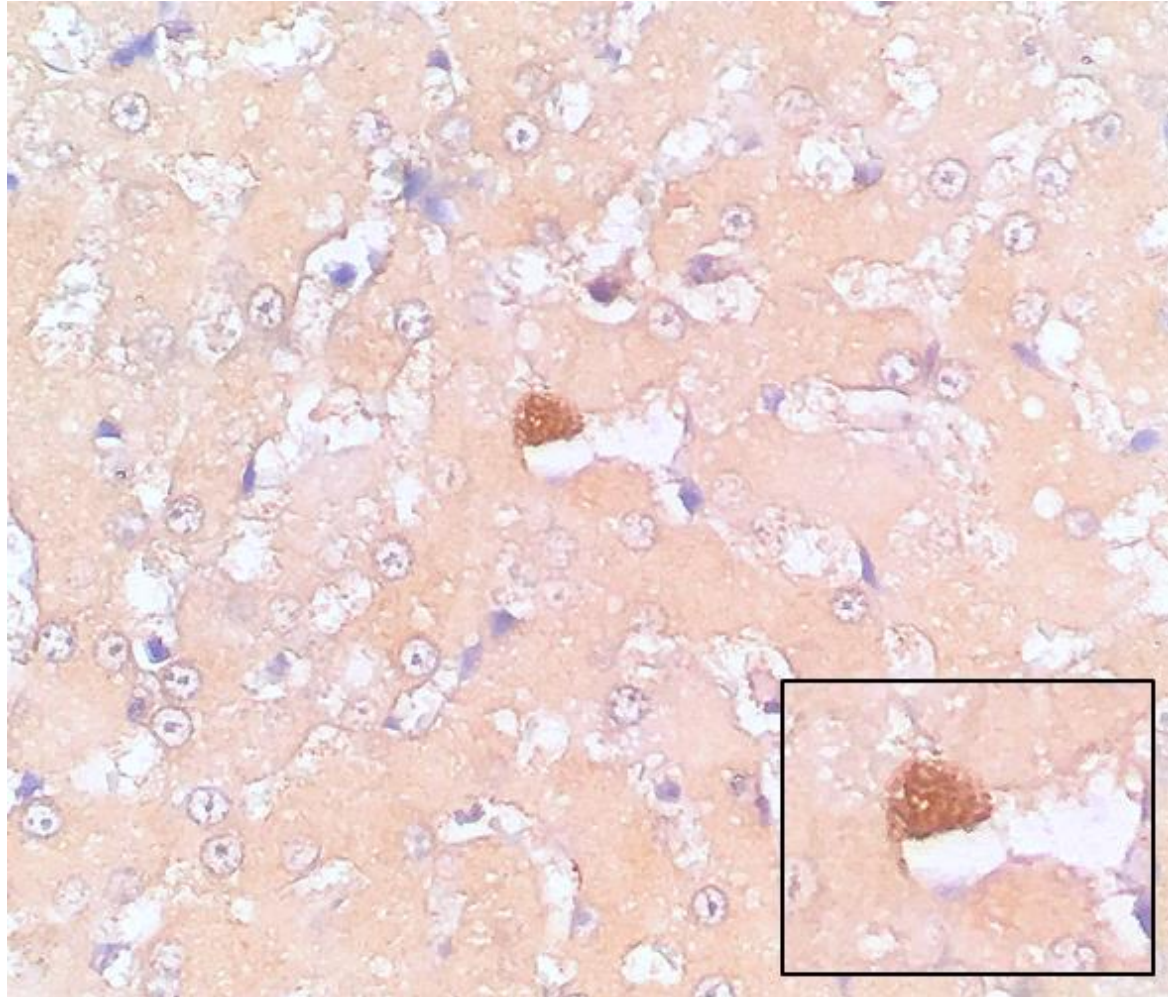


Figura 10. Inmunohistoquímica de hígado (gato 1) con pseudoquiste de *T. gondii*. Se observa sección de hígado sin alteraciones, apreciándose un cúmulo de estructuras inmunopositivas a *T. gondii*, compatibles con taquizoítos en replicación, los cuales se encuentran adyacentes a la pared de un sinusoides hepático, proyectándose a la luz del capilar; en el recuadro se observa detalle del pseudoquiste. IHQ, complejo peroxidasa, Ac. primario 1:200, 500x.

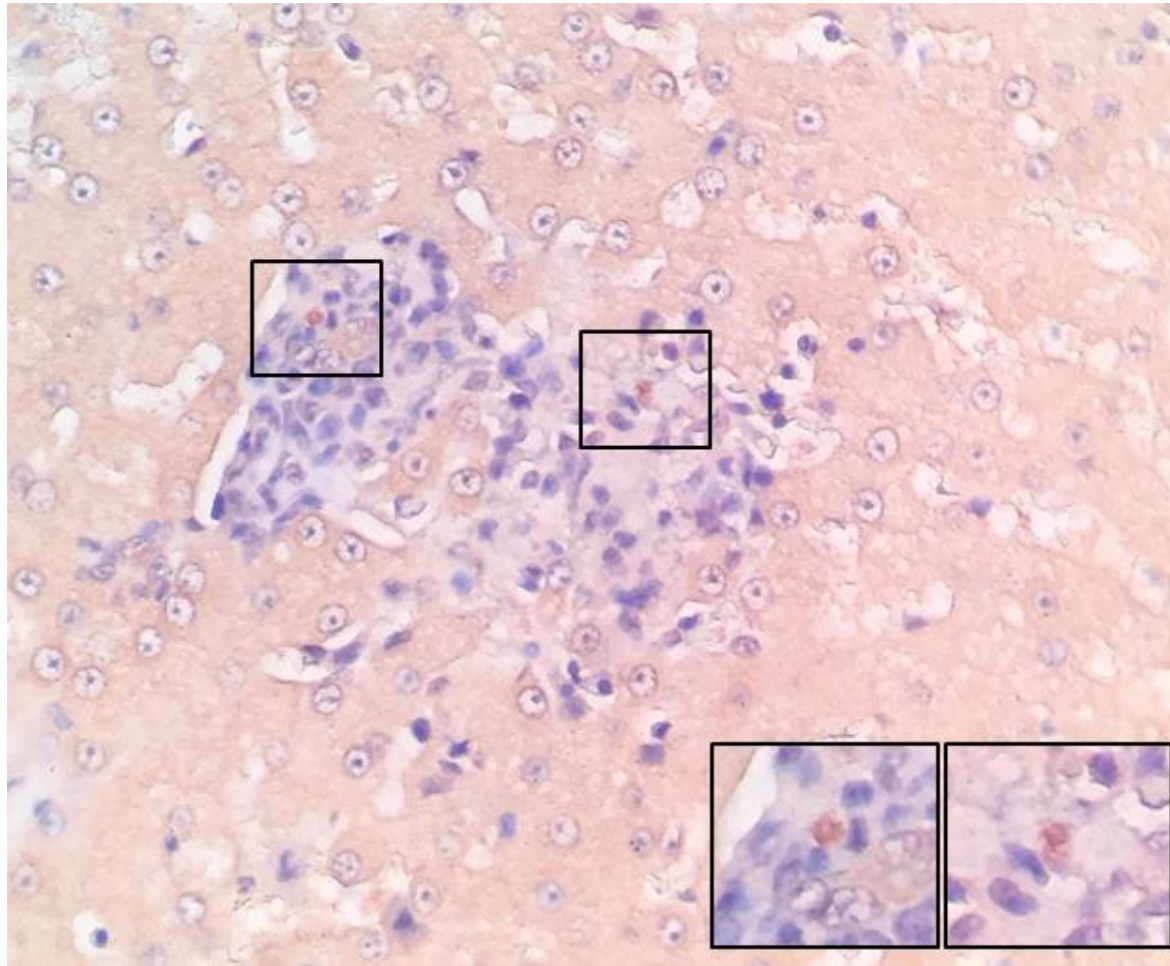


Figura 11. Inmunohistoquímica de hígado (gato 1) con zona de infiltrado inflamatorio. Se observa sección de hígado con zona de infiltrado de células inflamatorias compuesto por linfocitos, macrófagos y escasos neutrófilos, apreciándose intralesionalmente estructuras inmunopositivas a *T. gondii* (recuadros), restringidas por la respuesta inmune del huésped. IHQ, complejo peroxidasa, Ac. primario 1:200, 400x.

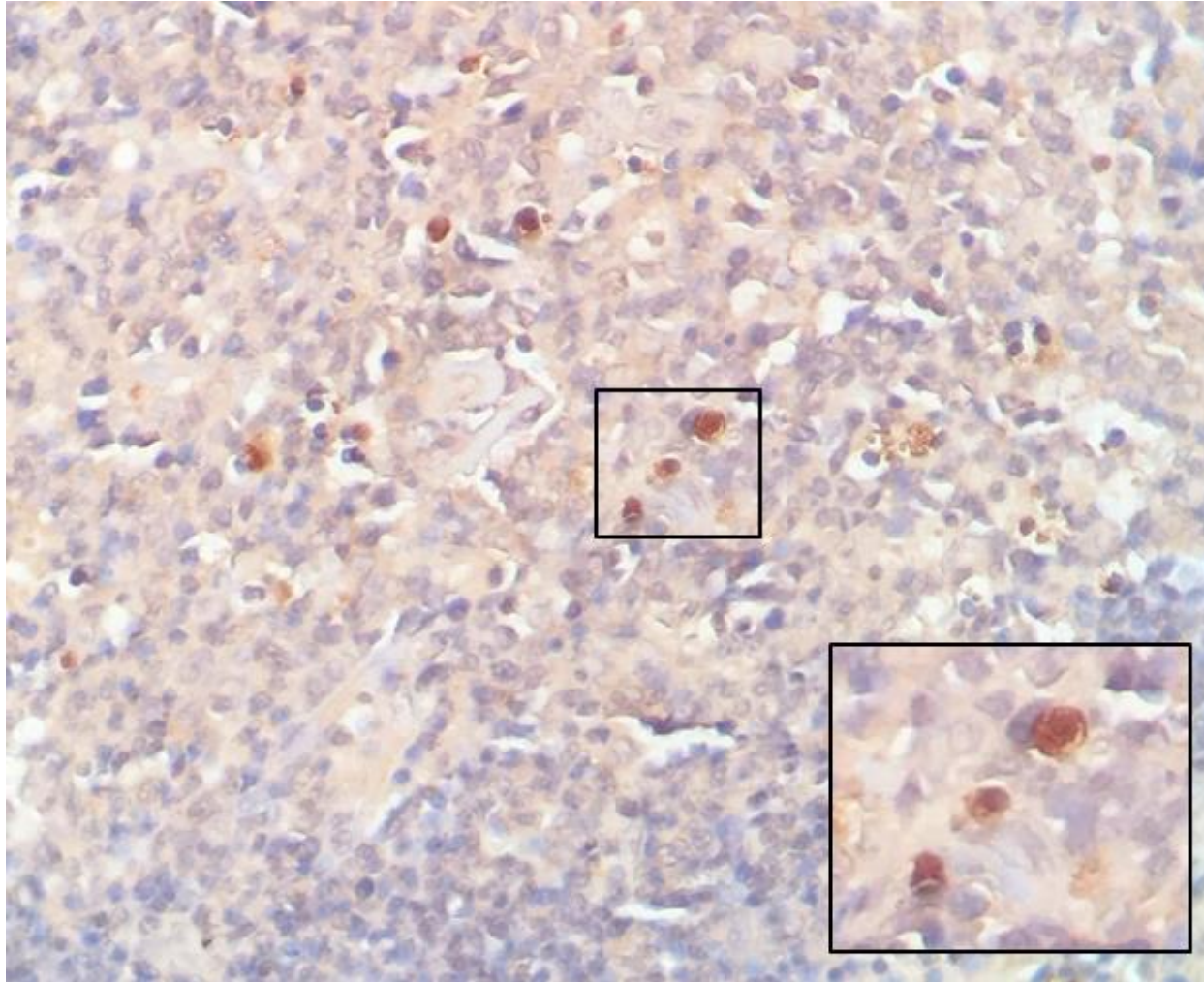


Figura 12. Inmunohistoquímica de bazo (gato 2) con presencia de pseudoquistes de *T. gondii*. Se observa sección de bazo, apreciándose a nivel de un centro germinal, estructuras inmunopositivas a *T. gondii*, compatibles con cúmulos de taquizoítos. En el recuadro se observa detalle de tres pseudoquistes de discreto tamaño. IHQ, complejo peroxidasa, Ac. primario 1:200, 400x.

6.1.2. Serología

De los once gatos de Playa del Carmen, tres fueron positivos a anticuerpos específicos contra *T. gondii* por ELISA indirecto (**Cuadro 3**).

6.1.3. Bioensayo en ratón

Se obtuvieron dos aislamientos de los ratones inoculados intraperitonealmente con la mezcla de corazón y diafragma de los gatos 1 y 5 (TgCatMxQR1 y TgCatMxQR5 respectivamente); sin embargo, estos aislamientos no pudieron ser propagados.

6.1.4. PCR punto final y tiempo real

De las 11 muestras de gatos, 7 fueron positivas para el marcador SeqRep529 específico de *T. gondii*; mediante PCR tiempo real ocho fueron positivas y dos sospechosas para el gen *B1* (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Resultados de serología y PCR de gatos

Especie (n=11)	Edad aproximada (años)	ELISA IgG	snPCR <i>B1</i>	SeqRep529	qPCR <i>B1</i>	Carga parasitaria (p/mL)*
Gato 1	<1	-	+	+	+/-	<50
Gato 2	1	-	+	+	+	15,800
Gato 3	1-2	-	-	+	+/-	1,833
Gato 4	<1	-	+	+	+	<50
Gato 5	<1	-	-	+	+	<50
Gato 6	1	+	+	+	+	1,552
Gato 7	1	+	+	+	+	<50
Gato 8	<1	-	-	-	-	-
Gato 9	<1	-	-	-	+	709
Gato 10	<1	-	+	-	+	<50
Gato 11	1-2	+	+	-	+	<50

+ positivo; - negativo; +/- sospechoso; snPCR: PCR semianidada; qPCR: PCR tiempo real; p/mL: parásitos por mL de sangre; *carga parasitaria determinada mediante qPCR usando curvas patrón.

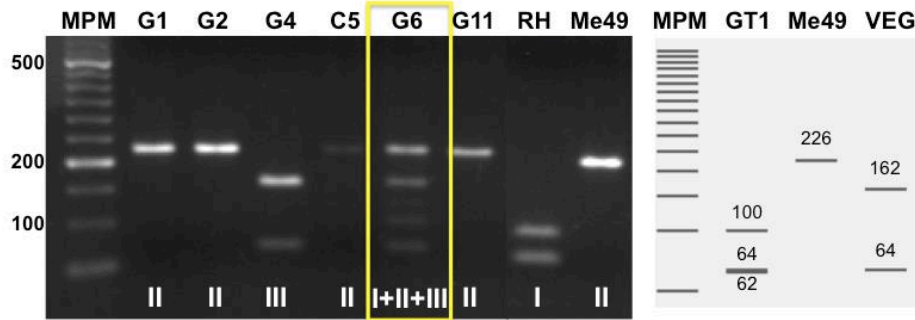
6.1.5. Carga parasitaria en sangre de gatos ferales de Playa del Carmen

El gato 2 fue el que presentó la carga parasitaria más alta con 15,800 parásitos/mL, mientras que los gatos 3, 6 y 9 tuvieron cargas entre 709 y 1,833 parásitos/mL. Los gatos 1, 4, 5, 10 y 11 tuvieron cargas menores a 50 parásitos/mL (**Cuadro 3**).

6.1.6. Genotipificación por PCR-RFLP

Se encontraron infecciones mixtas en 7 de 10 gatos evidenciadas en 5 *loci*: *SAG1* (I+II or III), *SAG2* alt. (I+II), *SAG3* (I+III, I+II+III, I+II y II+III), *GRA6* (I+III) y *c22-8* (I+II y I+III) (**Figura 13**). En el aislamiento TgCatMxQR1 obtenido mediante bioensayo, se obtuvo un patrón de restricción tipo I y III en los genes *SAG3* y *c22-8*. Los resultados demostraron que este felino pudo haber estado infectado hasta con 4 genotipos diferentes de *T. gondii*, el genotipo clásico tipo I (ToxoDB #10), el genotipo #225 y dos variantes nuevas. Adicionalmente, se detectaron dos genotipos en la sangre periférica de este gato, uno nuevo y el ToxoDB #3 (tipo II-like), resultando en hasta seis posibles genotipos en un solo individuo. En un escenario similar está el gato TgCatMxQR5, en el que se detectaron hasta cuatro genotipos en la sangre y dos más en el aislamiento obtenido mediante bioensayo; los seis genotipos serían nuevos. Los gatos TgCatMxQR6 and TgCatMxQR9 comparten dos genotipos, uno nuevo y el ToxoDB #164 o #182. En esta región no se encontraron los genotipos clásicos II y III. Debido a las infecciones mixtas en siete de diez gatos, las combinaciones posibles darían hasta 18 genotipos nuevos infectando a los gatos de esta zona (**Cuadro 4**).

A SAG3



B c22-8

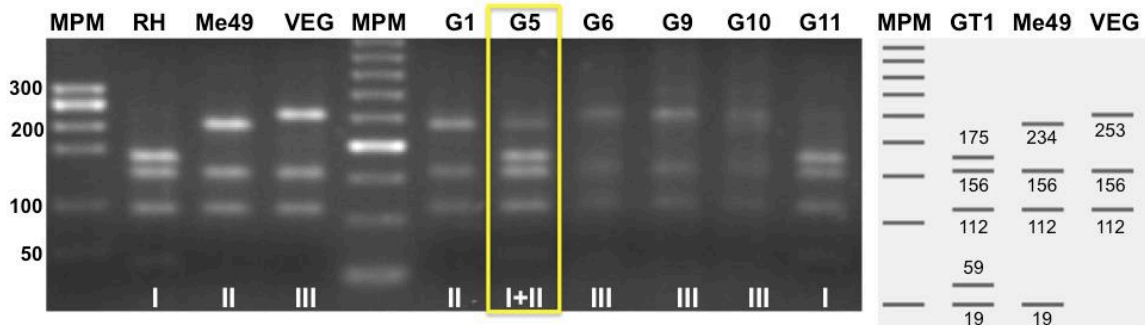


Figura 13. Patrones de PCR-RFLP representativos de infección mixta de *T. gondii* en sangre de gatos ferales. Los patrones de infección triple (A) y doble (B) están resaltados en un recuadro amarillo. Los genotipos resultantes están especificados en la parte inferior de cada carril. MPM: marcador de peso molecular de 50/100 pb; RH, Me49 y VEG son cepas de referencia tipo I, II y III respectivamente; G: identificación de cada gato; a la derecha de los geles: digestión virtual generada con www.benchling.com.

6.1.7. Clonación y secuenciación

La muestra de sangre del gato 11 tenía un patrón de RFLP atípico en el gen *GRA6* (**Figura 14**). Para confirmar este resultado el producto de amplificación fue clonado y secuenciado, resultando en dos alelos diferentes, uno de los cuales (TgCatMxQR11a) fue idéntico a la cepa de referencia (GT1 Tipo I) (TGTT1_chrX; disponible en www.toxodb.org) y la segunda a una cepa parecida a la tipo III (TgCatMxQR11b), similar a la cepa de referencia VEG (tipo III), pero con dos SNPs en las posiciones 196 y 252, que la hacen idéntica a la cepa atípica VAND (disponible en www.toxodb.org sección “Genomes and Data Types” y en el GenBank® con número de acceso AEYJ00000000.2; **Figura 15**), que se encontró en un humano infectado en la Guyana Francesa. La secuencia del

TgCatMxQR11b fue depositada en el GenBank ® con el número de acceso MH196517.

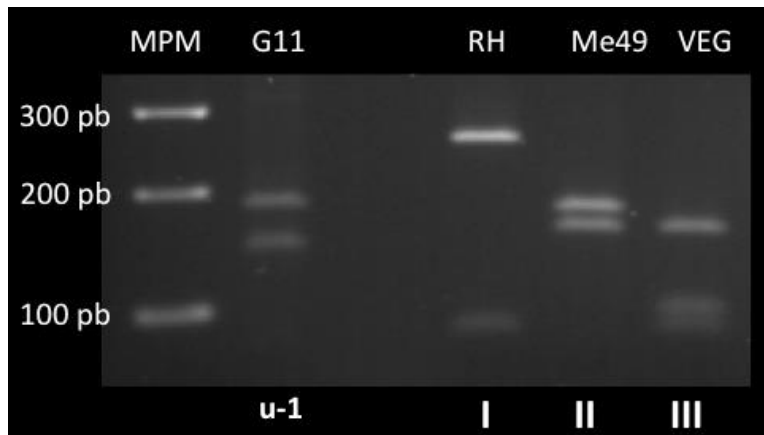


Figura 14. PCR-RFLP del marcador *GRA6* de *T. gondii*. Patrón de corte atípico (u-1) en la muestra del gato 11. Controles positivos DNA de las cepas de referencia RH (I), Me49 (II) y VEG (III). MPM: marcador de peso molecular de 50/100 pb.

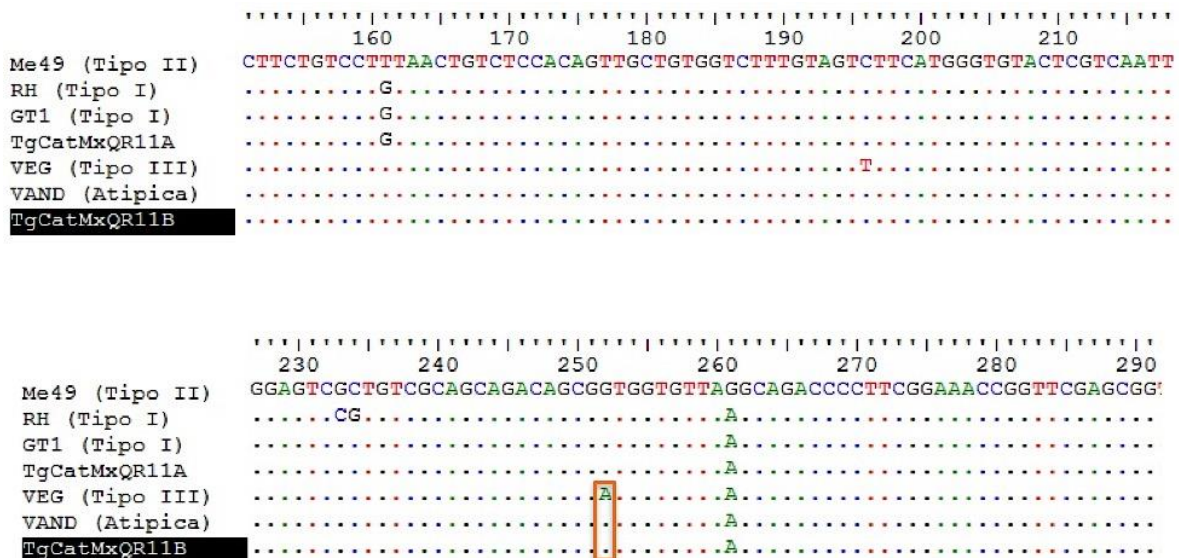


Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias del locus *GRA6* de *T. gondii*. Las dos secuencias aisladas de TgCatMxQR11a y b se alinearon con las secuencias de cepas de referencia tipo I, II y III (RH, Me49 y VEG, respectivamente) y una atípica (VAND); en un cuadro naranja se resalta el polimorfismo de la cepa VAND y TgCatMxQR11b. Alineamiento realizado con BioEdit® v5.0.6

Las infecciones mixtas visualizadas en los gatos 3 y 6 para el gen *SAG3*, se corroboraron mediante clonación (**Figura 16**). Del producto de PCR del gato 3 se obtuvieron 15 colonias que contenían alelos tipo I y II. De éstas, se seleccionaron dos colonias que portaban el alelo I (cl1 y cl15) y dos que portaban el alelo II (cl8 y

cl11) para proliferación de las bacterias y posterior extracción y purificación de plásmido (Figura 17).

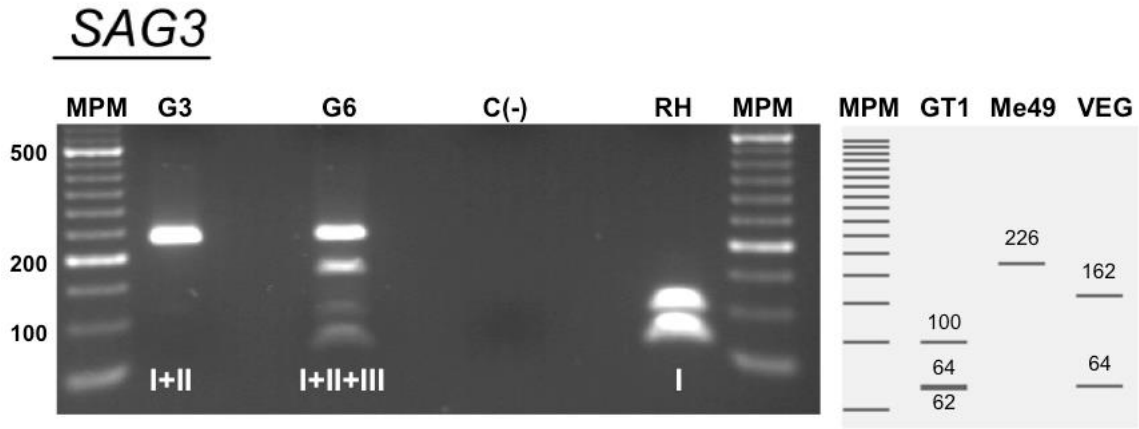


Figura 16. RFLP para el gen *SAG3* del producto de 226 pb de los gatos 3 y 6 en los que se evidenció infección mixta. Digestión con enzima *NciI* a 37°C toda la noche, gel de agarosa 3% con EtBr. Control positivo: DNA de la cepa RH (tipo IMPM: marcador de peso molecular de 50 pb).

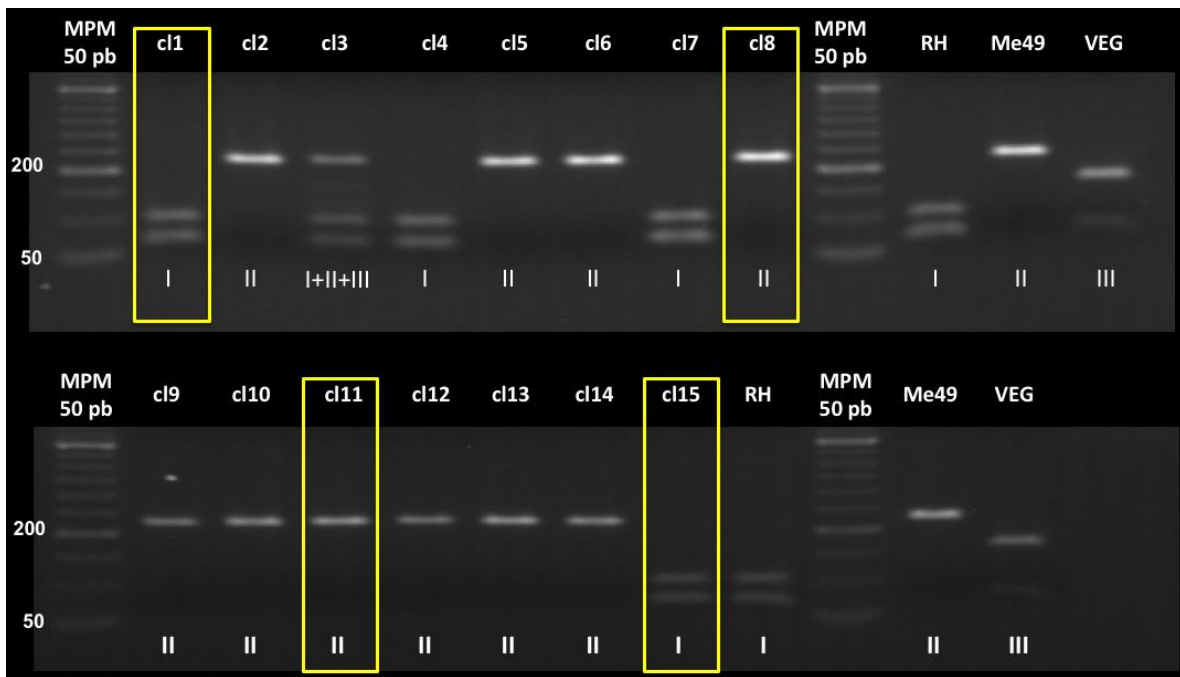


Figura 17. RFLP para el gen *SAG3* del producto de 226 pb de las colonias obtenidas a partir de la muestra de sangre del gato 3 de Playa del Carmen. En recuadros amarillos se resaltan las colonias seleccionadas para extracción, purificación de plásmido y secuenciación. Digestión con enzima *NciI* a 37°C toda la noche, gel de agarosa 3% con EtBr. Control positivo: DNA de las cepas RH (tipo I), Me49 (tipo II) y VEG (tipo III). MPM: marcador de peso molecular de 50/100 pb.

De las secuencias obtenidas a partir de las cuatro clonas (1, 8, 11 y 15) tres fueron idénticas a cepas de referencia: la clona 1 (TgCatMxQR3a) fue idéntica a GT1

(tipo I) y las clonas 8 y 11 (TgCatMxQR3c) a Me49 (tipo II); la clona 15 (TgCatMxQR3b) es una recombinante intragénica I × II, ya que, del nucleótido 1 al 135 es idéntica a GT1 (I) y del 136 al 226 es igual a Me49 (II) (**Figura 18**).

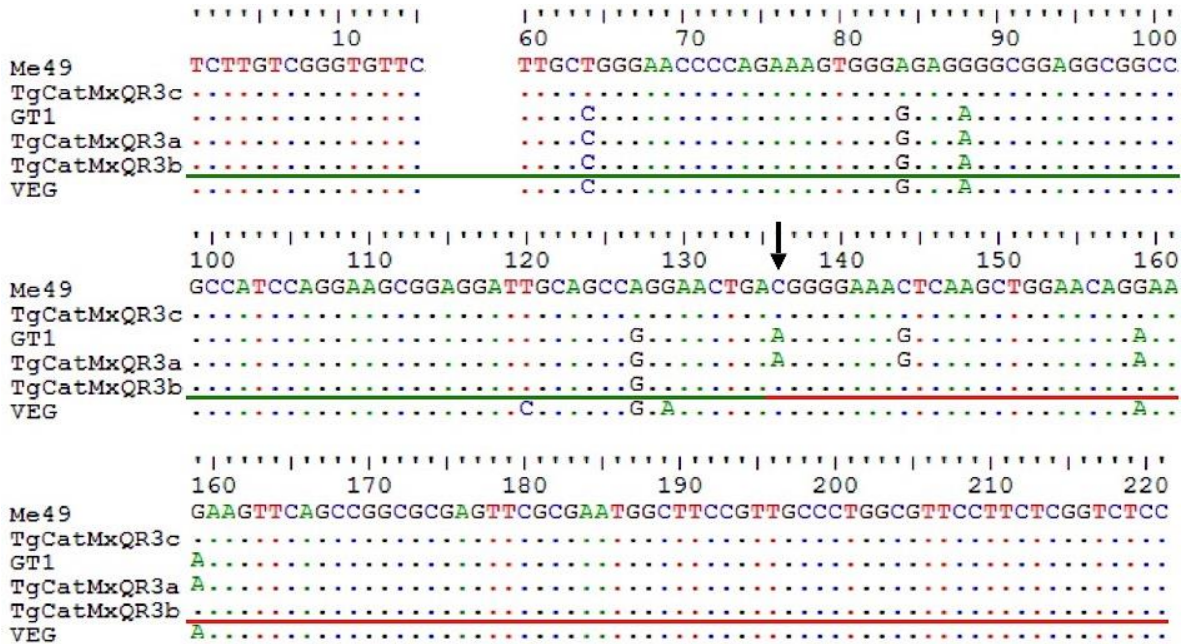


Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias del locus *SAG3* de *T. gondii*. Las tres secuencias aisladas de TgCatMxQR3a, b y c se alinearon con las secuencias de cepas de referencia tipo I, II y III (RH, Me49 y VEG). En la secuencia TgCatMxQR3b se resalta en color verde la región que es idéntica a la cepa tipo I (GT1) y en color rojo la región que es idéntica a cepa tipo II (ME49); con una flecha se señala la región de recombinación intragénica. Alineamiento realizado con BioEdit® v5.0.6

En el caso del producto de *SAG3* obtenido a partir de la muestra de sangre del gato 6, se obtuvieron 15 colonias positivas a este gen y con los alelos tipo I, II y III esperados (**Figura 19**).

A partir de las colonias seleccionadas para secuenciación se obtuvieron tres que son idénticas a las cepas clásicas GT1, Me49 y VEG (tipo I, II y III respectivamente): TgCatMxQR6a, TgCatMxQR6b y TgCatMxQR6c; las secuencias TgCatMxQR6e y TgCatMxQR6f son prácticamente idénticas a la secuencia de Me49, pero tienen SNPs en los nucleótidos 188 (G/A) y 110 (A/G) respectivamente; la secuencia TgCatMxQR6d tiene un SNP en la posición 159 que la diferencia de la cepa VEG. Finalmente, la secuencia tipo III por RFLP TgCatMxQR6g es muy similar a la cepa Me49 (tipo II), pero un polimorfismo en el

nucleótido 59 hace que sea reconocida por la enzima de restricción *NciI* por lo que da un patrón tipo III (Figura 20).

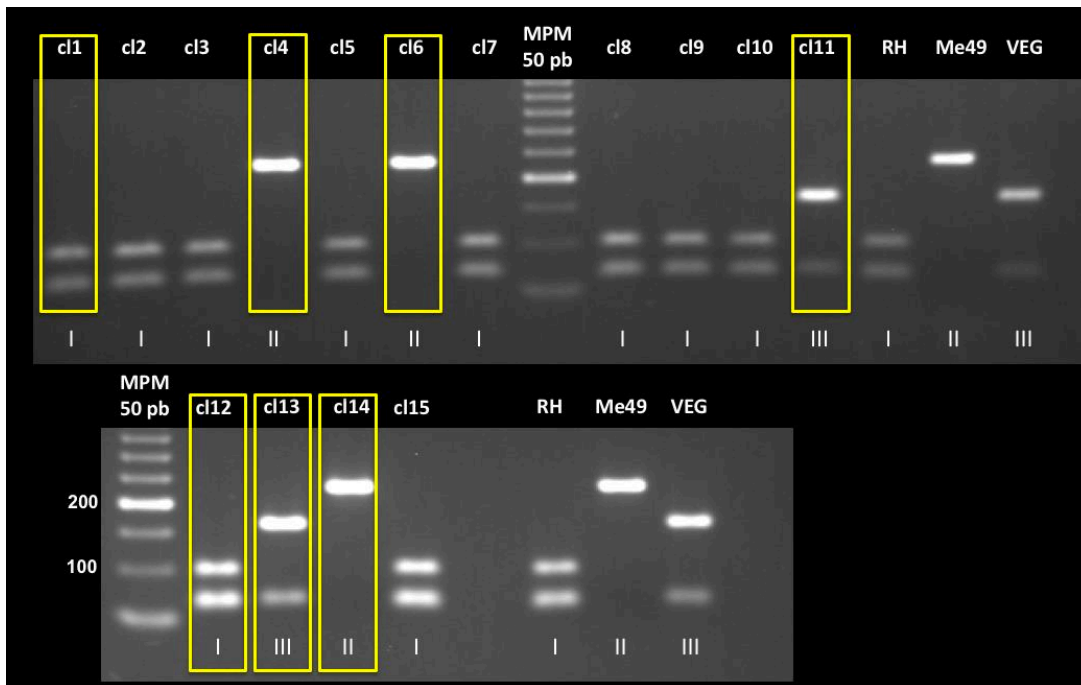


Figura 19. RFLP para el gen *SAG3* del producto de 226 pb de las colonias obtenidas a partir de la muestra de sangre del gato 6 de Playa del Carmen. En recuadros amarillos se resaltan las colonias seleccionadas para extracción, purificación de plásmido y secuenciación. Digestión con enzima *NciI* a 37°C toda la noche gel de agarosa 3% con EtBr. Control positivo: DNA de las cepas RH (tipo I), Me49 (tipo II) y VEG (tipo III). MPM: marcador de peso molecular de 50/100 pb.

Todos los SNPs encontrados en las secuencias obtenidas del gato 3 y 6 fueron corroborados en el electroferograma en las secuencias sentido y antisentido. Las cinco secuencias con polimorfismos únicos tuvieron menos de 100% de identidad entre ellas y con las reportadas en ToxoDB o GenBank, por lo que fueron depositadas en este último con los números de acceso (Números de acceso GenBank: MN562751, MN562752, MN562753, MN562754, MN562755)

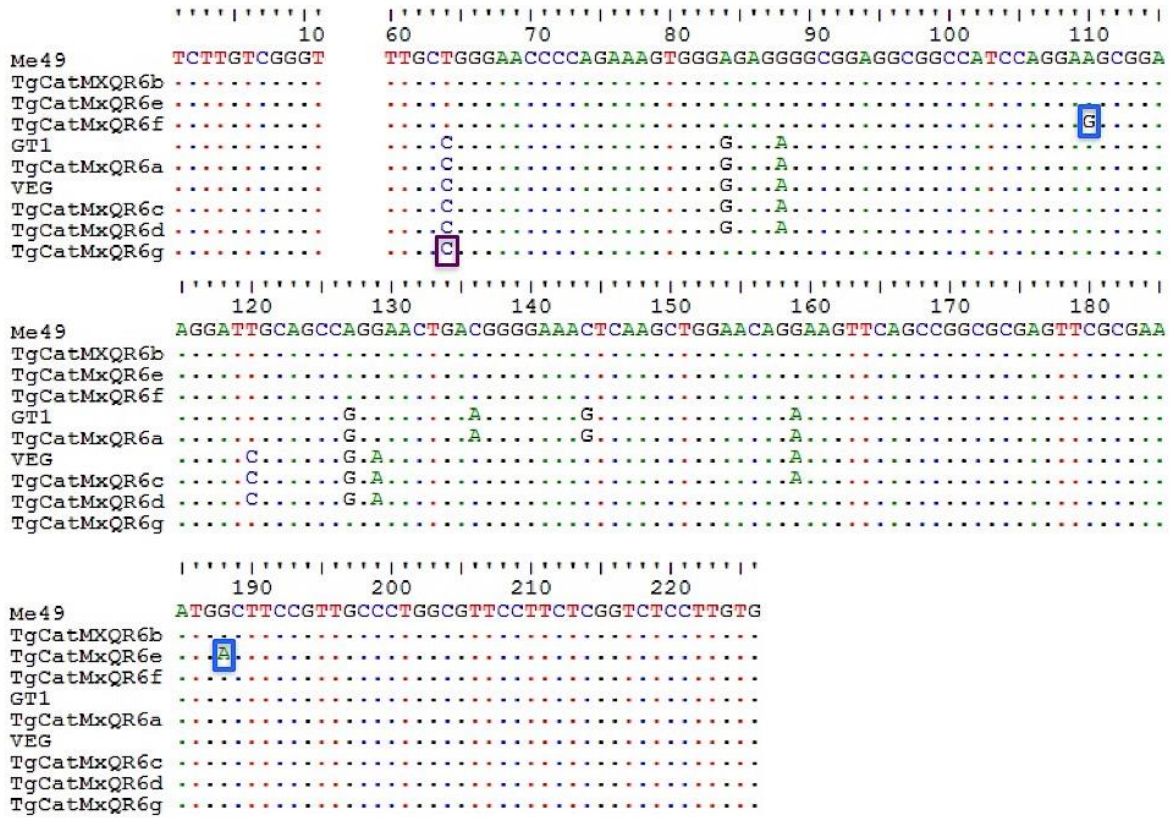


Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias del locus SAG3 de *T. gondii*. Las siete secuencias obtenidas mediante clonación se alinearon con cepas de referencia tipo I, II y III (RH, Me49 y VEG); en cuadros azules se resaltan polimorfismos exclusivos de cepas mexicanas y en un cuadro morado el polimorfismo de cepas tipo I y III. Alineamiento realizado con BioEdit® v5.0.6.

Cuadro 4. Genotipos de *T. gondii* en sangre de gatos ferales de Playa del Carmen, Quintana Roo

I.D.	SAG1	SAG2 Alt.	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	# ToxoDB
Gato 1	II o III	I+II	II	+		II	+	II		I	#3 o Nuevo
Ais. G1*	I	I	I+III	I	I	I+III	I	I	I	I	#10 o #225 o Nuevo
Gato 2	II o III	I	II	+			+			II	Nuevo
Gato 3	+	+	I+II				I		+	+	
Gato 4	I	I	III	+		+	+		+		
Gato 5	II o III	I+II	II	II		I+II	I	II	II	II	Nuevos
Ais. G5*	I	I	I+II	I	III	I	I	I	I	I	Nuevos
Gato 6	I	III	I+II+III			III	+	I		+	#164 o #182 o Nuevo
Gato 7	II o III	+	II	+			+			III	
Gato 9	I	III	II+III		+	III		I			#164 o #182 o Nuevo
Gato 10	I+II o III	I	II+III	I		III	+	II	+		Nuevos
Gato 11	I	III	II	+	I+III	I	+	III			Nuevos

ToxoDB: Clasificación de acuerdo con www.toxodb.org

+ PCR positivo, pero no genotificado por PCR-RFLP

*Ais: Aislamientos obtenidos a partir de tejidos de infección crónica.

Los espacios en blanco indican muestras que no amplificaron para ese marcador genético y en amarillo se resaltan los genotipos nuevos

6.2. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Los perros provistos por la FMVZ-UNACH tenían condición corporal de regular a mala; en la inspección externa, algunos presentaron alteraciones en la piel (sarna) y presencia de ectoparásitos (pulgas y garrapatas no identificadas); todos los perros eran adultos. Durante la necropsia no se encontraron lesiones compatibles con infección aguda o crónica por *T. gondii*.

6.2.1. Histopatología

Al igual que en los tejidos de los gatos, no se encontraron lesiones o estructuras parasitarias compatibles con los estadios de infección aguda o crónica de *T. gondii*.

6.2.2. Serología

De los 11 perros muestreados, ocho fueron positivos a la presencia anticuerpos anti-*T. gondii* (72.7%) (**Cuadro 5**).

6.2.3. Bioensayo en ratón

A partir de la mezcla de corazón y diafragma de los perros #3 y #11 se lograron dos aislamientos TgDogMxChp3 y TgDogMxChp11, los cuales pudieron ser propagados y criopreservados.

6.2.4. PCR punto final y tiempo real

Por PCR los 11 perros fueron positivos a al menos una prueba molecular (PCR tiempo real, PCR punto final) (**Cuadro 5**).

6.2.5. Cuantificación de la carga parasitaria en sangre de perros ferales de Chiapas

En los perros la carga parasitaria fue de < 50 hasta más de 9,000 parásitos por mL de sangre, siendo el perro 4 el que mayor cantidad de parásitos circulantes tuvo (9,454), seguido del perro 3 (8,756). Los perros 2, 6, 8, 9, 10 y 11 tuvieron cargas

parasitarias inferiores a 50 parásitos/mL de sangre (límite de detección en muestras clínicas mediante qPCR) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de serología y PCR de perros

Especie (n=11)	Edad aproximada (años)	ELISA IgG	SeqRep529	qPCR SeqRep529	qPCR gen B1	Carga parasitaria (p/mL)*
Perro 1	>3	-	+	+	+	3,051
Perro 2	>3	+	+	+/-	+	< 50
Perro 3	>3	+	+	+	+	8,756
Perro 4	>3	-	+	+	+	9,474
Perro 5	>3	+	-	+	+	3,055
Perro 6	>3	-	-	+/-	+	< 50
Perro 7	>3	+	+	+	+	444
Perro 8	>3	+	+	+	+	< 50
Perro 9	>3	+	-	+	+	< 50
Perro 10	>3	+	+	+	+	< 50
Perro 11	>3	+	+	+	+	< 50

+ positivo; - negativo; +/- sospechoso; snPCR: PCR semianidada; qPCR: PCR tiempo real; p/mL: parásitos por mL de sangre; *carga parasitaria determinada mediante qPCR usando curvas patrón.

6.2.6. Genotipificación mediante PCR-RFLP

Mediante PCR múltiple anidado, en diez muestras de sangre se amplificó al menos un marcador y pudo ser genotipificado. De los aislamientos obtenidos se pudieron tipificar los diez marcadores (TgDogMxChp3 y TgDogMxChp11). Los *loci* *c29-2* y *L358* fueron los que más frecuentemente se amplificaron (nueve y cinco respectivamente). Se encontraron patrones de infección mixta (I+II) en las muestras de los perros #3 y #9 en el locus *L358*, y se detectó otra infección mixta mediante la clonación de los productos de PCR. Las muestras con cuatro o más marcadores genéticos genotipificados fueron comparadas con la base de ToxoDB; dos genotipos parciales son nuevos (TgDogMxChp2, TgDogMxChp3); sin embargo, debido a la infección mixta, el genotipo del perro TgDogMXChp3 también es compatible con el ToxoDB #142. TgDogMxChp1 podría ser el genotipo ToxoDB #10 (tipo I clásico). Los dos aislamientos obtenidos, TgDogMxChp3b y TgDogMxChp11, fueron ToxoDB #8 y #28 respectivamente. El perro 3 albergaba

al menos tres genotipos diferentes, dos circulando en sangre y uno probablemente enquistado en sus tejidos (corazón y diafragma); la misma situación fue detectada en el perro #11, debido a que tenía un genotipo circulando en sangre y otro diferente en el aislamiento obtenido (**Figura 21**). Los genotipos clásicos II y III tampoco fueron identificados en esta región (**Cuadro 6**).

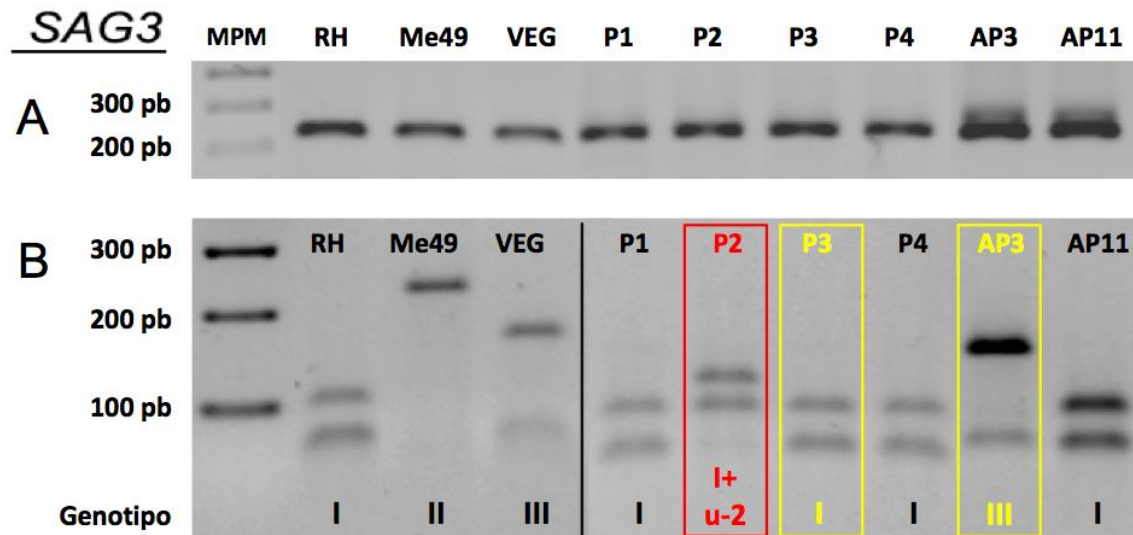


Figura 21. Patrones de PCR-RFLP representativos de infección mixta de *T. gondii* en sangre de perros ferales. A) PCR del locus *SAG3* de muestras de sangre y aislamientos obtenidos de los perros 3 y 11 (AP). B) Patrón de restricción atípico e infección mixta fue detectada en el perro 2 (recuadro rojo); en recuadro amarillo se resalta otra infección mixta en el perro 3. MPM: marcador de peso molecular de 100 pb; RH, Me49 y VEG son cepas de referencia tipo I, II y III respectivamente; P: identificación de cada perro.

6.2.7. Clonación y secuenciación

El perro #2 (TgDogMxChp2) presentó un alelo atípico por RFLP en el marcador *SAG3*, con bandas por encima de las del genotipo I, por lo que fue cortada del gel y clonada en un plásmido recombinante (**Figura 21**). Después de la clonación se obtuvieron dos colonias, TgDogMxChp2a (número de acceso GenBank® MK12786) con secuencia idéntica a la de la cepa clásica GT1 y con patrón de restricción tipo I; y TgDogMxChp2b, con patrón atípico resultado de una combinación intragénica de cepas tipo I y II (**Figura 22**); de las posiciones 1 a la 81, es idéntica a la secuencia de referencia tipo II (Me49, TGME49_308020; disponible en www.toxodb.org) y de la posición 82 a 223 es idéntica a la secuencia de la cepa tipo I (GT1, TGGT1_308020) (**Figura 23**). Usando las secuencias

obtenidas se realizó una predicción *in silico* de los patrones de restricción en el programa Benchling (software de Biología, www.benchling.com). La secuencia TgDogMxChp2b no tuvo identidad del 100% al realizar un análisis BLAST en ToxoBD y GenBank®, por lo que también fue depositada en este último banco con los números de acceso MK12786 and MK12787.

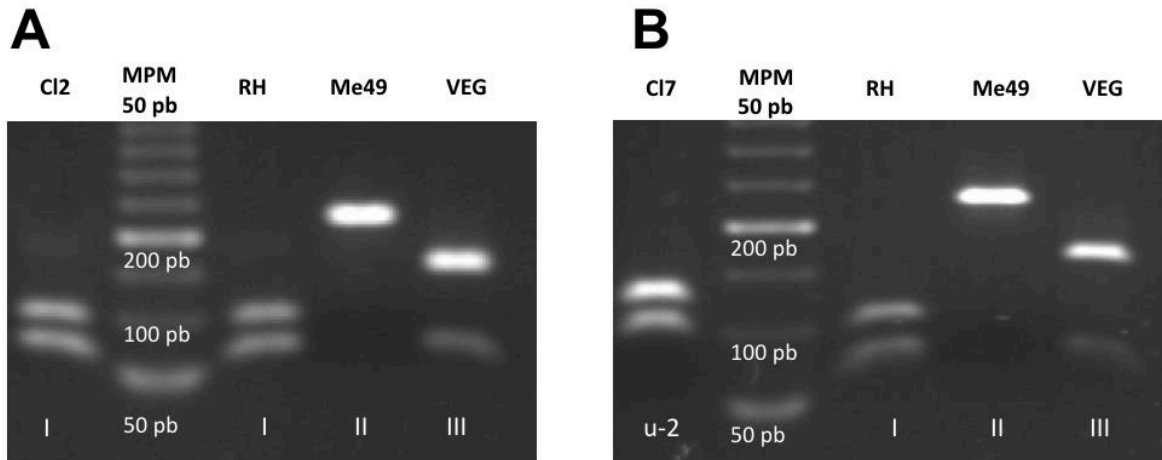


Figura 22. Patrones de PCR-RFLP del gen *SAG3* de *T. gondii* a partir de clones bacterianas transformadas con productos de amplificación del perro 2. La clona 2 presentó un alelo tipo I (A), mientras que la clona 7 (B) presentó un alelo atípico (u-2). MPM: marcador de peso molecular de 50 pb; RH, Me49 y VEG son cepas de referencia tipo I, II y III respectivamente; CI: identificación de cada colonia bacteriana aislada.

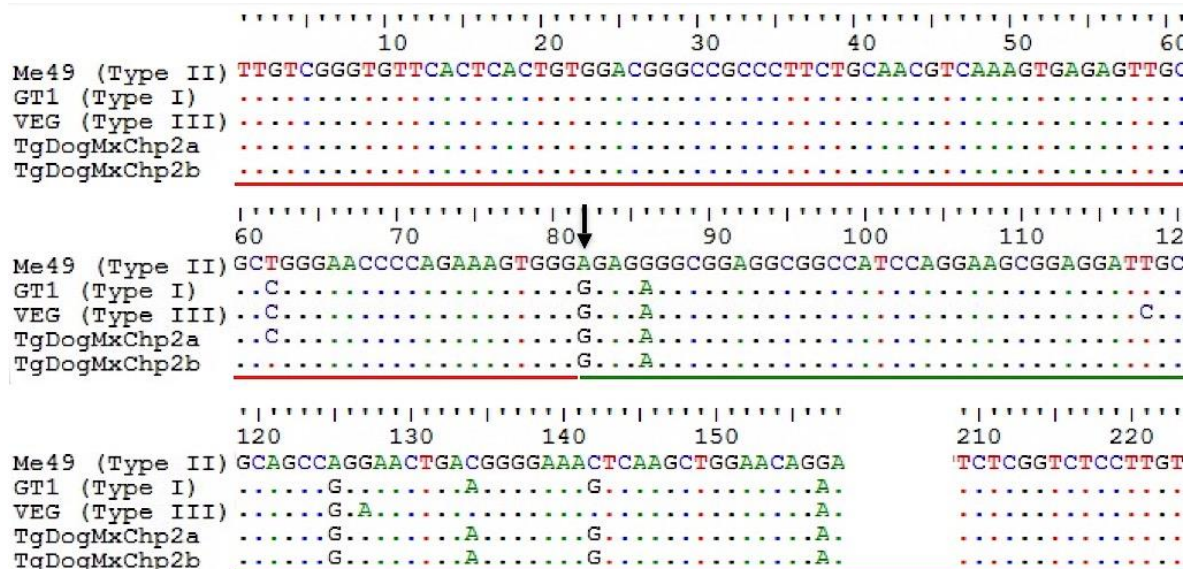


Figura 23. Alineamiento múltiple de secuencias del locus *SAG3* de *T. gondii*. Las dos secuencias clonadas de TgDogMxChp2 (a y b) fueron alineadas con secuencias del gen *SAG3* de cepas de referencia GT1, Me49 y VEG (tipo I, II y III respectivamente). En la secuencia TgDogMxChp2b se resalta en color rojo la región que es idéntica a la cepa tipo II (Me49) y en color verde la región que es idéntica a cepa tipo I (GT1); con una flecha se señala la región de recombinación intragénica. Alineamiento realizado con BioEdit® v5.0.6

6.2.8 Genotipificación de aislamientos de *T. gondii* mediante microsatélites

El análisis de microsatélites reveló la presencia de dos genotipos a partir de los aislamientos obtenidos de los tejidos de los perros 3 y 11. El genotipo del aislamiento TgDogMxChp3 es igual al de la cepa p89 (ToxoDB #08) y a una cepa brasileña (ToxoDB #28) aislada a partir de un caso de toxoplasmosis aguda diseminada en un conejo doméstico. El aislamiento TgDogMxChp11 es un genotipo de microsatélites atípico nuevo, hasta ahora exclusivo para México (Cuadro 7 y Figura 24).

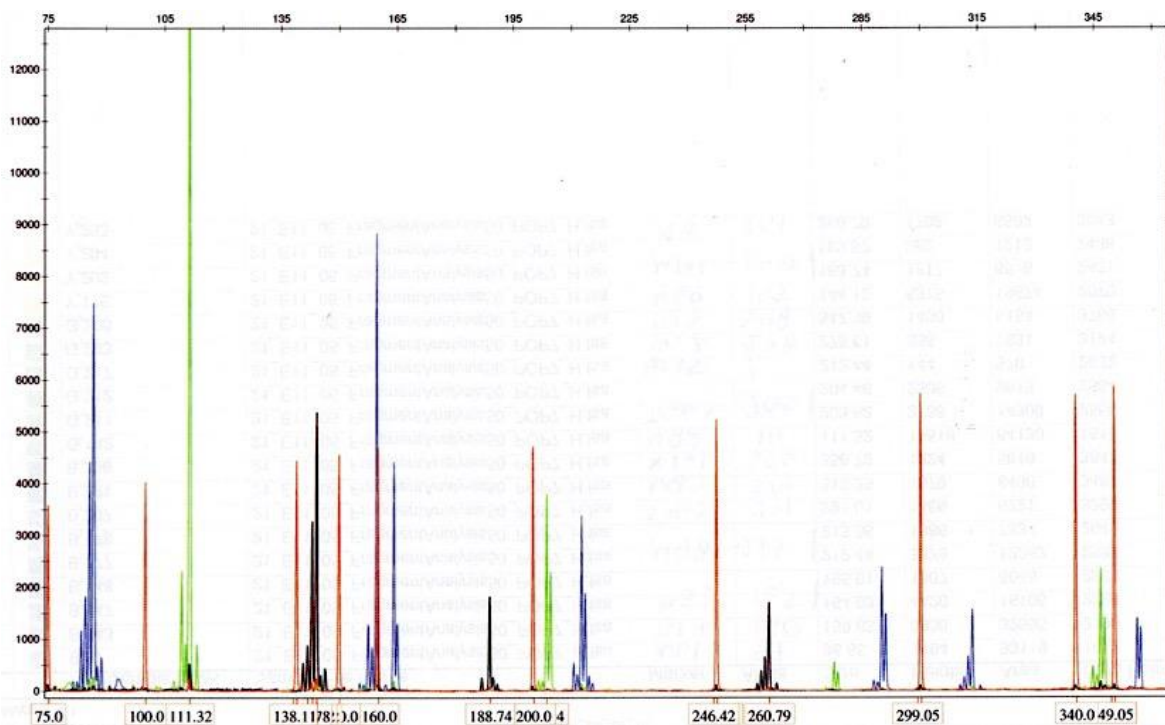


Figura 24. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR múltiplex de 15 microsatélites del aislamiento obtenido del perro 3 (TgDogMxChp3). Electroforesis generada con Genemapper® usando el estándar de peso molecular Rox250.

Cuadro 6. Genotipos de *T. gondii* en sangre de perros callejeros de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

I.D.	SAG1	SAG2 Alt.	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	# ToxoDB
Perro 1	I		I	I				I		I	#10
Perro 2			I+u-2				II				Nuevo
Perro 3			I				II	I+II	+	I	#142 o Nuevo
Ais. P3*	I	III	III	III	III	II	III	III	III	III	#8 BrIII
Perro 4			I				II				
Perro 6							II				
Perro 7							II	+			
Perro 8				I			II	+	+		
Perro 9								I+II	+		
Perro 10							II				
Perro 11	I				III			+			
Ais. P11*	I	I	I	I	I	II	I	III	I	III	#28

ToxoDB: Clasificación de acuerdo a www.toxodb.org

+ PCR positivo, pero no genotipificado por PCR-RFLP

*Ais: Aislamientos obtenidos a partir de tejidos de infección crónica

u-2: alelo único diferente al de las cepas de referencia.

Los espacios en blanco indican muestras que no amplificaron para ese marcador genético y en amarillo se resaltan los genotipos nuevos

Cuadro 7. Genotipificación de aislamientos de *T. gondii* de perros ferales de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas mediante microsatélites

I.D.	Hospedero	País	ToxoDB PCR- RFLP	Marcadores de genotipo								Marcadores de huella génica						Genotipo	Referencia	
				TUB2	W35	TgM-A	B18	B17	M33	MIV.1	MXI.1	M48	M102	N60	N82	AA	N61			N83
GT1	Cabra	EUA	#10	291	248	209	160	342	169	274	358	209	168	145	119	265	87	306	Tipo I	
PTG	Borrego	EUA	#1	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	91	310	Tipo II	Su et al. 2012
VEG	Humano	EUA	#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	188	153	111	267	89	312	Tipo III	
p89	Cerdo	EUA	#08 (BrIII)	291	242	205	160	348	165	278	356	213	190	142	111	261	87	314	Atípico	
TgRbBr	Conejo	Brasil	#28	291	242	205	160	348	165	278	356	213	188	142	111	261	89	314	Atípico	do Nascimento et al. 2017
Aislamientos de Chiapas																				
TgDogMxChp3	Perro	México	#08 (BrIII)	291	242	205	160	348	165	278	356	213	190	145	111	261	87	314	Atípico	Este estudio
TgDogMxChp11			#28	291	248	205	158	342	165	276	358	211	168	147	119	277	89	314	Atípico (Nuevo)	

I.D.: identificación de los aislamientos

GT1, PTG y VEG cepas de referencia de los genotipos I, II y III, respectivamente.

Números en cursivas y negritas indican aislamientos con mismo genotipo

6.3 Bioinformática

6.3.1 Red filogenética de *T. gondii* (RFLP)

En la **Figura 25** se puede apreciar que en la red de genotipos hay tres ramas principales, en las cuales están los genotipos clonales I, II y III. Los aislamientos obtenidos en nuestro laboratorio, y en el presente proyecto de investigación, se mantienen cerca de los linajes I y III, con uno de los genotipos obtenidos del gato 1 de Quintana Roo y H1 de un caso humano de toxoplasmosis congénita en la misma rama que la cepa RH (ToxoDB #10 –haplogrupo 1-); los demás se mantienen muy cerca de éstos. Por otro lado, el aislamiento del TgCatMxQr5.1b se agrupa más cerca del genotipo BrI (haplogrupo 6). En una rama adyacente se encuentran agrupadas las cepas con genotipo #28 (TgDogMxChp11 y G32) CAST (haplogrupo 7). En la otra rama, donde se encuentran las cepas tipo III – haplogrupo 3- (CTG y VEG) están los aislamientos con mayor cantidad de alelos tipo III como lo son TgDogMxChp3 (#08) y p89 (#08 tipo BrIII –haplogrupo 9-). El genotipo nuevo a partir del caso congénito H1 se mantiene aislado en medio de las ramas tipo I y III. En la rama de las cepas tipo II (haplogrupo 2) se mantienen cerca los linajes del haplogrupo 12 (X y A); ninguno de los aislamientos de México se agrupa cerca de éste. Los aislamientos provenientes de Durango se distribuyen de manera independiente en la red filogenética y se mantienen distantes de los aislamientos obtenidos por nuestro grupo de trabajo.

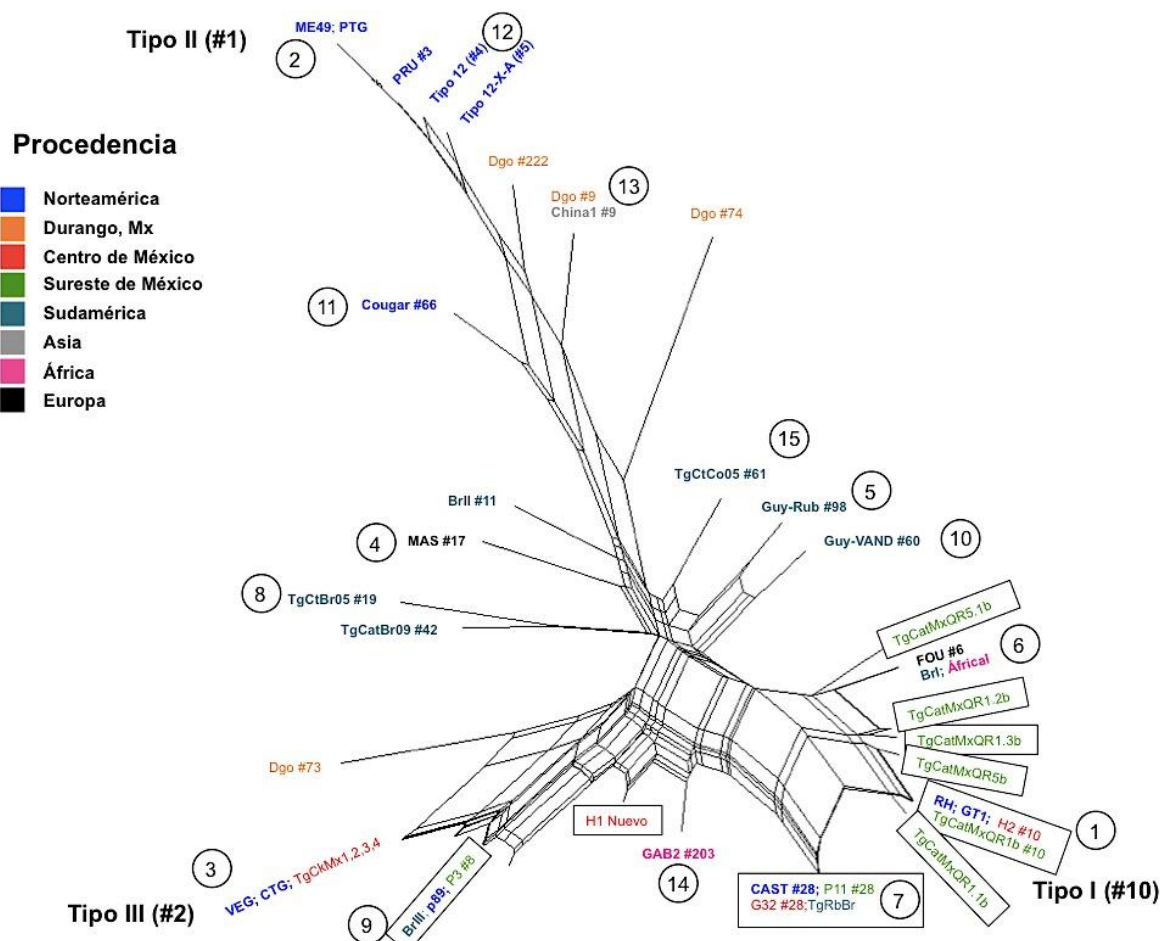


Figura 25. Red filogenética de aislamientos de México y cepas representativas de los haplogrupos de *Toxoplasma gondii*. En colores se detalla la procedencia de los aislamientos. Los círculos denotan el número de haplogrupo. Red filogenética generada con SplitsTree4 v4.14.

6.3.2 Análisis de genealogía

Con las secuencias obtenidas a partir de los productos clonados de los genes *GRA6* y *SAG3*, provenientes de las muestras de gatos y perros, así como con secuencias descargadas del GenBank y ToxoDB, se construyeron redes de haplotipos utilizando el algoritmo TCS (TCS v1.21 y PopArt v1.7).

Para el gen *GRA6* se descargaron 95 secuencias que cumplieron con la longitud de 344 pb. Con el programa DNAsp se identificaron 36 haplotipos y 51 sitios polimórficos; además se predijo una región de recombinación entre los nucleótidos 196 y 252. Posteriormente se construyó la red de haplotipos y se obtuvo la siguiente topología: las cepas con secuencia tipo III clásica son las que tuvieron mayor número de representantes y a partir de las cuales el resto de las

secuencias se fueron diversificando. La secuencia TgCatQR11a obtenida a partir de la sangre del gato #11 fue agrupada con otras 19 secuencias tipo I clásico, provenientes de aislamientos de E.U.A. e Italia principalmente; mientras que la secuencia TgCatQR11b se agrupó con la cepa VAND y a un paso mutacional de otras cepas atípicas y virulentas para el humano como la cepa FOU, RUB y MAS provenientes de Francia y Guyana Francesa (**Figura 26**).

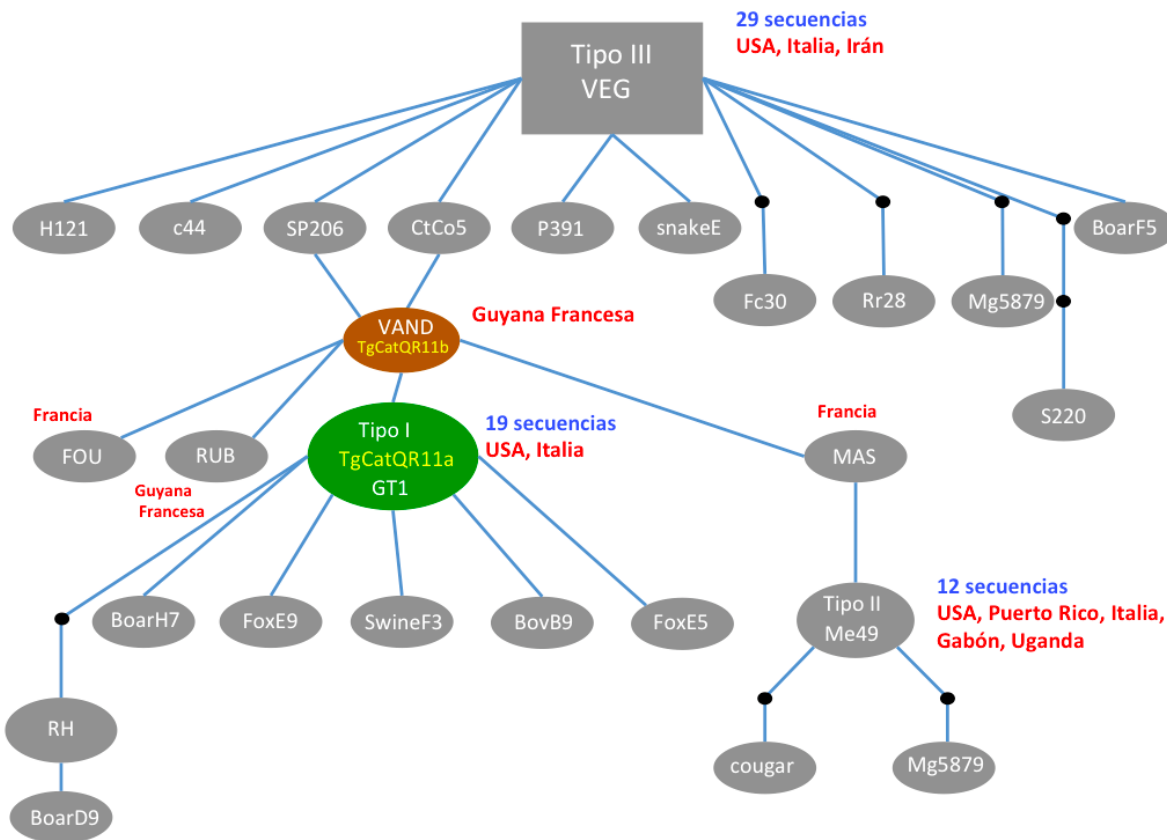


Figura 26. Red de haplotipos obtenida con el método de parsimonia estadística con base en las secuencias del gen *GRA6* de *T. gondii*. El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias. Los nodos negros indican haplotipos no muestreados o extintos. Cladograma generado con TCS v1.21.

Para el gen *SAG3* se analizaron 206 secuencias en total y mediante el programa DNAsp® se pudieron identificar 16 haplotipos diferentes que en total contenían 16 sitios polimórficos y la predicción de cuatro regiones de recombinación: 62-86, 86-108, 108-118, 127-142 pb. Finalmente, se generó un cladograma (**Figura 27**; PopArt v1.7); seis de las 12 secuencias del presente proyecto se agruparon en los

nodos de las cepas de referencia I, II o III (GT1, Me49 o VEG respectivamente), mientras que las 6 restantes se distribuyeron en la periferia de las mismas o a varios pasos mutacionales.

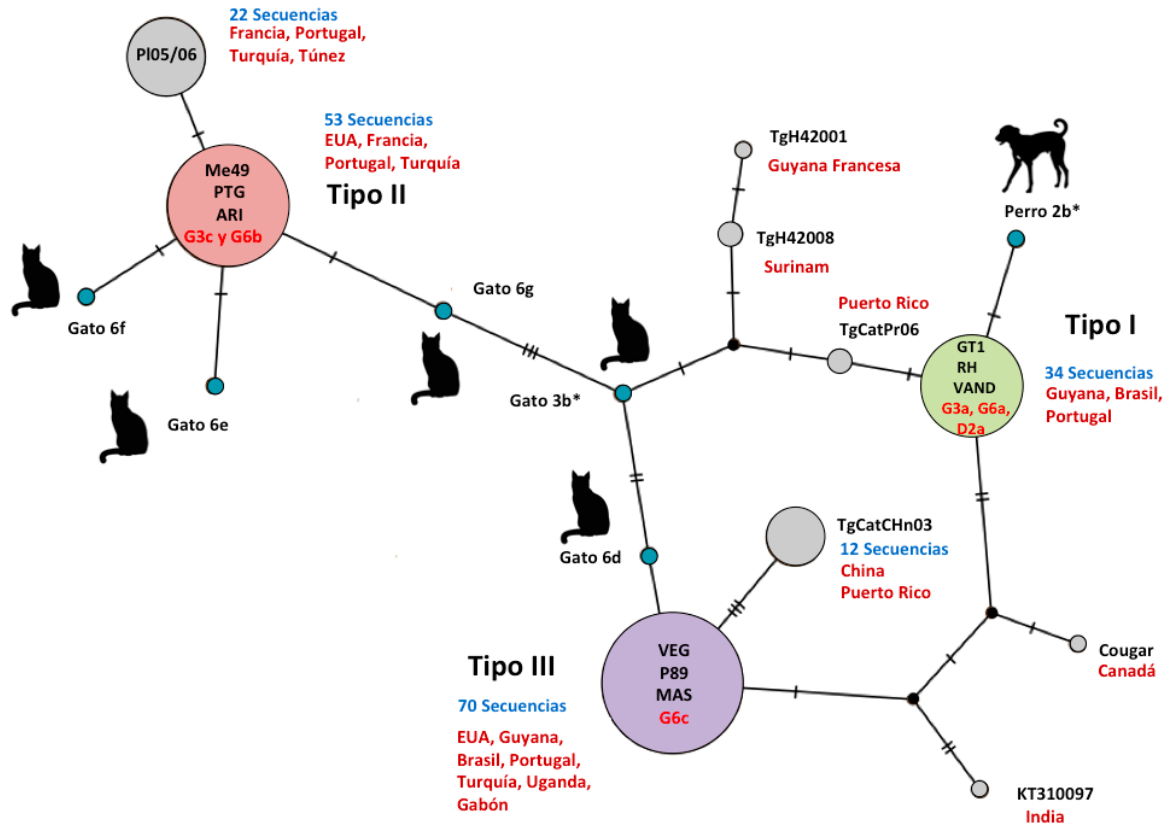


Figura 27. Red de haplotipos obtenida con el método de parsimonia estadística con base en las secuencias del gen *SAG3* de *T. gondii*. El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias. Las líneas transversas y nodos negros indican haplotipos no muestreados o extintos, en círculos azules se resaltan los haplotipos de secuencias mexicanas que no se agrupan con otras previamente reportadas. Los asteriscos (*) denotan secuencias recombinantes. Cladograma generado con PopArt v1.7.

7. Discusión

México se encuentra en la zona de transición de las zonas neártica y neotropical; en la región neártica la estructura poblacional de *T. gondii* tiende a ser clonal con el predominio de cinco genotipos, mientras que en la región neotropical se han descrito más de 150 genotipos diferentes. En esta última se ha encontrado la mayor cantidad de genotipos de *T. gondii* y los países en los que se han reportado tienen condiciones climáticas muy semejantes a las que encontramos en el sureste mexicano. Si bien se han hecho algunos estudios para determinar la presencia de *T. gondii* en la región, ésta es la primera vez que se logra genotipificar al parásito a partir de muestras de sangre de gatos ferales y perros callejeros de Quintana Roo y Chiapas respectivamente; estos animales pueden ser usados como centinelas de infección por *T. gondii*, ya que se mantienen en estrecho contacto con el humano y podrían estar infectados con los mismos genotipos que circulan en población humana.

7.1 Serología

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 2006, la prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en el sureste de México y en la península de Yucatán son superiores al 70% en seres humanos (Caballero-Ortega et al., 2012). En Quintana Roo solo hay un estudio de frecuencia de infección por *T. gondii* en mamíferos marinos (delfines y lobos marinos) en el cual encontraron 81.6% de individuos positivos por aglutinación modificada (MAT) (Alvarado-Esquivel et al., 2012). En el presente estudio se encontraron frecuencias de infección de 27.3 y 72.7% en suero de gatos y perros del sureste mexicano, respectivamente; en el caso de los perros callejeros el resultado concuerda con lo reportado en la ENSANUT 2006 para el estado de Chiapas (>70%), mientras que la frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en los gatos ferales de Playa del Carmen es la más baja de la región.

7.2 Biología molecular

De los 22 animales muestreados en ambos sitios, 21 fueron positivos por al menos una prueba molecular en sangre, lo cual indica que hay una fuerte presión infectiva del parásito en el sureste mexicano. En Yucatán, Castillo-Morales et al. (2012) encontraron 79% de gatos domésticos positivos a DNA de *T. gondii* en sangre, mientras que Ortega-Pacheco et al. (2013) detectaron al parásito en sangre de 50.8% de cerdos en engorda. Hace algunos años se creía que el parásito sólo circulaba en sangre periférica de individuos con toxoplasmosis diseminada, probablemente porque la sangre no era un tejido blanco en sujetos sanos, pero algunos estudios recientes han demostrado que el parásito se puede encontrar circulando libre en sangre y en el interior de leucocitos, aunque esto sucede básicamente durante la fase aguda (Harker et al., 2015; Konradt et al., 2016; Sánchez et al., 2014). Sin embargo, y dado que los gatos no tenían problemas clínicos ocasionados por *T. gondii*, es posible que el DNA del parásito esté circulando, dentro de células, en vesículas tipo exosomas o de forma libre (Ivović et al., 2007). También es posible que en individuos con infección crónica haya ruptura de quistes tisulares que provoque la salida y conversión de bradizoítos a taquizoítos, que se replican en células adyacentes y algunos pueden alcanzar la circulación sistémica (Ivović et al., 2007; Rougier et al., 2017). Estas hipótesis están apoyadas por la reactivación que ocurre cuando hay inmunosupresión (Rougier et al., 2017; Weiss y Kim, 2013).

La discrepancia entre los resultados de la PCR y la serología en los gatos se puede deber a problemas técnicos del ELISA, como la baja sensibilidad del ensayo debido a que el extracto crudo que se utiliza como antígeno proviene de la cepa RH (tipo I), por lo que podría no detectar la mayoría de los anticuerpos producidos en contra de la gran diversidad de cepas que infectaron a estos gatos. A pesar de que se modificó el cálculo del punto de corte haciéndolo más flexible al reducir el número de desviaciones a dos (normalmente se calcula con tres desviaciones estándar), no se obtuvieron más casos positivos. En el caso de los perros de Chiapas se pudo determinar que ocho eran positivos mediante ELISA, por lo que la sensibilidad del ensayo no estaría comprometida, y es de notar que

estaban infectados con menos cepas simultáneamente. Otro posible escenario es que los animales se habían infectado recientemente y no tenían niveles de IgG detectables en suero, ya que se ha reportado la presencia de taquizoítos circulando en sangre seis días después de la infección en ratones inoculados con quistes tisulares vía oral (Mitsunaga et al., 2019). Otra explicación es que debido a la despoblación linfoide en nódulos linfáticos y bazo (puesta en evidencia mediante histopatología en este estudio) los títulos de anticuerpos estuvieran por debajo del umbral de detección del ELISA, ya que se ha reportado que en gatos infectados con virus que ocasionan inmunosupresión, como los virus del SIDA o el de la leucemia felina pueden ocasionar falsos negativos (Hartmann, 2011); en cortes histológicos se encontraron cuerpos de inclusión sugerentes de infecciones virales en los gatos; sin embargo, es improbable que haya habido inmunosupresión, de lo contrario se hubieran encontrado lesiones asociadas a la infección por *T. gondii*. Además de estos posibles escenarios, existe la posibilidad de que en la fase crónica los niveles de anticuerpos se encuentren por debajo del límite de detección; esto se ha apoyado recientemente ya que se han descrito aislamientos de *T. gondii* a partir de animales seronegativos; es decir, al paso de los años los títulos de anticuerpos fluctúan. Cabe resaltar, que en las reinfecciones o reactivaciones del parásito los anticuerpos suelen aparecer en niveles detectables rápidamente, tal y como se ha reportado en casos de pacientes humanos que nacieron infectados por *T. gondii* y que en pruebas serológicas a las que son sometidos a lo largo de su vida pueden resultar positivos o negativos, o por estudios de incidencia en borregos del estado de Colima en el que se encontró desaparición de anticuerpos en un animal que diez meses antes tenía altos títulos de anticuerpos (Caballero-Ortega et al., 2008; Opsteegh et al., 2019; Rougier et al., 2017; Ruffolo et al., 2016). Dadas las evidencias obtenidas y que la mayoría de los gatos eran jóvenes (menos de un año de edad), lo más probable es que la mayoría de los animales se acababan de infectar, ya que mediante histopatología no se encontraron quistes tisulares y la inmunohistoquímica solo identificó estructuras compatibles con pseudoquistes en bazo e hígado, lo que sugiere

infección aguda. Esto refuerza la gran presión selectiva existente en la región, pues ocasiona infecciones múltiples en animales jóvenes.

7.2.1 Determinación de carga parasitaria

La carga parasitaria encontrada en las muestras de sangre de los gatos y los perros no concordó con el número de *loci* tipificados mediante RFLP, ya que en algunos animales con cargas entre 3,000 y 15,000 parásitos/mL de sangre se pudieron tipificar pocos marcadores, mientras que en algunas muestras que contenían menos de 50 parásitos/mL se lograron caracterizar más de cinco marcadores. Asimismo, tampoco hubo relación entre la carga parasitaria y el estado serológico de los animales, ya que los animales seropositivos tuvieron cargas que iban desde <50 a 1,552 parásitos por mL de sangre, mientras que en los seronegativos también hubo individuos con cargas por debajo del umbral de detección hasta los 15,800 parásitos por mL. Un fenómeno similar se observó en casos de toxoplasmosis congénita del valle de México, en el cual tampoco hubo concordancia entre la carga parasitaria y el número de marcadores tipificados mediante RFLP (Rico-Torres et al., 2018). A la fecha no se han encontrado más referencias que documenten la relación entre el número de marcadores tipificados y la carga parasitaria a partir de muestras clínicas. En las publicaciones que reportan carga parasitaria generalmente solo lo hacen para el diagnóstico de la toxoplasmosis; por el contrario, cuando reportan la genotipificación del parásito, lo hacen a partir de aislamientos obtenidos mediante bioensayo en ratón o, en el caso de muestras clínicas, no cuantifican la carga parasitaria; por lo que este trabajo sería de los pioneros en realizar ambos ensayos moleculares.

7.2.2 Genotipificación mediante PCR-RFLP

Los estudios sobre genotipificación en México son escasos; sin embargo, la caracterización genética es crucial ya que el genotipo puede determinar la presentación y la severidad de la toxoplasmosis. En este estudio se obtuvieron resultados sorprendentes, ya que se detectó una gran frecuencia de infecciones mixtas (7/10 gatos y 4/10 perros) y animales que estaban infectados hasta con

siete cepas de *T. gondii*. En Playa del Carmen se evidenció una gran variabilidad de genotipos en gatos de una región pequeña, mientras que en Tuxtla Gutiérrez la diversidad fue menor, pero debe tomarse en cuenta que se muestrearon perros callejeros, los cuales, aunque pueden llegar a cazar y alimentarse de mamíferos pequeños, tienden a relacionarse más estrechamente con el humano y comer desperdicios de estos últimos (National Research Council (US) Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, 1991).

Las infecciones mixtas no son comunes; han sido reportadas principalmente en humanos, animales de Sudamérica (gatos domésticos, felinos silvestres, pollos, borregos y humanos) y fauna silvestre de España, con dos o tres patrones de RFLP para un marcador específico (Aspinall et al., 2003; Calero-Bernal et al., 2015; Cañón-Franco et al., 2013; Cunha et al., 2015; Dubey et al., 2008, 2007; Lindström et al., 2008; Pena et al., 2008; Verma et al., 2017). Particularmente, los hallazgos de infecciones triples son escasos: Boughattas y colaboradores (2010) reportaron casos de infección doble y triple en los marcadores *SAG3* y *BTUB* a partir de muestras de líquido amniótico y placenta de seres humanos en Túnez, mientras que en Uganda se encontraron gallinas con infección doble y triple, usando cinco marcadores genéticos (Lindström et al., 2008). En México hay dos antecedentes sobre infecciones mixtas: en un león y un muflón de una colección privada de Puebla con infección triple (I+II+III) puestos en evidencia con el marcador *SAG3*, y casos de toxoplasmosis congénita en humanos del Valle de México: en cinco de nueve binomios madre-hijo se detectaron infecciones dobles (Rico-Torres et al., 2018; Valenzuela-Moreno, 2014).

Una de las razones por las que probablemente no se reportan infecciones mixtas por *T. gondii* es que en la mayoría de los estudios se hace la genotipificación a partir de aislamientos en ratón y generalmente se utilizan tejidos de uno o dos órganos, lo cual puede limitar la obtención de taquizoítos de diversos genotipos presentes en un huésped, ya que los roedores pueden eliminar alguna cepa (Lindström et al., 2008; Wendte et al., 2011). El origen de las infecciones mixtas de este estudio se puede deber a que los animales muestreados se reinfectaron con otro genotipo de *T. gondii* o comieron presas o sobras de alimento contaminadas

con variantes diferentes en unos cuantos días. Los dos escenarios son posibles porque en las áreas estudiadas los animales tienen acceso a sobras de alimento, basureros y presas sinantrópicas y silvestres.

De acuerdo con el consorcio de ToxoDB, el hallazgo de infecciones mixtas que obtuvimos en los gatos de Quintana Roo podría resultar en al menos 23 combinaciones de genotipos, de los cuales 18 serían nuevos a nivel mundial. Los otros cinco genotipos ya reportados serían el #225, similar a un aislamiento de una gallina de China y una muestra clínica de un caso de toxoplasmosis congénita del Valle de México (Rico-Torres et al., 2018; Wang et al., 2013); el genotipo #3 (tipo II-like), ha sido reportado ampliamente en EUA y Europa en animales domésticos y silvestres (Shwab et al., 2014); los genotipos #164 y #182 se han aislado a partir una gallina y una paloma en Brasil, respectivamente; y el genotipo #10 (clásico tipo I) se ha aislado frecuentemente en EUA y China (Barros et al., 2014; Schwab et al., 2014; Soares et al., 2011; Wang et al., 2013). En el caso de los perros de Chiapas, el genotipo #142 encontrado en la sangre del perro 3, también fue encontrado en una gallina de Brasil y en un caso de toxoplasmosis congénita de México (Rico-Torres et al., 2018; Schwab et al., 2014; ToxoDB.org); el genotipo #10 (clásico tipo I), al igual que en los gatos de Quintana Roo, también fue encontrado en Chiapas; este es el segundo reporte de este genotipo considerado altamente virulento en ratones y que ocasionó un caso clínico en un recién nacido de México (Rico-Torres et al., 2018). De los aislamientos obtenidos mediante bioensayo en ratón, el genotipo ToxoDB #28 ha sido reportado previamente en Norte y Sudamérica (EUA, Colombia y Brasil) así como en un gato de Colima, México, sugiriendo que este genotipo está presente en regiones tropicales del continente (Rico-Torres et al., 2015; Schwab et al., 2014). El genotipo ToxoDB #8 (tipo BrIII) es un genotipo recombinante ampliamente distribuido en Brasil y supuestamente avirulento en ratones de laboratorio, pero con virulencia variable en otros huéspedes (Chiebao et al., 2016; do Nascimento et al., 2017; Pena et al., 2008; Silva et al., 2014). Este es el primer reporte del genotipo ToxoDB #8 en México y el tercer país en el que es aislado, después de Brasil y Venezuela (Shwab et al., 2014). Los genotipos aquí descritos son diferentes a los reportados en Durango

(perros, gatos, una paloma y un puma), y en el centro de México (gallinas y un recién nacido), ya que, en los aislamientos del norte del país predominan los alelos tipo II, lo cual correlaciona con los genotipos prevalentes de EUA y Canadá; el genotipo clásico III no ha sido descrito en ninguna otra parte de la República Mexicana (Alvarado-Esquivel et al., 2011; Dubey et al., 2013, 2009, 2004b; Rico-Torres et al., 2018).

Uno de los factores más relevantes para la generación de diversidad genética de *Toxoplasma gondii* es la densidad poblacional de felinos en un área determinada. Los gatos ferales son considerados una especie invasora y no tienen depredadores naturales; en consecuencia, pueden incrementar su densidad de población en un ecosistema (Gilot-Fromont et al., 2012). En el sureste mexicano, el gato doméstico coexiste con seis especies de felinos silvestres que naturalmente se distribuyen en México: tigrillo, ocelote, jaguarundi, lince rojo, puma y jaguar (CONABIO 2017). Si en una región determinada hay una densidad de población alta de felinos, entonces la dispersión de ooquistes y por lo tanto, la infección de huéspedes intermediarios (roedores, aves y pequeños mamíferos) es mayor, con probabilidad alta de alojar cepas diferentes en sus tejidos y mayor probabilidad de eventos de generación de SNPs por mutación durante la replicación asexual en cualquier huésped y por recombinación genética en el intestino de los felinos (Gilot-Fromont et al., 2012; Wendte et al., 2011). Herrmann et al. (2012) identificaron hasta 13 genotipos recombinantes diferentes y con virulencia variable, a partir de una muestra de heces de un gato que se infectó naturalmente con dos cepas diferentes, lo que confirma el potencial de recombinación natural del parásito en el intestino del gato en zonas hiperendémicas.

La mayoría de los animales capturados en Playa del Carmen albergaban genotipos diferentes, excepto los gatos 6 y 9 que compartían dos genotipos en común. Los resultados de Tuxtla Gutiérrez son parecidos a los publicados por Rajendran et al. (2012), quienes encontraron en gallinas de Centro y Sudamérica gran diversidad genética del parásito, con presencia de alelos tipo I y III. En Quintana Roo y Chiapas solo encontramos dos genotipos clásicos (ToxoDB #3 y

#10), el resto fueron recombinantes y atípicos; este resultado contrasta con lo reportado en E.U.A y Canadá, donde Jiang et al. (2018) encontraron una gran diversidad de genotipos en animales con libre desplazamiento (incluyendo a los animales ferales), pero con una predominancia de genotipos clásicos (64%). A diferencia de ellos, en el presente trabajo no se encontraron los genotipos del haplogrupo 12 (ToxoDB #4 y #5), que están ampliamente diseminados en gatos ferales y fauna silvestre de Norteamérica; por lo que nuestros resultados en conjunto con lo publicado de centro y Sudamérica sugieren que esos genotipos están confinados en el norte del continente americano, en la zona neoártica (Jiang et al. 2018).

7.2.3 Genotipificación mediante microsatélites

La caracterización molecular de los microsatélites es una herramienta útil para la diferenciación genética de aislamientos de *T. gondii*, cuyo genotipo por PCR-RFLP es el mismo, haciéndolos adecuados para estudios epidemiológicos (Dardé et al., 2014). Los aislamientos obtenidos de los perros de Chiapas tipificados mediante microsatélites resultaron ser dos genotipos atípicos: el TgDogMxChp3 fue idéntico a la cepa p89 (cerdo; EUA) en los ocho marcadores de genotipo y a un aislamiento obtenido de un conejo de Rio Grande do Sul, Brasil, pero diferente en los marcadores de huella génica, confirmando que este aislamiento no es clona de las anteriores (do Nascimento et al., 2017; Su et al., 2012). El segundo aislamiento, el TgDogMxChp11 tiene un genotipo por microsatélites que no concuerda con ninguno de los previamente reportados, por lo que es un genotipo nuevo confinado a México (Su et al. 2012). Esta es la primera vez que se tipifican aislamientos de *T. gondii* de México mediante microsatélites.

7.2.4 Clonación y secuenciación

Las infecciones mixtas por *T. gondii* habían sido descritas mediante secuenciación al observar picos dobles en los electroferogramas y mediante PCR-RFLP, al evidenciar más de un patrón de restricción en una muestra clínica (Aspinall et al., 2003; Rico-Torres et al., 2018). Una desventaja de la PCR-RFLP es que sólo se

pueden demostrar infecciones triples máximo, al visualizar los patrones de restricción de los tres alelos de referencia para un marcador genético, tal y como sucedió con el gen *SAG3* amplificado de las muestras de los gatos 3 y 6 de Playa del Carmen. Mediante purificación y clonación de fragmentos amplificados por PCR se observó que el gato 6 tenía infección séptuple y el gato 3 triple; en las clonas aisladas había alelos idénticos a las cepas clásicas, pero también otras con SNPs únicos. Este es un resultado inédito, ya que hasta el momento no se habían demostrado más de tres genotipos diferentes de *T. gondii* en sangre (Aspinall et al., 2003); es tan sorprendente que incluso podría pensarse que el resultado es consecuencia de la contaminación de las muestras o errores de la polimerasa, pero para la realización de todos los ensayos de PCR se usó Taq polimerasa Gold de alta fidelidad, la cual tiene una tasa de error muy baja. Además, durante los ensayos de amplificación y clonación se utilizaron los controles necesarios para descartar la posibilidad de contaminación y solo se usó DNA de una de las cepas de referencia y la mayoría de las secuencias obtenidas tenían SNPs que las diferenciaban de los controles. Este grado de variabilidad genética a nivel de secuencias ya ha sido descrito en cerdos del estado de Yucatán, en los cuales a partir de muestras de sangre y músculo secuenciaron el gen *SAG2* Alt. y encontraron hasta 18 secuencias diferentes además de los alelos clásicos I y III (Cubas-Atienzar et al., 2018). En el caso de las secuencias obtenidas del gen *SAG3* a partir del perro #2 de Tuxtla Gutiérrez, la primera secuencia (TgDogMxChp2a) fue idéntica a la cepa de referencia GT1 (tipo I), mientras que la segunda (TgDogMxChp2b), con un patrón atípico por RFLP, es una recombinante intragénica, sugiriendo un cruce entre cepas tipo I y II; de igual manera la secuencia TgCatMxQR3b del gato 3 es una recombinante intragénica I×II. De hecho, Khan et al. (2005) y Sibley (2009) encontraron que la recombinación intracromosómica (“crossing-over”) es un evento raro en el ciclo de *T. gondii*. Bontell et al. (2009) hicieron secuenciación masiva de una cepa recombinante silvestre aislada a partir de una gallina de Uganda (TgCkUg2) y concluyeron que el aislamiento había heredado cromosomas completos de las cepas parentales II y III (seis y siete respectivamente) a través de segregación cromosómica; sin embargo,

encontraron regiones del genoma con fondo genético tipo III pero con SNPs de cepa tipo II y viceversa, sugiriendo eventos de recombinación intracromosomales; sin embargo, no menciona si estos eventos son intragénicos o solo intracromosómicos. Por lo tanto, los resultados de esta tesis sugieren que hay mayor cantidad de eventos de recombinación intragénica de lo que se pensaba y que son frecuentes en regiones hiperendémicas. Hasta donde se conoce, es la segunda vez que se describe un alelo atípico reportado para el marcador *SAG3* por PCR-RFLP; el primero fue descrito por Pena y colaboradores (2013) en el cual encontraron una inserción de 21 pb en la secuencia obtenida a partir de gallinas de Espíritu Santo en Brasil y que modificaba el patrón de restricción.

7.2.5 Bioinformática

Seis de las secuencias obtenidas para el gen *SAG3* se ubicaron en nodos únicos del cladograma generado, en ocasiones alejadas hasta por cuatro pasos mutacionales de las cepas clásicas, lo cual confirma la hipótesis de que hay cepas endémicas de *T. gondii* en México. Las otras seis secuencias tienen 100% de identidad con las de los nodos de genotipos clásicos I, II y III que provienen de aislamientos obtenidos en EUA y Europa (Francia, Portugal y Turquía), donde la diversidad genética del parásito es reducida. Esto puede deberse a la presencia de pocas especies de felinos silvestres en estas regiones (además del gato doméstico); por ejemplo, en EUA y Canadá solo se distribuyen el puma (*Puma concolor*) y el lince rojo (*Lynx rufus*) y en Europa sólo hay tres especies: el gato montés europeo (*Felis silvestris silvestris*), el lince boreal (*Lynx lynx*) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*), por lo que habría menos probabilidad de eventos de recombinación genética. En los nodos más pequeños se encuentran secuencias de aislamientos provenientes de regiones con clima tropical de Centro y Sudamérica, donde se distribuyen hasta nueve especies de felinos (incluyendo al gato doméstico) y hay mayor diversidad genética del parásito (Galal et al., 2019). Jiang et al. (2018) analizaron las frecuencias de genotipos aislados en EUA a partir de animales domésticos y silvestres, y llegaron a la conclusión de que en los ciclos domésticos/urbanos los genotipos nuevos se presentan raramente, mientras

que en animales silvestres hay una mayor diversidad (hasta 10 veces más) con mayor frecuencia de cepas nuevas y atípicas. En el caso de Playa del Carmen, donde se encontró mayor diversidad, los gatos vivían en un ambiente selvático y participaban en un ciclo de vida silvestre del parásito, mientras que los perros de Tuxtla Gutiérrez participaban en un ciclo urbano/peridoméstico, en el cual los genotipos circulantes se reducen debido a la baja diversidad biológica de los huéspedes (Galal et al., 2019; Jiang et al., 2018).

La secuencia de *GRA6* obtenida del gato TgCatMxQR11b es idéntica a la cepa VAND (344 pb) aislada de una persona inmunocompetente en Guyana Francesa. Esta cepa atípica (haplogrupo 10) es altamente virulenta en ratón y en humanos pues causó toxoplasmosis aguda diseminada en el hospedero original; esta cepa posee polimorfismos únicos que le permiten evadir la acción de las IRGs de ratones silvestres, naturalmente resistentes a la infección por cepas virulentas clásicas (Bossi et al., 1998; Jensen et al., 2015; Murillo-León et al., 2019). Este hallazgo sugiere que las cepas atípicas y virulentas se recombinan en ambientes tropicales en todo el continente americano. El análisis de genealogía para el gen *GRA6* sugieren que las cepas mexicanas tienen una estrecha relación con cepas virulentas descritas principalmente en Sudamérica (VAND) o tienen alelos idénticos a las cepas tipo I (virulentas).

7.2.6 Histopatología

Por técnicas anatomopatológicas convencionales no se identificaron lesiones asociadas a infección aguda o crónica por *T. gondii* en ninguno de los animales muestreados, por lo que se decidió realizar la inmunohistoquímica (IHQ) para detectar quistes tisulares del parásito. Se encontraron estructuras inmunopositivas en hígado y bazo de los gatos 1 y 5, animales de los cuales se obtuvieron aislamientos. Otros autores han encontrado resultados semejantes, en los que no pudieron evidenciar al parásito mediante histopatología convencional y emplearon la inmunohistoquímica para detectar los quistes tisulares en los tejidos (da Silva and Langoni, 2001; Rosa et al., 2001; Silva et al., 2013). Estos hallazgos pueden estar relacionados con las diferentes etapas de infección en el animal, su estado

físico e inmunológico al momento de la eutanasia o incluso la edad, ya que con el tiempo los quistes tisulares pueden degenerarse (Silva et al., 2013). Por el contrario, si la infección es de corta duración, los quistes no han alcanzado el tamaño esperado, toda vez que los bradizoítos no se han replicado lo suficiente para alcanzar la dimensión de aquellos presentes en infecciones de larga duración. Estos resultados corroboran que los gatos se habían infectado recientemente y que las cepas que infectaron tanto a gatos como perros no son virulentas para estas especies, ya que, posterior a la captura no presentaron signos clínicos de enfermedad ni lesiones macroscópicas durante la necropsia. Esto no descarta la posibilidad de que estos genotipos no puedan ser virulentos para otras especies de la región, incluido el ser humano y primates como el mono saraguato y el mono araña.

En este proyecto de investigación se encontraron resultados inéditos que contradicen algunos “dogmas” de la toxoplasmosis, tales como que el parásito no puede ser detectado frecuentemente en sangre de animales y personas en regiones hiperendémicas; que un huésped no puede estar infectado por más de tres cepas al mismo tiempo en sangre (hasta infecciones séptuples); y que la genotipificación a partir de muestras clínicas no son útiles para proveer información para los estudios de diversidad genética en comparación con estudios con aislamientos. La gran diversidad de cepas de la región del sureste mexicano contrasta con lo reportado hasta el momento en el centro y norte del país, que se parece a lo descrito en E.U.A y Canadá, mientras que el sureste se parece más a la estructura poblacional de *T. gondii* en Brasil, con genotipos hasta ahora exclusivos de México (**Figura 28**).

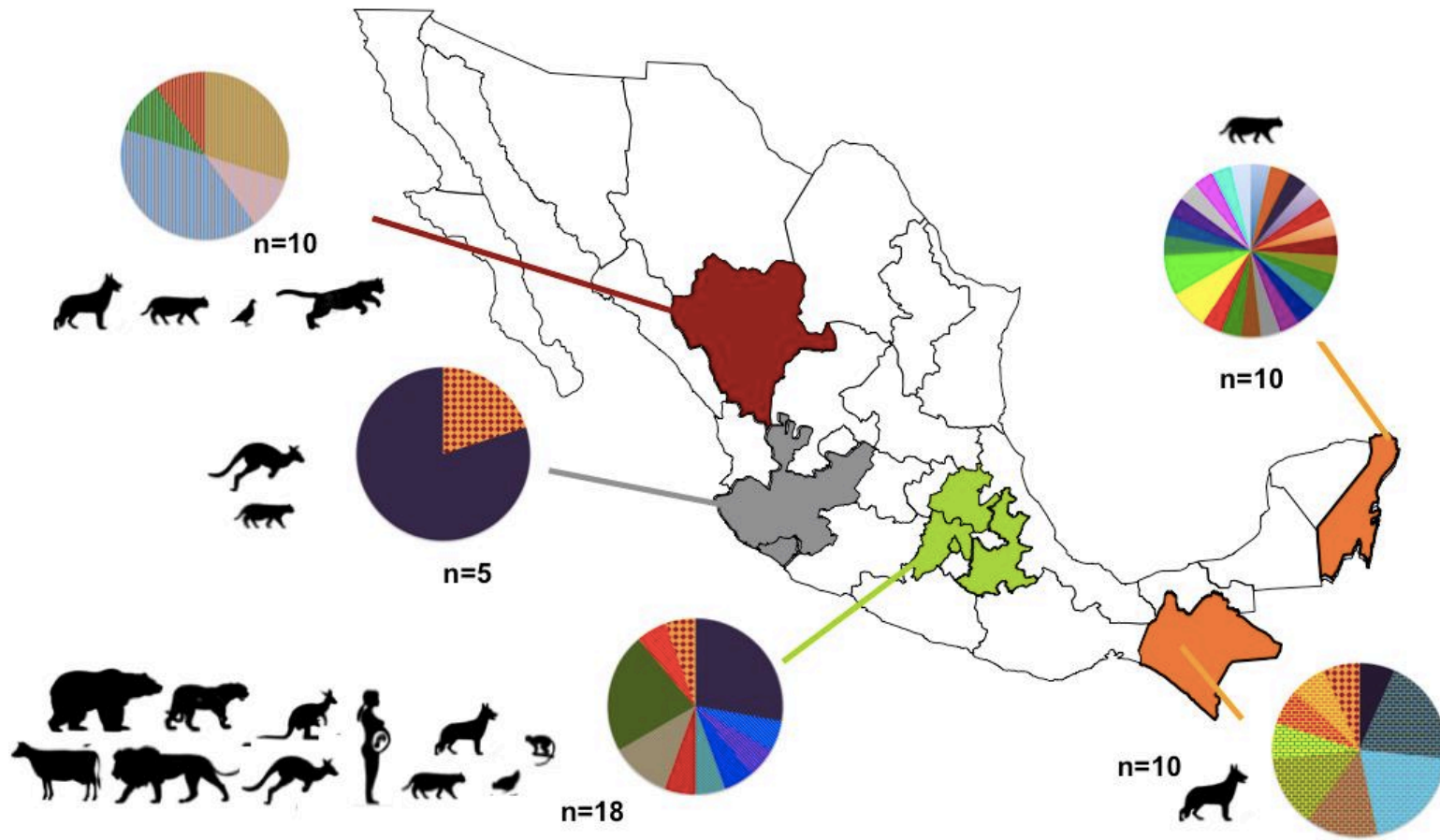


Figura 28. Distribución geográfica de los genotipos de *Toxoplasma gondii* en México. El tamaño de los segmentos de los gráficos circulares correlaciona con el número total de genotipos descritos en México. Los colores denotan genotipos diferentes.

8. Conclusiones

- Existe una fuerte presión infectiva del parásito en perros y gatos del sureste de México.
- En las dos regiones estudiadas se encontró una frecuencia alta de infecciones múltiples, dobles, triples y hasta séptuples
- Hay una gran diversidad genética de *Toxoplasma gondii* y cepas endémicas en la región.
- No hubo asociación entre el genotipo del parásito y las lesiones en los tejidos de los gatos y perros a partir de los cuales se lograron los aislamientos.

9. Productos del doctorado

9.1. Publicaciones derivadas del proyecto de investigación

1. **Valenzuela-Moreno L.F.**, Rico-Torres C.P., Cedillo-Peláez C., Luna-Pastén H., Méndez-Cruz S.T., Lara-Martínez G., Correa D., Caballero-Ortega H., 2019. Mixed *Toxoplasma gondii* infection and new genotypes in feral cats of Quintana Roo, México. Acta Trop. 193, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.006> (Disponible al final de la tesis).
2. **Valenzuela-Moreno L.F.**, Rico-Torres C., Cedillo-Peláez C., Luna-Pastén H., Méndez-Cruz S.T., Reyes-García M.E., Correa D., Alves B.F., Pena H.F.J., Caballero-Ortega H. Stray dogs in the tropical state of Chiapas, México harbour atypical and novel genotypes of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. **Artículo aceptado y en prensa.** (Disponible al final de la tesis).

9.2. Publicaciones como colaborador

1. Rico-Torres, C.P., **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Luna-Pastén, H., Figueroa-Damián, R., Gómez-Toscano, V., Hernández-Delgado, L., Escobedo-Torres, M.P., Correa, D., 2018. High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the megametropolis of Central Mexico. *Acta Trop.* 178, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.008> (Disponible al final de la tesis).

9.3. Publicaciones en bases de datos internacionales de DNA

1. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Martínez-Lara, G., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2018). *Toxoplasma gondii* isolate TgCatMxQR11b dense granule protein 6 (*GRA6*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MH196517.1).
2. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Lara-Martinez, G., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2018). *Toxoplasma gondii* isolate TgCatMxQR3b surface antigen gene 3 (*SAG3*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MN562751.1; no abierto al público aún).
3. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Lara-Martinez, G., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2018). *Toxoplasma gondii* isolate TgCatMxQR6d surface antigen gene 3 (*SAG3*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MN562752.1; no abierto al público aún).

4. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Lara-Martinez, G., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2018). *Toxoplasma gondii* isolate TgCatMxQR6g surface antigen gene 3 (*SAG3*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MN562753.1; no abierto al público aún).
5. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Lara-Martinez, G., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2018). *Toxoplasma gondii* isolate TgCatMxQR6e surface antigen gene 3 (*SAG3*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MN562754.1; no abierto al público aún).
6. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Lara-Martinez, G., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2018). *Toxoplasma gondii* isolate TgCatMxQR6f surface antigen gene 3 (*SAG3*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MN562755.1; no abierto al público aún).
7. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Reyes-García, M.E., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2019). *Toxoplasma gondii* isolate TgDogMxChp2a surface antigen gene 3 (*SAG3*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MK127861.1; no abierto al público aún).
8. **Valenzuela-Moreno, L.F.**, Rico-Torres, C.P., Cedillo-Pelaez, C., Luna-Pasten, H., Mendez-Cruz, S.T., Reyes-García, M.E., Correa, D., Caballero-Ortega, H. (2019). *Toxoplasma gondii* isolate TgDogMxChp2b surface antigen gene 3 (*SAG3*) gene, partial cds. (Genbank Acession Number MK127862.1; no abierto al público aún).

10. Referencias

- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Tibayrenc, M., Dardé, M.L., 2002a. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32, 18–28.
- Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., Dardé, M.-L., 2002b. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 186, 684–689.
- Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.L., 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4641–4645.
- Aliberti, J., 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 162–170.
- Alvarado-Esquivel, C., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Choudhary, S., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Villena, I., Dubey, J.P., 2011. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *J. Parasitol.* 97, 809–12.
- Alvarado-Esquivel, C., Sánchez-Okrucký, R., Dubey, J.P., 2012. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. *Vet. Parasitol.* 184, 321–4.
- Aspinall, T. V, Guy, E.C., Roberts, K.E., Joynson, D.H.M., Hyde, J.E., Sims, P.F.G., 2003. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int. J. Parasitol.* 33, 97–103.
- Barros, L.D. de, Taroda, A., Zulpo, D.L., Cunha, I.A.L. da, Sammi, A.S., Cardim, S.T., Miura, A.C., Su, C., Machado, R.Z., Vidotto, O., Garcia, J.L., 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 23, 443–8.
- Behnke, M.S., Khan, A., Lauron, E.J., Jimah, J.R., Wang, Q., Tolia, N.H., Sibley, L.D., 2015. Rhoptry proteins *ROP5* and *ROP18* are major murine virulence

- factors in genetically divergent south american strains of *Toxoplasma gondii*. PLoS Genet. 11, 1–22.
- Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., Mercier, A., Devillard, S., Ajzenberg, D., 2017. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. Infect. Genet. Evol. 48, 150–155.
- Besn -Mérida, A., 2010. Caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) de distintas regiones de México (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 607–623.
- Blader, I.J., Coleman, B.I., Chen, C.-T., Gubbels, M.-J., 2015. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. Annu. Rev. Microbiol. 69, 150902154308007.
- Bliss, S.K., Butcher, B.A., Denkers, E.Y., 2000. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. J. Immunol. 165, 4515–21.
- Bliss, S.K., Zhang, Y., Denkers, E.Y., 1999. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. J. Immunol. 163, 2081–8.
- Bossi, P., Caumes, E., Paris, L., Dard , M.L., Bricaire, F., 1998. *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. J. Clin. Microbiol. 36, 3724–5.
- Boughattas, S., Ben-Abdallah, R., Siala, E., Souissi, O., Aoun, K., Bouratbine, A., 2010. Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 1041–6.
- Bowman, D.D., 2008. Georgis' Parasitology for Veterinarians, 9e. Saunders.
- Brenier-Pinchart, M.-P., Capderou, E., Bertini, R.-L., Bailly, S., Fricker-Hidalgo, H., Varlet-Marie, E., Murat, J.-B., Sterkers, Y., Touafek, F., Bastien, P., Pelloux, H., 2015. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the

- detection of circulating *Toxoplasma gondii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 82, 289–291.
- Caballero-Ortega, H., Palma, J.M., García-Márquez, L.J., Gildo-Cárdenas, A., Correa, D., 2008. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology* 135, 1385–9.
- Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F.J., Conde-Glez, C.J., Cedillo-Pelaez, C., Vargas-Villavicencio, J.A., Luna-Pastén, H., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L.B., Correa, D., 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 653–9.
- Calero-Bernal, R., Gennari, S.M., 2019. Clinical Toxoplasmosis in Dogs and Cats: An Update. *Front. Vet. Sci.* 6.
- Calero-Bernal, R., Saugar, J.M., Frontera, E., Pérez-martín, J.E., Habela, A., Serrano, F.J., Reina, D., Fuentes, I., 2015. Prevalence and Genotype Identification of *Toxoplasma gondii* in Wild Animals from Southwestern Spain. *J. Wildl. Dis.* 51, 233–238.
- Cañedo-Solares, I., Galván-Ramírez, M.D.L.L., Luna-Pastén, H., Rodríguez Pérez, L.R., Ortiz-Alegría, L.B., Rico-Torres, C.P., Vela-Amieva, M., Pérez-Andrade, M., Figueroa-Damián, R., Correa, D., 2008. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr. Infect. Dis. J.*
- Cañón-Franco, W. a, Araújo, F. a P., López-Orozco, N., Jardim, M.M. a, Keid, L.B., Dalla-Rosa, C., Cabral, a D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., 2013. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: Molecular detection and genotypic characterization. *Vet. Parasitol.*
- Carruthers, V., Boothroyd, J.C., 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 83–89.
- Castillo-Morales, V.J., Acosta Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E.D.S., Jiménez-Coello, M., Segura-Correa, J.C., Aguilar-Caballero, a J., Ortega-Pacheco, A., 2012. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from the tropics of Mexico using serological and molecular tests. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012, 529108.

- Cedillo-Peláez, C., 2015. Diversidad genética de *Toxoplasma gondii* en animales domésticos y fauna silvestre de México (Tesis de Doctorado en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cedillo-Peláez, C., 2009. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cedillo-Peláez, C., Rico-Torres, C.P., Salas-Garrido, C.G., Correa, D., 2011. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Vet. Parasitol.* 180, 368–71.
- Cerávolo, I.P., Chaves, A.C.L., Bonjardim, C.A., Sibley, D., Romanha, A.J., Gazzinelli, R.T., 1999. Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway. *Infect. Immun.* 67, 2233–40.
- Chávez-Crisóstomo, D.O., 2010. Aislamiento de *Toxoplasma gondii* de tejido cerebral de un becerro infectado (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chiebao, D.P., Pena, H.F.D.J., Cabral, A.D., Rocca, M.P., Lopes, E.G., Valadas, S.Y.O.B., Keid, L.B., Grisi Filho, J.H.H., Soares, R.M., 2016. Infection of mice with oocysts of *Toxoplasma gondii* by oral route showed differences of virulence from Brazilian RFLP genotypes BrI and BrIII. *Res. Vet. Sci.* 107, 257–260.
- Contreras-Ochoa, C.O., Lagunas-Martínez, A., Belkind-Gerson, J., Díaz-Chávez, J., Correa, D., 2013. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp. Parasitol.* 134, 256–265.
- Correa, D., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L.B., Caballero-Ortega, H., Rico-Torres, C.P., 2007. Congenital and acquired toxoplasmosis: Diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 29, 651–660.
- Cubas-Atienzar, A.I., Hide, G., Jiménez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A., Smith,

- J.E., 2018. Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 14, 191–199.
- Cunha, M., Carneiro, A.C., Costa, J.L., Vitor, R., 2015. Genotyping of *Toxoplasma gondii* directly from human and animal biological samples: from partial genotypes to a new genotype. *J. Parasitol.* 102, 157–160.
- da Silva, a V, Langoni, H., 2001. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.* 97, 191–8.
- Dardé, M.-L., Ajzenberg, D., Su, C., 2014. Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*, in: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma gondii*. Elsevier, Amsterdam, pp. 61–97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00003-9>
- Dardé, M.L., 1996. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219, 27–41. https://doi.org/10.1007/978-3-642-51014-4_3
- Dardé, M.L., Ajzenberg, D., Smith, J., 2007. Population structure and epidemiology of *Toxoplasma gondii*, in: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Academic Press, Amsterdam, pp. 49–80.
- Darde, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1988. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 551–558.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78, 786–794.
- Denkers, E.Y., Yap, G., Scharon-Kersten, T., Charest, H., Butcher, B.A., Caspar, P., Heiny, S., Sher, A., 1997. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 159, 1903–8.
- do Nascimento, L.C., Pena, H.F.J., Leite Filho, R.V., Argenta, F.F., Alves, B.F., Oliveira, S., Gennari, S.M., Driemeier, D., 2017. Rare case of acute toxoplasmosis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Brazil associated with the type BrIII Brazilian clonal lineage of *Toxoplasma gondii*.

- Parasitol. Res. 116, 2873–2876.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, Second Edition, Second edition. ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dubey, J.P., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1019–1024.
- Dubey, J.P., Alvarado-Esquivel, C., Herrera-Valenzuela, V.H., Ortiz-Diaz, J.J., Oliveira, S., Verma, S.K., Choudhary, S., Kwok, O.C.H., Su, C., 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. *Vet. Parasitol.* 197, 674–677.
- Dubey, J.P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G. V, Bandini, L. a, Kwok, O.C.H., Hill, R., Su, C., 2007. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology* 134, 1559–65.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., 1993. Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 1546–1549.
- Dubey, J.P., Graham, D.H., De Young, R.W., Dahl, E., Eberhard, M.L., Nace, E.K., Won, K., Bishop, H., Punkosdy, G., Sreekumar, C., Vianna, M.C.B., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Sumners, J.A., Demarais, S., Humphreys, J.G., Lehmann, T., 2004a. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J. Parasitol.* 90, 67–71.
- Dubey, J.P., Morales, E.S., Lehmann, T., 2004b. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J. Parasitol.* 90, 411–3.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G. V, Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., González-Herrera, a, Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Su, C., 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *J. Parasitol.* 95, 319–22.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G. V, Chockalingam, A., Pena, H.F.J., de Oliveira, L.N., Leifer, C.A., Gennari, S.M., Bahia Oliveira, L.M.G., Su, C., 2008. Genetic

- diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet. Parasitol.* 157, 299–305.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G. V, Rajendran, C., Yabsley, M.J., Thomas, N.J., Beckmen, K.B., Sinnott, D., Ruid, D., Hart, J., Fair, P. a, McFee, W.E., Shearn-Bochsler, V., Kwok, O.C.H., Ferreira, L.R., Choudhary, S., Faria, E.B., Zhou, H., Felix, T. a, Su, C., 2011. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int. J. Parasitol.* 41, 1139–47.
- Dupont, C.D., Christian, D.A., Hunter, C.A., 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.*
- Dzib-Paredes, G.F., Rosado-Aguilar, J.A., Acosta-Viana, K.Y., Ortega-Pacheco, A., Hernández-Cortázar, I.B., Guzman-Marín, E., Jiménez-Coello, M., 2016. Seroprevalence and parasite load of *Toxoplasma gondii* in Mexican hairless pig (*Sus scrofa*) tissues from the Southeast of Mexico. *Vet. Parasitol.* 229, 45–49.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3, 0200–0211.
- Galal, L., Hamidović, A., Dardé, M.L., Mercier, M., 2019. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food Waterborne Parasitol.* 15, e00052.
- Gardiner, C.H. et al, 1988. *An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues.* United States Department of Agriculture.
- Gazzinelli, R.T., Mendoça-Neto, R., Lilue, J., Howard, J., Sher, A., 2014. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: An evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host Microbe.* <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>
- Gilot-Fromont, E., Dardé, M.L.M.-L., Richomme, C., Aubert, D., Afonso, E., Mercier, A., Gotteland, C., Villena, I., 2012. The life cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment, in: Djurković-Djaković, O. (Ed.), *Toxoplasmosis - Recent Advances.* InTech, pp. 3–36.
- Greene, C.E., 2011. *Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4e.* Saunders.

- Grigg, M.E., Sundar, N., 2009. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int. J. Parasitol.* 39, 925–933.
- Harker, K.S., Ueno, N., Lodoen, M.B., 2015. *Toxoplasma gondii* dissemination : a parasite ' s journey through the infected host. *Parasite Immunol.* 37, 141–149.
- Hartmann, K., 2011. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143, 190–201.
- Hernández-Cortazar, I.B., Acosta-Viana, K.Y., Guzmán-Marin, E., Ortega-Pacheco, A., Torres-Acosta, J.F. de J., Jimenez-Coello, M., 2016. Presence of *Toxoplasma gondii* in Pork Intended for Human Consumption in Tropical Southern Mexico. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 695–699.
- Herrmann, D.C., Bärwald, A., Maksimov, A., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Conraths, F.J., Schares, G., 2012. *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: Generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Vet. Res.* 43, 1–10.
- Howard, J.C., Hunn, J.P., Steinfeldt, T., 2011. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 414–421.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D.S., Murray, J.M., 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2, e13.
- Ivović, V., Vujanić, M., Živković, T., Klun, I., Djurković-djaković, O., 2007. Molecular detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* from clinical samples. *Toxoplasmosis-Recent Adv.* 103–120.
- Jenkins, M.C., 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 101, 291–310.
- Jensen, K.D., Camejo, A., Melo, M., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G., Frickel, E., Ploegh, H., Young, L., Saeij, J.P.J., 2015. *Toxoplasma gondii*

- superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact *ROP5/ROP18* allelic combination. *MBio* 6, 1–15.
- Jiang, T., Shwab, E.K., Martin, R.M., Gerhold, R.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Su, C., 2018. A partition of *Toxoplasma gondii* genotypes across spatial gradients and among host species, and decreased parasite diversity towards areas of human settlement in North America. *Int. J. Parasitol.* 48, 611–619.
- Kafsack, B.F.C., Pena, J.D.O., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J.C., Carruthers, V.B., 2009. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* 323, 530–3.
- Khan, A., Dubey, J.P., Su, C., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2011a. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.* 41, 645–55.
- Khan, A., Fux, B., Su, C., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104.
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L. V, Belfort, R., Vitor, R.W.A., Silveira, C., Sibley, L.D., 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 942–949.
- Khan, A., Miller, N., Roos, D., Dubey, J., 2011b. A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. *MBio*.
- Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A.J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tang, K., Paulsen, I.T., Berriman, M., Boothroyd, J.C., Pfefferkorn, E.R., Dubey, J.P., Ajioka, J.W., Roos, D.S., Wootton, J.C., Sibley, L.D., 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 33, 2980–2992.
- Kim, K., Weiss, L.M., 2009. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes Infect.* 10, 978–984.
- Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., Ghosh, S., 2013. Recognition of profilin by toll-like

- receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119–130.
- Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suárez-Mutis, M., Fernandes, O., Britto, C., 2007. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive *B1* gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol. Res.* 101, 619–25.
- Konradt, C., Ueno, N., Christian, D.A., Delong, J.H., Pritchard, G.H., Herz, J., Bzik, D.J., Koshy, A.A., McGavern, D.B., Lodoen, M.B., Hunter, C.A., 2016. Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nat. Microbiol.* 1, 16001.
- Lau, Y.L., Lee, W.C., Gudimella, R., Zhang, G.P., Ching, X.T., Razali, R., Aziz, F., Anwar, A., Fong, M.Y., 2016. Deciphering the draft genome of *Toxoplasma gondii* RH strain. *PLoS One* 11, 1–15.
- Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J.L., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect. Genet. Evol.* 3, 135–141.
- Levine, N.D., 1988. Protozoan Phylum Apicomplexa. CRC Press.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981–1983.
- Lindström, I., Sundar, N., Lindh, J., Kironde, F., Kabasa, J.D., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P., Smith, J.E., 2008. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology* 135, 39–45.
- Liu, Q., Wang, Z.D., Huang, S.Y., Zhu, X.Q., 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites and Vectors*.
- Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M.S., Namasivayam, S., Swapna, L.S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B.P., Ajioka, J.W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J.C., Boyle, J.P., Dardé, M.L., Diaz-Miranda, M. a., Dubey, J.P., Fritz, H.M., Gennari, S.M., Gregory, B.D., Kim, K., Saeij, J.P.J., Su, C., White, M.W., Zhu, X.-Q., Howe, D.K., Rosenthal, B.M., Grigg, M.E., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J.C., Roos, D.S., David Sibley, L., 2016. Local admixture of

- amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. Nat. Commun. 7, 10147.
- Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A.-L., Durand, P., Salle, B., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e876.
- Miller, D.S., Faulkner, C., Patton, S., 2003. Detection of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in juvenile great grey kangaroos, *Macropus giganteus giganteus*. J. Zoo Wildl. Med. 34, 189–193.
- Minot, S., Melo, M.M.B., Li, F., Lu, D., Niedelman, W., Levine, S.S., Saeij, J.P.J., 2012. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 13458–63.
- Mitsunaga, T., Norose, K., Aosai, F., Horie, H., Ohnuma, N., Yano, A., 2019. Infection dynamics of *Toxoplasma gondii* in gut-associated tissues after oral infection: The role of Peyer's patches. Parasitol. Int. 68, 40–47.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. Lancet 363, 1965–76.
- Mordue, D.G., Sibley, L.D., 2003. A novel population of Gr-1 + -activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. J. Leukoc. Biol. 74, 1015–1025.
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. J. Leukoc. Biol. 73, 209–212.
- Moudy, R., Manning, T.J., Beckers, C.J., 2001. The Loss of Cytoplasmic Potassium upon Host Cell Breakdown Triggers Egress of *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 276, 41492–41501.
- Murillo-León, M., Müller, U.B., Zimmermann, I., Singh, S., Widdershooven, P., Campos, C., Alvarez, C., Könen-Waisman, S., Lukes, N., Ruzsics, Z., Howard, J.C., Schwemmler, M., Steinfieldt, T., 2019. Molecular mechanism for the control of virulent *Toxoplasma gondii* infections in wild-derived mice. Nat. Commun. 10.
- Nagamune, K., Hicks, L.M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E.N., Sibley, L.D., 2008. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in

- Toxoplasma gondii*. Nature 451, 207–10.
- National Research Council (US) Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, 1991. Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards, 1st Ed. ed. National Academies Press, Washington, D.C. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234944/> doi: 10.17226/1351
- Nicolle, C., Manceaux, L., 1909. Sur une infection á corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. Comptes rendus l'Académie des Sci. 369–372.
- Nishi, M., Hu, K., Murray, J.M., Roos, D.S., 2008. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 121, 1559–1568.
- Opsteegh, M., Spano, F., Aubert, D., Balea, A., Burrells, A., Cherchi, S., Cornelissen, J.B.W.J., Dam-Deisz, C., Guitian, J., Györke, A., Innes, E.A., Katzer, F., Limon, G., Possenti, A., Pozio, E., Schares, G., Villena, I., Wisselink, H.J., van der Giessen, J.W.B., 2019. The relationship between the presence of antibodies and direct detection of *Toxoplasma gondii* in slaughtered calves and cattle in four European countries. Int. J. Parasitol. 49, 515–522.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E., Segura-Correa, J.C., Álvarez-Fleites, M., Jiménez-Coello, M., 2013. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico. Biomed Res. Int. 2013, 231497.
- Ortega-Pacheco, A., Guzmán-Marín, E., Acosta-Viana, K.Y., Vado-Solís, I., Jiménez-Delgadillo, B., Cárdenas-Marrufo, M., Pérez-Osorio, C., Puerto-Solís, M., Jiménez-Coello, M., 2017. Serological survey of *Leptospira interrogans*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in free roaming domestic dogs and cats from a marginated rural area of Yucatan Mexico. Vet. Med. Sci. 3, 40–47.
- Ortiz-Alegría, L.B., Caballero-Ortega, H., Cañedo-Solares, I., Rico-Torres, C.P., Sahagún-Ruiz, A., Medina-Escutia, M.E., Correa, D., 2010. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. Genes Immun. 11, 363–373.
- Pacheco-Coronel, N., 2010. Estudio piloto de la frecuencia de parásitos en mamíferos ferales y silvestres en la reserva ecológica del pedregal de San

- Ángel de la UNAM (Tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pan, S., Thompson, R.C.A., Grigg, M.E., Sundar, N., Smith, A., Lymbery, A.J., 2012. Western Australian marsupials are multiply infected with genetically diverse strains of *Toxoplasma gondii*. PLoS One 7, e45147.
- Pena, H F J, Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int. J. Parasitol. 38, 561–569.
- Pena, H.F.J., Vitaliano, S.N., Beltrame, M. a V, Pereira, F.E.L., Gennari, S.M., Soares, R.M., 2013. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: new genotypes and a new *SAG3* marker allele. Vet. Parasitol. 192, 111–7.
- Persson, E.K., Agnarson, A.M., Lambert, H., Hitziger, N., Yagita, H., Chambers, B.J., Barragan, A., Grandien, A., 2007. Death receptor ligation or exposure to perforin trigger rapid egress of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. (Baltimore, Md 1950) 179, 8357–8365.
- Prophet, E.B., 1995. AFIP Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología, Washington DC.
- Rajendran, C., Su, C., Dubey, J.P., 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. Infect. Genet. Evol. 12, 359–68.
- Ramos-Vara, J. a, 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet. Pathol. 42, 405–26. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Reese, M.L., Boothroyd, J.C., 2011. A conserved non-canonical motif in the pseudoactive site of the *ROP5* pseudokinase domain mediates its effect on *Toxoplasma* virulence. J. Biol. Chem. 286, 29366–29375.
- Reichmann, G., Walker, W., Villegas, E.N., Craig, L., Cai, G., Alexander, J., Hunter, C.A., 2000. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. Infect. Immun. 68, 1312–1318.
- Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Könen-Waisman, S., Latham, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., Sanders, M., Shanmugam, D., Sohal, A., Wasmuth, J.D., Brunk, B., Grigg, M.E., Howard,

- J.C., Parkinson, J., Roos, D.S., Trees, A.J., Berriman, M., Pain, A., Wastling, J.M., 2012. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog.* 8.
- Rico-Torres, C.P., Del Viento-Camacho, A., Caballero-Ortega, H., Besné-Mérida, A., Luna-Pastén, H., Correa, D., Palma-García, J.M., 2015. First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: Tissue distribution and genetic characterization. *Vet. Parasitol.* 209, 125–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.004>
- Rico-Torres, C.P., Figueroa-Damián, R., López-Candiani, C., Macías-Avilés, H.A., Cedillo-Peláez, C., Cañedo-Solares, I., Luna-Pastén, H., Tecuatl-Herrada, B.L., Correa, D., 2012. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 411–3.
- Rico-Torres, C.P., Valenzuela-Moreno, L.F., Luna-Pastén, H., Figueroa-Damián, R., Gómez-Toscano, V., Hernández-Delgado, L., Escobedo-Torres, M.P., Correa, D., 2018. High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the mega-metropolis of Central Mexico. *Acta Trop.* 178, 124–129.
- Rico-Torres, C.P., Vargas-Villavicencio, J.A., Correa, D., 2016. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *Eur. J. Clin. Microb*<https://doi.org/10.1007/s10096-016-2656-2>
- Robert-Gangneux, F., Dupretz, P., Yvenou, C., Quinio, D., Poulain, P., Guiguen, C., Gangneux, J.P., 2010. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29, 33–38.
- Robert-Gangneux, Florence Dardé, M., 2012. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 264–296.
- Roiko, M.S., Svezhova, N., Carruthers, V.B., 2014. Acidification activates *Toxoplasma gondii* motility and egress by enhancing protein secretion and cytolytic activity. *PLoS Pathog.* 10.
- Rosa, C., Kasai, N., Souza, S., 2001. Comparação das técnicas de imuno-

- histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. Arq. Inst. Biol. São Paulo 68, 13–17.
- Rougier, S., Montoya, J.G., Peyron, F., 2017. Lifelong persistence of *Toxoplasma* cysts: a questionable dogma? Trends Parasitol. 33, 93–101.
- Ruffolo, B.B., Toledo, R. dos S., Martins, F.D.C., Bugni, F.M., Costa, L. da, Marana, E.R.M., Navarro, I.T., Garcia, J.L., Su, C., Freire, R.L., 2016. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative urban rats and presence of antibodies in communicating dogs in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 58.
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Boothroyd, J.C., 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. Trends Parasitol. 21, 476–481.
- Safronova, A., Araujo, A., Camanzo, E.T., Moon, T.J., Elliott, M.R., Beiting, D.P., Yarovinsky, F., 2019. Alarmin S100A11 initiates a chemokine response to the human pathogen *Toxoplasma gondii*. Nat. Immunol. 20, 64–72.
- Sánchez, V., De-la-Torre, A., Gómez-Marín, J.E., 2014. Characterization of ROP18 alleles in human toxoplasmosis. Parasitol. Int. 63, 463–469.
- Schuneman, M.A., Constantino, C.F., 2002. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2 Edición (Spanish Edition). Manual Moderno.
- Seeber, F., Feagin, J.E., Parsons, M., 2014. The apicoplast and mitochondrion of *Toxoplasma gondii*, in: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma gondii*. Elsevier, Amsterdam, pp. 297–350.
- Shwab, E.K., 2015. Genetic diversity, population structure, and evolution of virulence in *Toxoplasma gondii*. PhD diss., University of Tennessee. https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/3362
- Shwab, E.K., Jiang, T., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2016. The *ROP18* and *ROP5* gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 46, 141–146.
- Shwab, E.K., Saraf, P., Zhu, X.-Q., Zhou, D.-H., McFerrin, B.M., Ajzenberg, D.,

- Schares, G., Hammond-Aryee, K., van Helden, P., Higgins, S.A., Gerhold, R.W., Rosenthal, B.M., Zhao, X., Dubey, J.P., Su, C., 2018. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E6956–E6963.
- Shwab, E.K., Zhu, X.-Q., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461.
- Sibley, L.D., 2009. Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39, 915–924. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.011>
- Sibley, L.D., 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4, 581–586.
- Sibley, L.D., Ajioka, J.W., 2008. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 329–351.
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85.
- Silva, a F., Oliveira, F.C.R., Leite, J.S., Mello, M.F. V, Brandão, F.Z., Leite, R.I.J.C.K., Frazão-Teixeira, E., Lilenbaum, W., Fonseca, a B.M., Ferreira, a M.R., 2013. Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Vet. Parasitol.* 191, 347–52.
- Silva, L.A., Andrade, R.O., Carneiro, A.C.A. V, Vitor, R.W.A., 2014. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS One* 9, 3–9.
- Smith, T.G., Walliker, D., Ranford-Cartwright, L.C., 2002. Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa. *Trends Parasitol.* 18, 315–323.
- Soares, R.M., Silveira, L.H., da Silva, A.V., Ragozo, A., Galli, S., Lopes, E.G., Gennari, S.M., de Jesus Pena, H.F., 2011. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 178, 29–34.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q.,

- Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5844–9.
- Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1–11.
- Sukthana, Y., 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol.* 22, 137–142.
- Tanabe, K., Asai, T., Kimata, I., Takada, S., 1979. Penetration of maturing red blood cells by *Toxoplasma gondii*. *J. Gen. Microbiol.* 113, 433–437.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217–1258.
- Torres-Castro, M., Noh-Pech, H., Puerto-Hernández, R., Reyes-Hernández, B., Panti-May, A., Hernández-Betancourt, S., Yeh-Gorocica, A., González-Herrera, L., Zavala-Castro, J., Puerto, F., 2016. First molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatan, Mexico. *Open Vet. J.* 6, 57.
- Valenzuela-Moreno, L.F., 2014. Frecuencia y genotipificación de *Toxoplasma gondii* en carnívoros y herbívoros silvestres de una colección privada. (Tesis de Maestría). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vercammen, M., Scorza, T., El Bouhdidi, A., Van Beeck, K., Carlier, Y., Dubremetz, J.F., Verschueren, H., 1999. Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. *Parasite Immunol.* 21, 555–563.
- Verma, S.K., Sweeny, A.R., Lovallo, M.J., Calero-Bernal, R., Kwok, O.C., Jiang, T., Su, C., Grigg, M.E., Dubey, J.P., 2017. Seroprevalence, isolation and co-infection of multiple *Toxoplasma gondii* strains in individual bobcats (*Lynx rufus*) from Mississippi, USA. *Int. J. Parasitol.* 47, 297–303.

- Wang, L., Cheng, H.-W., Huang, K.-Q., Xu, Y.-H., Li, Y.-N., Du, J., Yu, L., Luo, Q.-L., Wei, W., Jiang, L., Shen, J.-L., 2013. *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity. *Parasit. Vectors* 6, 273.
- Weiss, L.M., Kim, K., 2013. *Toxoplasma gondii*, Second Edition: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods. Academic Press, Amsterdam.
- Wendte, J.M., Gibson, A.K., Grigg, M.E., 2011. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Vet. Parasitol.* 182, 96–111.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J., Bannenberg, G., Serhan, C., Hayden, M., Hieny, S., Sutterwala, F., Flavell, R., Ghosh, S., Sher, A., 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 308, 1626–1629.
- Zhu, W., Li, J., Pappoe, F., Shen, J., Yu, L., 2019. Strategies developed by *Toxoplasma gondii* to survive in the host. *Front. Microbiol.* 10.

Anexo 1: Histopatología

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

Anexo 2: Protocolo de inmunohistoquímica para detección de *Toxoplasma gondii*

- 1.- Desparafinar los tejidos en la termoplatina hasta que se formen gotas de parafina y retirar.
- 2.- Lavar dos veces con xilol durante 10 minutos cada uno. Sumergir las laminillas en vasos de precipitados de 50 mL con xilol asegurándose de que cubra por completo el tejido.
- 3.- Lavar las laminillas sumergiéndolas en alcohol absoluto, tres cambios de 3 minutos cada uno.
- 4.- Tratar con solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (JT Baker, Cat.: 218601) al 30% con metanol absoluto (relación 1:8) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Rehidratar con serie descendente de etanol, iniciando al 96% durante 3 minutos.
- 6.- Alcohol al 80% durante 3 minutos.
- 7.- Alcohol al 70% durante 3 minutos.
- 8.- Agua destilada durante 3 minutos.
- 9.- Incubar los tejidos con proteinasa K a 20 mg/mL durante 5 minutos a temperatura ambiente (cuanto baste para cubrir el tejido).
- 10.- Lavar con agua destilada durante 5 minutos (terminado este paso, poner el límite del tejido con el plumón especial; desechar esta agua destilada).
- 11.- Lavar con PBS-Tween20®, 0.05% durante 5 minutos (desechar al terminar).
- 12.- Aplicar solución bloqueadora de avidina y biotina endógenas (Invitrogen) 50 μ L de cada una sobre los tejidos y homogenizar circularmente sobre la laminilla e incubar en cámara húmeda a 37° C durante 15 minutos.
- 13.- Lavar las laminillas con PBS-Tween20®, 0.05% durante 5 minutos.
- 14.- Bloquear los sitios de adherencia inespecífica de los anticuerpos primario y secundario (Invitrogen) con 2 gotas hasta que cubra todo el tejido. Incubar en cámara húmeda durante 20 minutos.
- 15.- Decantar la solución bloqueadora sin hacer lavado.
- 16.- Agregar 100 μ L del anticuerpo primario (suero de cabra positiva), dilución

1:150 incubando en cámara húmeda a 37° C por 30 minutos.

- 17.- Lavar con PBS-Tween20®, 0.05% durante 5 minutos.
- 18.- Agregar 100 µL del anticuerpo secundario (conjugado anticabra), dilución 1:150 incubando en cámara húmeda a 37° C durante 30 minutos.
- 19.- Lavar con PBS-Tween20®, 0.05% durante 5 minutos.
- 20.- Agregar solución reveladora con pipeta goteando la cantidad suficiente para cubrir el tejido, laminilla por laminilla sobre una hoja blanca y observando al microscopio.
- 21.- Detener la reacción sumergiendo la laminilla en agua destilada durante 5 minutos.
- 22.- Contrastar con hematoxilina de Meyer durante 1 minuto.
- 23.- Lavar con agua destilada durante 1 minuto.
- 24.- Sumergir en carbonato de litio e hidróxido de amonio durante 1 minuto.
- 25.- Lavar en agua destilada.
- 26.- Secar por completo la laminilla y cada corte se agrega resina comercial y cubreobjetos convencional.

Anexo 3: ELISA indirecto para detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*

- 1.- Sensibilizar las placas de poliestireno (Maxisorp Nunc) con 100 μ L de extracto crudo (2 μ g/mL) elaborado con taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH.
- 2.- Incubar a 4° C durante toda la noche.
- 3.- Lavar 5 veces con PBS-Tween20®, 0.05%.
- 4.- Bloquear con 200 μ L de albúmina sérica bovina (Euro-Clone, Italy) al 1%, 30 minutos a 37° C.
- 5.- Repetir los lavados con PBS-Tween20®, 0.05%.
- 6.- Adicionar 100 μ L del suero (gato 1:200; perro 1:400) diluido en PBS-T20.
- 7.- Incubar durante 2 horas a 37° C.
- 8.- Repetir los lavados con PBS-Tween20®, 0.05%.
- 9.- Adicionar 100 μ L de conjugado específico (anti-IgG de gato y anti-IgG de perro, 1:15,000 y 1:2,500 respectivamente) diluidos en PBS-T20.
- 10.- Incubar durante 2 horas a 37° C.
- 11.- Repetir los lavados con PBS-Tween20®, 0.05%.
- 12.- Preparar la solución cromógeno-sustrato (10 mL de amortiguador de citratos más 5 mg de ortofenilendiamina y 4 μ L de H₂O₂).
- 13.- Detener la reacción con 50 μ L de ácido sulfúrico 0.1 N.
- 14.- Obtener la absorbancia a 490 nm de longitud de onda con un lector de ELISA (Turner Biosystems, Sunnyvale, California).

Anexo 4: Extracción de DNA genómico a partir de tejidos

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

Anexo 5: Biología molecular

PCR en tiempo real

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

PCR punto final

Las condiciones de la mezcla maestra para la PCR se ajustaron a un volumen final de 50 μL , empleando 5.0 μL de amortiguador de PCR (10x PCR Gold Buffer, Roche), 4.0 μL de cloruro de magnesio (MgCl_2 25 mM, Roche), 1.0 μL de PCR Nucleotide Mix (10 mM, Roche), 1.0 μL de cada oligonucleótido (20 μM), 1.0 μL de DMSO (Dimetil sulfóxido, 5%, SIGMA) y 0.3 μL de Taq polimerasa (5 u/ μL Ampli Taq Gold, Roche); se usaron de 500 a 750 ng de DNA. El resto del volumen se aforó con agua inyectable estéril. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Veriti, Applied Biosystems) con un paso inicial de desnaturalización de 95° C por 3 minutos y 38 ciclos con desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 58°-60°C por 60 segundos, dependiendo de los iniciadores usados (**Cuadro Anexo 1**) y extensión a 72° C por 60 segundos, concluyendo con una extensión final a 72° C por 10 minutos. Una vez terminados los ciclos, las muestras se mantuvieron a 4° C hasta su empleo. Para la PCR anidada se realizó una dilución 1:2 con el producto de PCR múltiplex y se usó 1 μL como molde para la reacción incluyendo controles positivos y negativos de reamplificación. Las condiciones de la PCR anidada fueron casi las mismas, sólo omitiendo el paso de elongación final.

PCR-RFLP

Todas las reacciones de restricción se realizaron con enzimas New England Biolabs®. Para la digestión enzimática se agregaron 5.0 µL de amortiguador Smart Buffer®, 3.5 unidades de cada enzima, 15 µL de producto de PCR y se aforó a 50 µL con agua estéril inyectable y se dejaron incubando a 37°C o 60°C dependiendo de la enzima utilizada toda la noche.

Cuadro Anexo 1. Iniciadores para la genotipificación mediante MnPCR-RFLP (Su et al.,2010)

Marcadores	Iniciadores para múltiplex (externos)	Iniciadores para PCR anidada (internos)	Producto de amplificación anidado (pb)	Enzimas de restricción
<i>SAG1</i>	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	<i>Sau96I</i> + <i>HaeIII</i>
<i>SAG2</i> Alt.	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTGACACCAGCGGGAGCAC	546	<i>HinfI</i> + <i>TaqI</i>
<i>SAG3</i>	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTGCGGGTGTTCCTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	226	<i>NciI</i>
<i>BTUB</i>	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	<i>BsiEI</i> + <i>TaqI</i>
<i>GRA6</i>	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	<i>MseI</i>
<i>c22-8</i>	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: R:AGGTGCTTGGATATTCGC	521	<i>BsmAI</i> + <i>MbolI</i>
<i>c29-2</i>	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATAAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTTCGC R: R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	<i>HpyCH4IV</i> + <i>RsaI</i>
<i>L358</i>	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	<i>HaeIII</i> + <i>NlaIII</i>
<i>PK1</i>	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	<i>AvaI</i> + <i>RsaI</i>
<i>Apico</i>	F: TGGTTTTAACCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F: GCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTTCGAACCCTTGATA	640	<i>AflIII</i> + <i>DdeI</i>

Cuadro Anexo 2. Iniciadores para la genotipificación mediante microsatélites (Ajzenberg et al.,2010)

Marcador	Cromosoma	Secuencia de los iniciadores	Rango de producto esperado (pb)
<i>TUB2</i>	IX	F: 6-FAM-TGGTCTTCACCCTTTTCATCC R: TTGGCCAAAGACGAAGTTGT	287 - 291
<i>W35</i>	II	F: HEX-GGTTCACTGGATCTTCTCCAA R: AATGAACGTCGCTTGTTC	242 - 248
<i>TgM-A</i>	X	F: HEX-GGCGTCGACATGAGTTTCTC R: TGGGCATGTAAATGTAGAGATG	203 - 211
<i>B18</i>	VIIa	F: 6-FAM-TGGTCTTCACCCTTTTCATCC R: AGGATAAGTTTCTTCACAACGA	156 - 170
<i>B17</i>	XII	F: HEX-AACAGACACCCGATGCCTAC R: GGCAACAGGAGGTAGAGGAG	334 - 366
<i>M33</i>	IV	F: 6-FAM- TACGCTTCGCATTGTACCAG R: TCTTTTCTCCCCTTCGCTCT	165 - 173
<i>IV.1</i>	IV	F: HEX-GAAGTTCGGCCTGTTCCCTC R: TCTGCCTGGAAAAGGAAAGA	272 - 282
<i>XI.1</i>	XI	F: 6-FAM-GCGTGTGACGAGTTCTGAAA R: AAGTCCCCTGAAAAGCCAAT	354 - 362
<i>M48</i>	Ia	F: 6-FAM-AACATGTGCGGTAAGATTTCG R: CTCTTCACTGAGCGCCTTTC	209 - 243
<i>M102</i>	VIIa	F: NED-CAGTCCAGGCATACCTCACC R: CAATCCCAAATCCCAAACC	164 - 196
<i>N60</i>	Ib	F: NED-GAATCGTCGAGGTGCTATCC R: AACGGTTGACCTGTGGCGAGT	132 - 157
<i>N82</i>	XII	F: HEX-TGCGTGCTTGTCAGAGTTC R: GCGTCCTTGACATGCACAT	105 - 145
<i>AA</i>	VIII	F: NED-GATGTCCGGTCAATTTTGCT R: GACGGGAAGGACAGAAACAC	251 - 332
<i>N61</i>	VIIb	F: 6-FAM-ATCGGCGGTGGTTGTAGAT R: CCTGATGTTGATGTAAGGATGC	79 - 123
<i>N83</i>	X	F: 6-FAM-ATGGGTGAACAGCGTAGACA R: GCAGGACGAAGAGGATGAGA	306 - 338

Anexo 6: Soluciones

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

Nota: la solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso (máximo 30 minutos)
7. Solución de ácido sulfúrico 1N
 - Tomar 98.08 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4)
 - Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL

8. Amortiguador de corrida TBE 10x
 - 55 g de ácido bórico
 - Tris-base 108g
 - EDTA 7.44g
 - Disolver en 1000 mL de agua bidestilada

9. Amortiguador de corrida TBE 1x
 - Agregar 100 mL de TBE 10x
 - Aforar a 1000 mL con agua bidestilada

10. Bromuro de etidio al 5%
 - 50 μ L de bromuro de etidio
 - Aforar a 1000 μ L con agua inyectable
 - Conservar a -20°C cubierto de la exposición de la luz

11. Gel de agarosa al 1.5%
 - Pesar 2.25 g de agarosa ultrapura
 - 150 mL de TBE 1x
 - Calentar en microondas hasta que este completamente transparente y sin burbujas
 - Agregar 70 μ L de bromuro de etidio (BrEt)

12. Gel de agarosa al 3%
 - Pesar 4.5 g de agarosa ultrapura
 - 150 mL de TBE 1x
 - Calentar en microondas hasta que esté completamente transparente y sin burbujas
 - Agregar 70 μ L de bromuro de etidio (BrEt)

13. Amortiguador de carga (5 mL)
 - 1.5 mL de glicerol
 - 12.5 mg de azul de bromofenol
 - 3.5 mL de agua bidestilada

14. Formalina amortiguada al 10%
 - 100 mL de formaldehído 37-40%
 - 4 g de fosfato de potasio monobásico anhidro
 - 6.5 g de fosfato de potasio dibásico anhidro
 - Aforar a 1000 mL con agua bidestilada



Mixed *Toxoplasma gondii* infection and new genotypes in feral cats of Quintana Roo, México

Luis Fernando Valenzuela-Moreno^{a,b}, Claudia Patricia Rico-Torres^a, Carlos Cedillo-Peláez^a, Héctor Luna-Pastén^a, Sara Teresa Méndez-Cruz^c, Gabriela Lara-Martínez^d, Dolores Correa^{a,*}, Heriberto Caballero-Ortega^{a,*}

^a Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes-Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530, Ciudad de México, Mexico

^b Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^c Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes-Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530, Ciudad de México, Mexico

^d Colección Zoológica Privada, Playa del Carmen, Quintana Roo, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Toxoplasma gondii
Quintana Roo-México
Feral cats
Mixed infections
New genotypes
Atypical strains

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis caused by *Toxoplasma gondii* that infects homeothermic animals, including humans. To date, as many as 287 genotypes have been described worldwide. Genetic characterization of the parasite is crucial because the parasite type can determine the presentation and severity of toxoplasmosis. Previously, we reported that the Yucatán Peninsula has a frequency of infection of over 70% in humans and other animals; moreover, there are seven species of felids, including domestic cats; thus, we hypothesized that this might be a region with a high diversity of the parasite. Nevertheless, no genotyping of this protozoan has been performed in this region. Thus, the aim of this study was to genotype *T. gondii* from naturally infected feral cats of Quintana Roo, within the Yucatán Peninsula, and to describe its genetic variability. Eleven feral cats were captured and bled to obtain the buffy coat; then, they were euthanized to collect target organs or tissues to extract DNA. Samples were processed by PCR for diagnosis, and ten polymorphic markers were genotyped by PCR-RFLP. Atypical *GRA6* gene products were cloned and sequenced. Ten of the eleven cats were PCR positive for toxoplasmosis in blood; of these, seven had mixed infections. Also, two isolates were obtained from the heart and diaphragm of two animals. At least 23 different genotypes were detected, from which 18 are new worldwide. From the atypical *GRA6* gene cloning and sequencing analysis, a mixed infection was discovered, due to one strain identical to GT1 and another to VAND. In conclusion, *T. gondii* genetic diversity in the region is high and different from that in other regions, with new genotypes exclusive to México and some others shared with USA and South America.

1. Introduction

Toxoplasma gondii causes one of the most common zoonoses worldwide, infecting a wide range of warm-blooded animals. Toxoplasmosis manifests as a mild nonspecific infection or is asymptomatic in immunocompetent hosts (Montoya, 2002). Currently, it is known that the genetic diversity of *T. gondii* is high, i.e., at least 287 genotypes have been demonstrated worldwide with the use of ten polymorphic markers by PCR-RFLP (Bernstein et al., 2018). Nearly all

felids are definitive hosts of *T. gondii*; thus, broad variability is expected in areas of high prevalence and where there are wild, feral or domestic cats roaming free, due to many opportunities for sexual recombination and SNP generation resulting from asexual reproduction in the intermediate hosts (Cañón-Franco et al., 2013a,b).

In México, most of the isolations and descriptions of the genetic variability of the parasite have been performed using samples from humans and domestic and wild animals, and they are concentrated in the northern region of the country (Durango), on the Pacific coast

* Corresponding authors at: Insurgentes Sur 3700C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Ciudad de México, C.P. 04530, Mexico.

E-mail addresses: mvzluivalenzuela@gmail.com (L.F. Valenzuela-Moreno), claus_rico@yahoo.com.mx (C.P. Rico-Torres), mvzcarloscedillo@hotmail.com (C. Cedillo-Peláez), hec_vene@hotmail.com (H. Luna-Pastén), saratme@hotmail.com (S.T. Méndez-Cruz), glara@experienciasxcaret.com.mx (G. Lara-Martínez), mariadol@yahoo.com (D. Correa), hcaballero_2000@yahoo.com.mx (H. Caballero-Ortega).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.006>

Received 4 January 2019; Received in revised form 7 February 2019; Accepted 4 March 2019

Available online 06 March 2019

0001-706X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Colima) and in some states of the Valley of México, where clonal and non-clonal genotypes have been found (Dubey et al., 2004, 2009; Alvarado-Esquivel et al., 2011; Cedillo-Peláez et al., 2011; Dubey et al., 2013; Rico-Torres et al., 2015, 2018).

Previously, we found that in the tropical regions of México, including the Yucatán Peninsula, there is a frequency of *T. gondii* infection of over 70% in humans (Caballero-Ortega et al., 2012). This region has a warm-humid climate, similar to some countries in South America, and seven species of felids, including domestic cats. Indeed, *T. gondii* has been demonstrated in cats, pigs and opossums, but no genotyping studies have been performed (Castillo-Morales et al., 2012; Ortega-Pacheco et al., 2013; Dzib-Paredes et al., 2016; Hernández-Cortazar et al., 2016; Torres-Castro et al., 2016). Thus, we chose to genotype *T. gondii* from naturally infected feral cats of Quintana Roo, within the Yucatán Peninsula, to describe its genetic variability and to determine if there are endemic or atypical strains of this parasite.

2. Material and methods

2.1. Ethics approval

The present study followed national and international regulations for animal welfare and care. It was approved with registration number 013/2012 by the Reviewing Board of the Instituto Nacional de Pediatría of the Ministry of Health of México (INP; IRB-NIH numbers IRB00008064 and IRB00008065), which includes the Research and Animal Care Committees.

2.2. Captured cats

This study was carried out with a private collection from the municipality of Solidaridad, Quintana Roo, México (20°34'59.8"N, 87°07'12.8"W). Because it is a descriptive study, sampling was at convenience. Eleven feral cats were trapped using sardine as bait and Tomahawk® live traps (Hazelhurst, WI, USA) for medium-sized mammals. The captured cats were not stray, since they did not live in an urban area; they were animals that had access to human leftovers, but they lived free, in an eco-archaeological park inserted in a jungle patch in the Yucatan Peninsula, with access to the Caribbean Sea. All cats were anaesthetized using 9.7 mg/kg of tiletamine/zolazepam (Zoletil 100®, Virbac, Carros, France) for external inspection and photographing of teeth to estimate age. Six millilitres of whole blood from the jugular vein were collected prior to euthanasia with a 3 mL IV of sodium pentobarbital (Doletal®, Vetoquinol, France), performed according to the Mexican official standard NOM-033-ZOO-1995. Necropsy was done following the procedure previously described, and samples of heart, lung, liver, spleen, brain and muscle (diaphragm and right gracilis) were collected (Schuneman and Constantino, 2002). A portion of each organ was maintained under refrigeration for inoculation into Balb/c mice; another fraction was kept frozen at -20 °C until use for DNA extraction, and a third one was fixed in buffered 10% formalin for anatomic-pathological analysis.

2.3. Isolation in mice

Toxoplasma gondii isolation was also attempted, using mice, following the methodology described previously (Rico-Torres et al., 2015). The handling, care and use of rodents were carried out according to NOM-062-ZOO-1999. Briefly, the brain and a pool of heart and diaphragm were manually homogenized in sterile PBS with added penicillin G (10,000 IU/mL); then, two BALB/c mice per sample were intraperitoneally inoculated with 0.5 mL of the homogenate each. Mice were examined every day and euthanized if they showed clinical signs of *T. gondii* infection. Then, tissue imprints of lung and brain were observed under an optical microscope to search for *T. gondii* tachyzoites or tissue cysts. The surviving mice were euthanized 45 days post

inoculation and were considered infected if tachyzoites or tissue cysts were found in their tissues.

2.4. DNA extraction

DNA was extracted from the blood buffy coat as described by Brenier-Pinchart et al. (2015) and from tissues of inoculated mice using a Qiagen Puregene Tissue commercial kit (Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified with a spectrophotometer (The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000, MA, USA) and kept frozen at -20 °C until use.

2.5. PCRs and genotyping

To search for *T. gondii* DNA in the blood samples, real-time PCR was performed using a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), specifically for a 62 bp sequence of the *BI* gene as previously described, and parasite load was determined using standard curves (Kompalic-Cristo et al., 2007; Cedillo-Peláez et al., 2011). DNA of the *T. gondii* RH strain was used as positive control.

All blood samples were also tested for the *BI* gene in a hemi-nested PCR that amplified a 362 pb product and for SeqRep529 (Tox4-5) using the primers previously described (Pujol-Riqué et al., 1999; Homan and Vercammen, 2000). Positive samples for at least one molecular test were included in a nested multiplex PCR for 10 polymorphic markers (*SAG1*, Alt. *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* and *Apico*) following the methodology described by Su et al. (2010). Two negative template controls (water) and one re-amplified negative control (negative template control from multilocus PCR) were utilized in each nested PCR. All PCR assays (real time and endpoint) were carried out with AmpliTaq Gold™ (Thermo Fisher Scientific, cat. 4311806, MA, USA). For the *GRA6* gene, a hemi-nested PCR was performed using the external primers F-*GRA6*: 5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT-3' and R-*GRA6*: 5'-TACAAGACATAGAGTGCCCC-3' described by Fazaeli et al. (2000) and Su et al. (2010), respectively, which amplify an 854 bp product in type I and type III strains and an 836 bp fragment in type II strains, with an annealing temperature of 55 °C. The second amplification round for the *GRA6* gene was performed using both internal primers as previously described. All nested products were digested with the specific restriction enzymes for each marker (New England, Biolabs, R0165S, R0107S, R0155S, R0149S, R0196S, R0554S, R0525S, R0529S, R0148S, R0619S, R0167S, R0108S, R0125S, R0520S, R0152S, R0175S, MA, USA; Su et al., 2010). The reference strains RH (type I), ME49 (type II) and VEG (type III) strains were included in reactions as positive controls and the pattern digestion was compared.

2.6. Cloning and sequencing

Samples that exhibited atypical RFLP patterns were amplified again, and the amplicon was cut from the agarose gel, purified and cloned into a pJET1.2/blunt cloning vector. The vectors were then used to transform the *E. coli* TOP strain using a commercial kit (GeneJET® PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, cat. K1231, MA, USA). A PCR was carried out to determine which colonies had the desired fragment (F-In-*GRA6*: 5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT-3' and R-In-*GRA6*: 5'-TCGCCGAA GAGTTGACATAG-3'; Su et al., 2010). PCR-positive colonies were subjected to plasmid extraction with a commercial kit following the manufacturer's instructions (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific, cat. K0503, MA, USA). AmpliTaq Gold™ was also used for PCR assays and the restriction enzymes used as previously described (England Biolabs, MA, USA). Products obtained from the purification were sequenced in two Institutions, the Instituto Nacional de Medicina Genómica, and the Instituto de Biología-UNAM, México, and the chromatographs were visualized and analysed with SnapGene viewer® v 4.1.4. Phred quality was verified; in cases having a nucleotide sequence with a quality lower than 30, it was corroborated with the

Table 1
Multiplex multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from feral cats in Quintana Roo, Mexico.

Number	ID	Estimated age (years)	Tissue or isolate	529 bp repeat PCR	B/gene qPCR	Tachyzoites/mL	RFLP genotyping results:											Genotypes per cat (n)
							SAG1	Alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	# ToxoDB genotype number	
1	TgCatMxQR1	< 1	Blood Heart/ Diaph ^a	+	+/-	< 50 nd	II or III I	I+II I	II I+III	I I	II I+III	I I	II I	I I	I I	I I	#3, #New (1) #10, #225 and #New (2) #New (1) ^c	Min 4, max 6
2	TgCatMxQR2	1	Blood	+	+	15,800	II or III	I	II	I+II+III	I	I	I	II	II	II	#New (1) ^c	Min 3 1
3	TgCatMxQR3	1-2	Blood	+	+/-	1,833	I	I	III	I+II+III	I	I	I	II	II	II	^c	1
4	TgCatMxQR4	< 1	Blood	+	+	< 50	II or III	I+II	II	II	I+II	I	II	II	II	II	#New (4) #New (2)	Min 4, max 6
5	TgCatMxQR5	< 1	Blood Heart/ Diaph ^a	+	+	< 50 nd	II or III I	I+II I	II I+II	II I	I+II I	I I	II I	II I	I I	I I	#New (4) #New (2)	Min 4, max 6
6	TgCatMxQR6	1	Blood	+	+	1,552	I	III	I+II+III	III	III	I	I	I	I	I	#164 or #182 and #New (1) ^c	Min 3
7	TgCatMxQR7	1	Blood	+	+	< 50	II or III	II	II	II	II	III	III	III	III	III	#New (1) ^c	1
8	TgCatMxQR8	< 1	Blood	-	-	709	I	III	II+III	III	III	I	I	I	I	I	#164 or #182 and #New (1) ^c	Min 2
9	TgCatMxQR9	< 1	Blood	-	+	709	I	III	II+III	III	III	I	I	I	I	I	#164 or #182 and #New (1) ^c	Min 2
10	TgCatMxQR10	< 1	Blood	-	+	< 50	I+II or III	I	II+III	I	II+III	I	II	II	II	II	#New (4) #New (2)	Min 2, max 4
11	TgCatMxQR11	1-2	Blood	-	+	< 50	I	III	II	I+III ^b	I	III	III	III	III	III	#New (2)	Min 2
Total							92	83	100	33	25	67	67	33	67	25	50	
Frequency (%)																		

nd not done. All blank cells indicate no amplicons were obtained.

^a Genotyping results were obtained from lung/brain of mice inoculated with a pool of heart and diaphragm from cats 1 and 5.

^b Identical to GT1 (Type I) and to atypical VAND (Type III) strains by sequencing.

^c Low number of loci typed; +/- undetermined results in the presence/absence test by qPCR.

antisense sequence. The sequencing was not carried out from clinical samples directly, but from the purified plasmids of the clones obtained.

2.7. Histopathology

All tissues fixed in buffered formalin were routinely processed for histopathology, stained with haematoxylin and eosin and examined with a Zeiss Axiostar Plus optical microscope (Oberkochen, Germany) to look for acute or chronic stages of *T. gondii* infection.

3. Results

All captured cats had a regular or good body condition; externally, there were no changes in their skin or appendages. The estimated age ranged from six months to two years. During necropsy and histopathological analyses, no lesions compatible with those reported for *T. gondii* infection (acute or chronic) were found.

Results for PCR and *T. gondii* genotypes found in feral cats from Quintana Roo, México, are summarized in Table 1. Ten cats were positive for at least one of the molecular tests; only one cat was negative for all. In the blood samples, the number of genotyped loci varied from two to nine. *SAG3* was the most frequently characterized gene, followed by *SAG1* and Alt. *SAG2*. Tissues of all cats were bioassayed in BALB/c mice. However, no isolates were obtained from rodents inoculated with brain samples and only two isolates of *T. gondii* were obtained from mice inoculated intraperitoneally with a pool of the heart and diaphragm of TgCatMxQR1 and TgCatMxQR5; in these cases, ten markers were typed. Mixed infections were found in 7/10 cats, as evidenced by five loci: *SAG1* (I + II or III), Alt. *SAG2* (I + II), *SAG3* (I + III, I + II + III, I + II and II + III), *GRA6* (I + III) and *c22-8* (I + II and I + III) (Fig. 1). In the TgCatMxQR1 isolate, a restriction pattern for the *SAG3* and *c22-8* genes was obtained for the classical strains I and III. The results with these alleles showed that this feline may have been infected with up to four different *T. gondii* genotypes, i.e., the clonal type I (ToxoDB #10), #225 and two new strains. In addition, two genotypes were detected in the cat's blood, a new one and ToxoDB #3 (type II-like), resulting in six possible genotypes in a single individual. A similar scenario was found in TgCatMxQR5, since up to four genotypes were detected in blood and two more in the isolate; all genotypes would be new. TgCatMxQR6 and TgCatMxQR9 shared two genotypes, one new and one ToxoDB #164 or #182. No clonal type III lineage was found. According to these combinations, there are up to 18 new genotypes of

T. gondii infecting cats in that zone of México (Table 1).

TgCatMxQR11 had an RFLP atypical allele at the *GRA6* locus. To confirm this result, the *GRA6* gene was cloned and sequenced, resulting in two genotypes, one of which (TgCatMxQR11a) was identical to the GT1 strain (TGGT1_chrX; available at www.toxodb.org), and the second was type III-like (TgCatMxQR11b), similar to the VEG strain (TGVEG_chrX), but with two SNPs at positions 196 and 252, identical to the atypical strain VAND (available at www.toxodb.org in “Genomes and Data Types” and in GenBank with accession [AEYJ000000000.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AEYJ000000000.2); Fig. 2). The sequence from TgCatMxQR11b was submitted and deposited in GenBank with the accession number MH196517.

4. Discussion

Genotyping studies of *T. gondii* strains in México are scarce; however, this genetic characterization is crucial because the genotype can determine the presentation and severity of toxoplasmosis. For this reason, we aimed to examine the *T. gondii* strains circulating in a region of high prevalence, namely, Quintana Roo. In fact, although we sampled a small number of individuals, the frequency of PCR-positive cats was high (91%).

In this study, we obtained two striking findings: the presence of mixed infections (seven out of ten animals harboured from two to six strains) and great variability of strains among few cats in a narrow region. Naturally occurring mixed infections have rarely been described, mainly from wildlife in Spain and from domestic and wild species of North and South America (Pena et al., 2008; Cañón-Franco et al., 2013a,b; Calero-Bernal et al., 2015; Cunha et al., 2015; Verma et al., 2017). To the best of our knowledge, few studies have reported double or triple infections; one such infection was reported by Lindström et al. (2008), who demonstrated a triple infection in two chickens using the *SAG2* and *SAG3* loci, and another was reported by Boughattas et al. (2010), who found I, II and III *SAG3* alleles in a sample of human amniotic fluid. In México, we reported mixed infections in congenital cases of the Valley of México, where five out of nine mother/newborn pairs had double infections, also shown by the Alt. *SAG2*, *SAG3*, *GRA6* and *Apico* loci (I + II and I + III) (Rico-Torres et al., 2018).

The virtual lack of reports about mixed infections worldwide may be due to methodological (not biological) reasons since most genotyping is performed using DNA from isolates; this strategy could result in a biased selection of one strain over others present in the clinical samples; furthermore, such studies have analyzed only one or two tissues of the

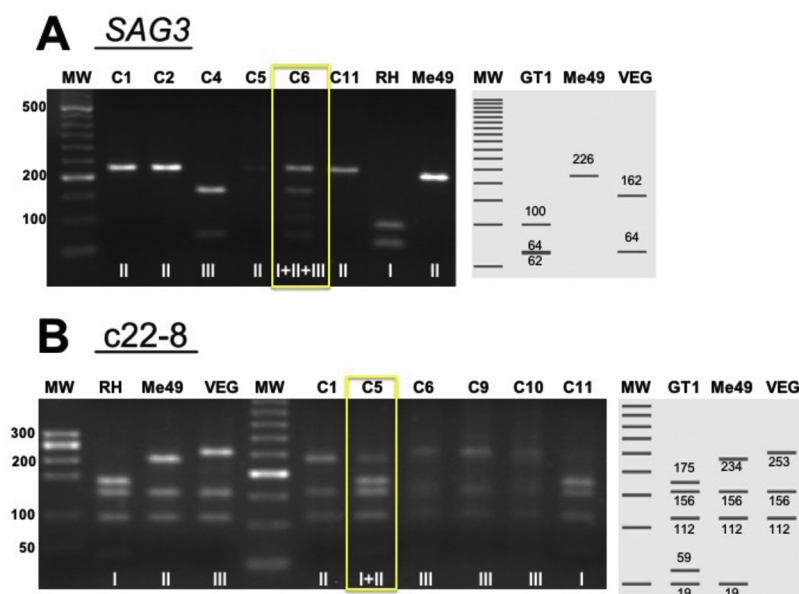


Fig. 1. Representative PCR-RFLP patterns of *T. gondii* single and mixed infections in feral cats' blood. Triple (A) and double (B) infections are highlighted with yellow squares. Resulting genotypes are specified at the bottom. *In silico* digestion was done in www.benchling.com. MW: molecular weight marker of 50/100 bp; RH, ME49 and VEG are type I, II and III reference strains, respectively; C: cat ID (Table 1).



Fig. 2. Multiple sequence alignment of the *GRA6* locus. The two cloned sequences from TgCatMxQR11A and B (highlighted in black) were aligned with reference sequences of RH and GT1 (type I), Me49 (type II), VEG (type III) and VAND (atypical) strains. Alignment was performed by BioEdit® v5.0.6 software and sequences with accession numbers GT1 TGGT1_chrX, Me49 TGM49_chrX, VEG TGVEG_chrX and VAND in www.toxodb.org and RH L33814.1 in GenBank.

original host, while we looked in different compartments of the cats (Lindström et al., 2008; Wendte et al., 2011). The origin of mixed infections is a matter of interest: either the cats got re-infected or they eat preys/leftovers contaminated with different variants within few days. Both possibilities are plausible, because in the area we studied, there are food leftovers and synanthropic and wild preys close-by. The presence of parasite DNA in the blood and at the same time in other tissues, would support re-infection as well. In fact, Gavinet et al. (1997) showed that a woman already infected, acquired a second *T. gondii* strain and transmitted the parasite to her foetus, causing congenital infection. Likewise, we recently found infections with two strains in women who delivered infected offspring, some them with only one strain, suggesting maternal reinfection (Rico-Torres et al., 2018). Moreover, there are experimental and observational studies in animals showed events of mixed infections and reinfections (Calero-Bernal et al., 2013; Jensen et al., 2015).

According to ToxoDB and the table provided by Dr. Su, the finding of mixed infections in most cats could result in at least 23 combinations of genotypes, of which 18 are new worldwide. The other five genotypes could be #225, similar to that isolated from a chicken in China and a clinical sample from a case of congenital toxoplasmosis in Central México (Wang et al., 2013; Rico-Torres et al., 2018); genotype #3 (type II-like), widely reported in USA and Europe in domestic animals and humans (Shwab et al., 2014); genotypes #164 or #182, isolated from a chicken and eared doves, respectively, from Brazil; and #10 (clonal type I), frequently isolated in Europe and China (Soares et al., 2011; Wang et al., 2013; Schwab et al., 2014; Barros et al., 2014). To the best of our knowledge, this is the second time that type I and #225 genotypes have been found in México (Rico-Torres et al., 2018). Although the animals presented moderate to severe lymphoid depletion (not shown), we did not find clinical signs of *T. gondii* infection, which suggests that these genotypes are not virulent in felines. The sequence of *GRA6* obtained from TgCatMxQR11b was identical to that of the VAND strain (344 pb) isolated from an immunocompetent patient in French Guiana. This atypical strain (haplogroup #10) is known to be highly virulent in mice and caused acute disseminated toxoplasmosis in the original host (Bossi et al., 1998; Jensen et al., 2015). This finding suggests that atypical and virulent strains have been recombining in sylvatic cycles in the tropical environments throughout the Americas. Strains GT1 and VAND are not available in our lab; thus, a possible contamination of the reactions with DNA from these strains was ruled out.

One of the most important factors contributing to the generation of *T. gondii* genetic diversity is a high density of felids in a given area. If these hosts consume different strains of the parasite, then the probability of genetic recombination in the intestinal cells is high. Feral cats are considered invasive species with virtually no natural predators in

tropical ecosystems, and 100% of their diet comes from hunting (Wendte et al., 2011; Gilot-Fromont et al., 2012). In southeastern México, feral cats coexist with six wild felid species, i.e., the jaguar, cougar, red lynx, ocelot, jaguarundi and margay, which could explain the great genetic diversity found (Ceballos and Oliva, 2005; Ceballos et al., 2012). The cats studied herein could have access to human meal leftovers as well. We found only two clonal strains (ToxoDB #3 and #10) and recombinants; this result contrasts with those in the United States and Canada, where Jiang et al. (2018) found a great diversity in free-roaming animals, including feral cats, but 64% of them were clonal (ToxoDB #3 = 11%). Unlike those authors, we did not find type 12 genotypes that are broadly disseminated in wildlife and feral cats. Our results, together with those from South America, suggest that haplogroup 12 (ToxoDB #4 and #5) is confined to USA and Canada (Shwab et al., 2018).

Surprisingly, the parasite burden in blood did not correlate with the number of *loci* typed by PCR-RFLP, as shown in TgCatMxQR2, which had more than 15,000 tachyzoites/mL and for which only four *loci* could be typed. In contrast, TgCatMxQR5, which had < 50 tachyzoites/mL, yielded nine typed *loci*. We found similar results in a previous study of humans examining mother/children pairs from the central region of México, in which few *loci* could be genotyped despite high parasitic loads (Rico-Torres et al., 2018).

From all cats captured, three were serologically positive, and one gave values near the cut-off in ELISA (data not shown), probably because they were suffering from immunodepression, as suggested by the lymphoid depletion in nodules and spleen, as was seen by histopathological examination (Supplementary Fig. 1). Ten of eleven cats (90.9%) were PCR positive in blood; recent findings have proven that the parasite may circulate freely or inside leucocytes for long periods (Harker et al., 2015; Konradt et al., 2016).

In conclusion, *Toxoplasma gondii* genetic diversity in the region is high and different from that in other regions, with new genotypes exclusive to México and a few shared with South America. The high frequency of mixed infections suggests a very strong infective pressure, with many genotypes circulating among humans and other intermediate hosts in the region and, thus, with possible strong impact and zoonotic repercussions.

Availability of data and materials

Reference strain sequences GT1 TGGT1_chrX, Me49 TGM49_chrX, VEG TGVEG_chrX and VAND are available at www.toxodb.org. The RH sequence with accession number L33814.1 and TgCatMxQR11B sequence with number MH196517 are available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

ToxoDB genotypes are available at <http://web.utk.edu/~csu1/>

ListToxoDB-PCR-RFLPgenotypes.html.

Declarations of interest

None

Acknowledgements

The authors thank Dr. Chunlei Su for the information provided on the *Toxoplasma* genotypes and Eduardo Farfán and Rafael López-Reboredo for their excellent technical support. This work was partially supported by grant 013/2012 from the Instituto Nacional de Pediatría.

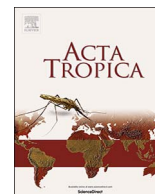
Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.006>.

References

- Alvarado-Esquivel, C., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Choudhary, S., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Villena, I., Dubey, J.P., 2011. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *J. Parasitol.* 97, 809–812. <https://doi.org/10.1645/GE-2844.1>.
- Barros, L.D., Taroda, A., Zulpo, D.L., Cunha, I.A., Sammi, A.S., Cardim, S.T., Miura, A.C., Su, C., Machado, R.Z., Vidotto, O., Garcia, J.L., 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaidura macroura*) in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 443–448. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014073>.
- Bernstein, M., Pardini, L., Moré, G., Unzaga, J.M., Su, C., Venturini, M.C., 2018. Population structure of *Toxoplasma gondii* in Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 65, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.018>.
- Bossi, P., Caumes, E., Paris, L., Dardé, M.L., Bricaire, F., 1998. *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3724–3725.
- Boughattas, S., Ben-Abdallah, R., Siala, E., Souissi, O., Aoun, K., Bouratbine, A., 2010. Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 1041–1046. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0691>.
- Brenier-Pinchart, M.P., Capderou, E., Bertini, R.L., Bailly, S., Fricker-Hidalgo, H., Varlet-Marie, E., Murat, J.B., Sterkers, Y., Touafek, F., Bastien, P., Pelloux, H., 2015. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the detection of circulating *Toxoplasma gondii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 82, 289–291. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.004>.
- Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F.J., Conde-Glez, C.J., Cedillo-Pelaez, C., Vargas-Villavicencio, J.A., Luna-Pastén, H., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegria, L.B., Correa, D., 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.08.004>.
- Calero-Bernal, R., Gómez-Gordo, L., Saugar, J.M., Frontera, E., Pérez-Martín, J.E., Reina, D., Serrano, F.J., Fuentes, I., 2013. Congenital toxoplasmosis in wild boar (*Sus scrofa*) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. *J. Wildl. Dis.* 49, 1019–1023. <https://doi.org/10.7589/2013-01-024>.
- Calero-Bernal, R., Saugar, J.M., Frontera, E., Pérez-Martín, J.E., Habela, A., Serrano, F.J., Reina, D., Fuentes, I., 2015. Prevalence and genotype identification of *Toxoplasma gondii* in wild animals from Southwestern Spain. *J. Wildl. Dis.* 51, 233–238. <https://doi.org/10.7589/2013-09-233>.
- Cañón-Franco, W., Araújo, F.A., Gennari, S.M., 2013a. *Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. Sao Paulo.* 50, 50–67.
- Cañón-Franco, W.A., Araújo, F.A., López-Orozco, N., Jardim, M.M., Keid, L.B., Dalla-Rosa, C., Cabral, A.D., Pena, H.F., Gennari, S.M., 2013b. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. *Vet. Parasitol.* 197, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.019>.
- Castillo-Morales, V.J., Acosta Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E.D.S., Jiménez-Coello, M., Segura-Correa, J.C., Aguilar-Caballero, A.J., Ortega-Pacheco, A., 2012. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from the tropics of Mexico using serological and molecular tests. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/529108>.
- Ceballos, G., Oliva, G., 2005. Mamíferos silvestres de México. In: CONABIO (Ed.), *Primera edición*. FCE, Ciudad de México.
- Ceballos, G., Arroyo-Cabrales, J., Medellín, R., Domínguez-Castellanos, Y., 2012. Lista actualizada de los mamíferos de México. *Rev. Mex. Mastozoológica* 9, 21–71.
- Cedillo-Pelaez, C., Rico-Torres, C.P., Salas-Garrido, C.G., Correa, D., 2011. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Vet. Parasitol.* 180, 368–371. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.012>.
- Cunha, M., Carneiro, A.C., Costa, J.L., Vitor, R., 2015. Genotyping of *Toxoplasma gondii* directly from human and animal biological samples: from partial genotypes to a new genotype. *J. Parasitol.* 102, 157–160. <https://doi.org/10.1645/15-813>.
- Dubey, J.P., Morales, E.S., Lehmann, T., 2004. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J. Parasitol.* 90, 411–413. <https://doi.org/10.1645/GE-194R>.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., González-Herrera, A., Ferreira, L.R., Kwok, O.C., Su, C., 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *J. Parasitol.* 95, 319–322. <https://doi.org/10.1645/GE-1874.1>.
- Dubey, J.P., Alvarado-Esquivel, C., Herrera-Valenzuela, V.H., Ortiz-Diaz, J.J., Oliveira, S., Verma, S.K., et al., 2013. A new atypical genotype mouse virulent strain of *Toxoplasma gondii* isolated from the heart of a wild caught puma (*Felis concolor*) from Durango, Mexico. *Vet. Parasitol.* 197, 674–677. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.005>.
- Dzib-Paredes, G.F., Rosado-Aguilar, J.A., Acosta-Viana, K.Y., Ortega-Pacheco, A., Hernández-Cortázar, I.B., Guzmán-Marín, E., Jiménez-Coello, M., 2016. Seroprevalence and parasite load of *Toxoplasma gondii* in Mexican hairless pig (*Sus scrofa*) tissues from the Southeast of Mexico. *Vet. Parasitol.* 229, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.016>.
- Fazaeli, A., Carter, P.E., Dardé, M.L., Pennington, T.H., 2000. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by *GRA6* gene sequence analysis. *Int. J. Parasitol.* 30, 637–642. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00036-9).
- Gavinnet, M.F., Robert, F., Firtion, G., Delouvrier, E., Hennequin, C., Maurin, J.R., Tourte-Schaefer, C., Dupouy-Camet, J., 1997. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1276–1277.
- Gilot-Fromont, E., Dardé, M.L., Richomme, C., Aubert, D., Afonso, E., Mercier, A., et al., 2012. The life cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment. In: Djurković-Djaković, O. (Ed.), *Toxoplasmosis - Recent Adv. InTech*, pp. 3–36.
- Harker, K.S., Ueno, N., Lodoen, M.B., 2015. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol.* 37, 141–149. <https://doi.org/10.1111/pim.12163>.
- Hernández-Cortázar, I.B., Acosta-Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E., Ortega-Pacheco, A., Torres-Acosta, J.F., Jiménez-Coello, M., 2016. Presence of *Toxoplasma gondii* in pork intended for human consumption in tropical southern Mexico. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 695–699. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2165>.
- Homan, W., Vercammen, M., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8).
- Jensen, K.D., Camejo, A., Melo, M., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G., Frickel, E.M., Ploegh, H.L., Young, L., Saeij, J.P., 2015. *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *MBio.* 6, e02280. <https://doi.org/10.1128/mBio.02280-14>.
- Jiang, T., Shwab, K., Martin, R., Gerhold, R., Rosenthal, B., Dubey, J.P., Su, C., 2018. A partition of *Toxoplasma gondii* genotypes across spatial gradients and among host species, and decreased parasite diversity towards areas of human settlement in North America. *Int. J. Parasitol.* 48, 611–619. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.008>.
- Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suárez-Mutis, M., Fernandes, O., Britto, C., 2007. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive *B1* gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol. Res.* 101, 619–625. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0524-9>.
- Konradt, C., Ueno, N., Christian, D.A., Delong, J.H., Pritchard, G.H., Herz, J., Bzik, D.J., Koshy, A.A., McGavern, D.B., Lodoen, M.B., Hunter, C.A., 2016. Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nat. Microbiol.* 1, 16001. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.1>.
- Lindström, I., Sundar, N., Lindh, J., Kironde, F., Kabasa, J.D., Kwok, O.C., Dubey, J.P., Smith, J.E., 2008. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology.* 135, 39–45. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003654>.
- Montoya, J.G., 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 185 (Suppl). <https://doi.org/10.1086/338827>. S73–82.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E., Segura-Correa, J.C., Álvarez-Fleites, M., Jiménez-Coello, M., 2013. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico. *Biomed Res. Int.* 2013, 231497. <https://doi.org/10.1155/2013/231497>.
- Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>.
- Pujol-Riqué, M., Derouin, F., García-Quintanilla, A., Valls, M.E., Miró, J.M., Jiménez de Anta, M.T., 1999. Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. *J. Med. Microbiol.* 48, 857–862. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-9-857>.
- Rico-Torres, C.P., Del Viento-Camacho, A., Caballero-Ortega, H., Besné-Mérida, A., Luna-Pastén, H., Correa, D., Palma-García, J.M., 2015. First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: tissue distribution and genetic characterization. *Vet. Parasitol.* 209, 125–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.004>.
- Rico-Torres, C.P., Valenzuela-Moreno, L.F., Luna-Pastén, H., Figueroa-Damián, R., Gómez-Toscano, V., Hernández-Delgado, L., Escobedo-Torres, M.P., Correa, D., 2018. High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the mega-metropolis of Central Mexico. *Acta Trop.* 178, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.008>.
- Schuneman, M.A., Constantino, C.F., 2002. *Técnicas de necropsia en animales domésticos - 2. Edición* (Spanish Edition). In: Aldrete Velasco, J. (Ed.), *Manual Moderno*, México.
- Shwab, E., Zhu, X., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>.
- Shwab, E.K., Saraf, P., Zhu, X.Q., Zhou, D.H., McFerrin, B.M., Ajzenberg, D., Schares, G.,

- Hammond-Aryee, K., van Helden, P., Higgins, S.A., Gerhold, R.W., Rosenthal, B.M., Zhao, X., Dubey, J.P., Su, C., 2018. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E6956–E6963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>.
- Soares, R.M., Silveira, L.H., da Silva, A.V., Ragozo, A., Galli, S., Lopes, E.G., Gennari, S.M., de Jesus Pena, H.F., 2011. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 178, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.037>.
- Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>.
- Torres-Castro, M., Noh-Pech, H., Puerto-Hernández, R., Reyes-Hernández, B., Panti-May, A., Hernández-Betancourt, S., Yeh-Gorocica, A., González-Herrera, L., Zavala-Castro, J., Puerto, F.I., 2016. First molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatan, Mexico. *Open Vet. J.* 6, 57–61. <https://doi.org/10.4314/ovj.v6i1.8>.
- Verma, S.K., Sweeny, A.R., Lovallo, M.J., Calero-Bernal, R., Kwok, O.C., Jiang, T., Su, C., Grigg, M.E., Dubey, J.P., 2017. Seroprevalence, isolation and co-infection of multiple *Toxoplasma gondii* strains in individual bobcats (*Lynx rufus*) from Mississippi, USA. *Int. J. Parasitol.* 47, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.12.007>.
- Wang, L., Cheng, H.W., Huang, K.Q., Xu, Y.H., Li, Y.N., Du, J., Yu, L., Luo, Q.L., Wei, W., Jiang, L., Shen, J.L., 2013. *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity. *Parasit. Vectors* 6, 273. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-273>.
- Wendte, J.M., Gibson, A.K., Grigg, M.E., 2011. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Vet. Parasitol.* 182, 96–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.018>.



High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the mega-metropolis of Central Mexico



Claudia Patricia Rico-Torres^a, Luis Fernando Valenzuela-Moreno^a, Héctor Luna-Pastén^a, Ricardo Figueroa-Damián^b, Valeria Gómez-Toscano^c, Lorena Hernández-Delgado^d, Mónica Patricia Escobedo-Torres^d, Dolores Correa^{a,*}

^a Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Secretaría de Salud, CDMX, México

^b Servicio de Infectología, Instituto Nacional de Perinatología (INPer), Secretaría de Salud, CDMX, México

^c Servicio de Infectología, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Secretaría de Salud, CDMX, México

^d Servicio de Pediatría, Hospital General Dr. Manuel Gea González (HGGeaGz), Secretaría de Salud, CDMX, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Congenital toxoplasmosis
Genotyping
Toxoplasma gondii
Mixed infection
Mexico
New types

ABSTRACT

Mexico presents high prevalence of *Toxoplasma gondii* infection, including the congenital form, but there are few data about the genetic diversity of the parasite, so we attempted parasite isolation and genotyping in nine mother/children pairs with congenital toxoplasmosis (CT), living in the Valley of Mexico, who were part of a 30 cases cohort that started 12 years ago. They were recruited through research projects which included pre- and postnatal screening of congenital infections or directly CT, and cases referred to INP for management because they had clinical abnormalities. Genotyping was performed by PCR-RFLP of *SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* and *Apico* markers, followed by sequencing. Sixty seven percent of samples were typed for the *SAG3* locus, 39% for *Apico* and 33% for *BTUB*, while Alt. *SAG2*, *GRA6* and *c29-2* types could be labelled in less cases. Type I alleles predominated, followed by II and III. We isolated the first strain obtained from humans in Mexico and found three genotypes not previously found in the world. The presence of ToxoDB#10 clonal type was documented in one pair, as well as mixed infections in five mothers. No relation of genotype or parasite load with clinical signs was found. In conclusion, we encountered great genetic diversity and mixed *T. gondii* infections among mother/children pairs with congenital toxoplasmosis in the mega-metropolis of the Valley of Mexico.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is a cosmopolitan pathogen, due to its multiple hosts and ways of transmission, including the vertical route (Weiss and Kim, 2013). Classically thought to be of low diversity, this parasite is now grouped into 278 genotypes, pertaining to 15 haplogroups (Su et al., 2012; ToxoDB.org). Recent studies provided evidence that in the Northern hemisphere the population is mainly clonal, while a pandemic dispersion is taking place in the South (Shwab et al., 2014). Although Mexico is in the Northern hemisphere, it presents a quite high prevalence of *T. gondii* infection, both acquired and congenital, as well as archetypal and atypical genotypes, with an intermediate diversity between North and South America (Vela-Amieva et al., 2005; Cedillo-Peláez et al., 2011; Caballero-Ortega et al., 2012; Dubey et al., 2004, 2009, 2013; Rico-Torres et al., 2012; 2015; Martínez-Flores et al., 2017). This may be of global significance since Mexico is an area

located between the Nearctic and the Neotropical zones separated by the “Sierras Madre Oriental y Occidental” (long and high mountain ranges). Also, there is a great variety of wild, feral and domestic hosts freely roaming in the sylvatic, rural, semi-urban and urban areas, so there is large opportunity for *T. gondii* differential distribution and diversification in the country (Khan et al., 2007; Su et al., 2012; Rico-Torres et al., 2015). Mexico City, one of the largest urbanities of the world, is located at high altitude (2250 masl) and has a mild weather.

Regarding congenital toxoplasmosis (CT), it is recognized that besides pregnancy time at infection, parasite burden and maternal/fetal immune response, *T. gondii* type seems to play an important role on clinical outcome, being type I variants more frequent among infections of the first half of gestation and closely related to clinical severity (Rico-Torres et al., 2016). In Mexico, there were no data about genetic diversity of *T. gondii* in congenital toxoplasmosis, except for a short article in which we reported four perinatal cases infected with type I-related

* Corresponding author at: Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México CDMX, C.P. 04530, México.
E-mail address: mariadol@yahoo.com (D. Correa).

variants in neonates with moderate to severe damage, using three genetic markers (Rico-Torres et al., 2012). In the present work, we show the results of *T. gondii* diversity analysis among congenitally infected children of a group of cases of the metropolis of the Valley of Mexico, which is located at high altitude, using a larger panel of markers (Su et al., 2010).

2. Material and methods

2.1. Patients and congenital toxoplasmosis diagnosis

In the flowchart depicted in the supplementary figure we show the origin of cases of congenital toxoplasmosis that were included in a cohort that is composed by 30 cases nowadays. They came from three main sources along 12 years: one project of pre and postnatal congenital infections screening (including but not exclusive of *T. gondii*, project INP 002/2008), another project about immune response in CT (project 060/2011) and cases referred to INP because they had clinical suspicion of CT. In all cases the mother/newborn (child) pair was included after CT confirmation by clinical and laboratory methods.

Briefly, diagnosis included clinical examination by specialists, and when needed, ocular funduscopy, Computed Tomography and MRI scanning, and electroencephalogram. Laboratory tests included indirect ELISA for IgG antibodies adapted for titration and avidity, mother/newborn comparative Western Blot (WB) for both IgG and IgM, bioassay in mice and real-time PCR. The patients were classified according to severity, in mild vs moderate/severe, and to localization in neurologic, neuro-ophthalmic and disseminated, following the suggested criteria based on international literature (Martín-Hernández, 2004; Baquero-Artigao et al., 2013; Wilson et al., 2016; Cortes et al., 2017). Mothers and newborns received treatment according to international recommendations for prenatal and postnatal schemes.

From this cohort, nine pairs (mother/newborn) were selected due to positive PCR or bioassay in mice and enough DNA to perform genotyping. Four of them were recruited during prenatal or postnatal screening projects and five were clinical cases, referred to INP for clinical management (Supplementary figure).

2.2. Parasite load and genetic characterization

Parasite load was determined with the Applied Biosystems fluorescent real time PCR as previously reported (Cedillo-Peláez et al., 2011). To genotype, we performed the PCR-RFLP method reported by Su et al. (2010) for markers *SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* and *Apico*. The restriction patterns were compared with type I (RH), II (ME49) and III (VEG) strains included in each nested assay. We considered as classical types I, II or III when the genotype was I, II or III in all loci analysed and recombinant when there were different genotypes at different loci (I,II; I,III or I,II,III). We encountered mixed infections in unique samples & loci (see below); they were labelled as I + II or I + III.

From 54 amplicons tested by RFLP, 36 could be purified in enough amount to sequence them, which was performed at the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) Mexico. Sequences were analysed with SnapGene viewer 4.0.5 and Chromas Lite 2.1.1 softwares; they were aligned with those reported in Toxo.DB.org and GenBank web pages by Clustal W2 and NCBI/BLAST websites.

2.3. Bioassay in mice

Isolation was attempted by i.p. inoculation of amniotic fluid (one case) and peripheral blood of all cases into Balb/c mice, as reported previously (Rico-Torres et al., 2015). Two of these animals seroconverted (pairs two and nine, Table 1). A pool of brain, heart, liver, lung and spleen samples of each of these animals was inoculated into Balb/c mice again. Living tachyzoites were recovered from the

peritoneal cavity of the mice from case two. These parasites and PCR positive tissues (spleen or lung) of the mouse of pair nine, were used to genotype *T. gondii*. All other genotypes were gathered from clinical samples directly.

3. Results

From thirty pairs of congenital toxoplasmosis recruited from prenatal/postnatal screening projects or because they were clinical cases, we could genotype nine mother/newborn (child) pairs, since the mother, the newborn or both were PCR positive or suspicious, or because we had the isolate or *T. gondii*-positive mice DNA (in total 18 samples; Table 1). From these, twelve could be genotyped for at least one marker, and three for all loci (the isolate and two clinical samples). For the *SAG3* locus, twelve samples were typed (67%), followed by *Apico* with seven (39%), *BTUB* with six (33%) and *Alt. SAG2*, *GRA6* and *c29-2* with five. Three clinical samples revealed mixed infections (Fig. 1): the newborn from pair five had I + II alleles at *Alt. SAG2*, *GRA6* and *Apico*; the baby from pair six had I + II at the *Apico* locus as well; and the newborn from pair nine had I + III alleles at *SAG3*. Furthermore, two mixed infections were found in pairs two and seven, since the maternal samples presented type II and I *SAG3* alleles, respectively, while the isolate of pair two was type III and the baby's sample of pair seven harbored the type II. So, five mother/newborn pairs presented mixed infections; those of cases N5 and N9 were further corroborated by sequencing (see example in Fig. 2).

We observed a predominance of type I alleles, followed by type II and III, but there is a great heterogeneity in terms of pattern: even though pairs four and nine shared allele I at *SAG3*, and thus they could harbor the same *T. gondii* type (for one of the infections of pair nine), this could not be proven in the present work. The three pairs with complete genotype pattern, confirmed heterogeneity in this group of patients. The clinical samples and the isolate of pair two did not match to any of the 278 genotypes known up to date; besides, the sample of the mother correlated with the results from the isolate (obtained from the newborn) at *Alt. SAG2* and *BTUB* (type I and III respectively) but differed at *SAG3*. Moreover, none of the eight possible combinations built up from the pattern of pair five, corresponded to a reported genotype (ToxoDB.org). Finally, pair four harbored clonal/classical type I-ToxoDB #10- parasites.

The genotype described for pair three could be ToxoDB #112 or #142, found in one cat from Puerto Rico and a chicken of Brazil respectively (ToxoDB.org). Despite lacking results in six markers of pair eight, we determined this case was due to a new variant, since the four loci-pattern typed did not match any previously reported genotype. One of the infections of pair nine could be ToxoDB #10 (clonal Type I) or #27, previously reported in chickens from Nicaragua, but the other, harboring type III *SAG3* allele could correspond to ToxoDB #225, typed in chickens of China (Rajendran et al., 2012; Wang et al., 2013). Either individual loci alleles or partial genotypes shown here have been reported in congenital toxoplasmosis cases from America, Africa and Europe (Rico-Torres et al., 2016): type I *SAG3* was found in Brazil and Tunisia (expanded to other loci here, see case nine; Table 1); type II *SAG3* was observed in Poland, Serbia and Tunisia (Nowakowska et al., 2006; Boughattas et al., 2010; Markovic et al., 2014). Finally, the combination of type I *SAG3* with type III *Apico* has been reported in Brazil (Carneiro et al., 2013).

4. Discussion

In Mexico, there is a high prevalence of *T. gondii* infection – around 43%- with frequencies over 70% in tropical and coastal regions- but there are few reports about genotypes (Caballero-Ortega et al., 2012). Studies performed in the Northern state of Durango and the Coastal state of Colima have demonstrated I, II, III, recombinant and atypical strains in animals (Alvarado-Esquível et al., 2011; Dubey et al., 2009;

Table 1
Multiplex multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from newborns in Mexico

Pair	Source	Mother/ newborn or both	Age (years) or gestational age at birth (weeks)/age at diagnosis (days)	Location of infection	Severity of infection	PCR (+/-)	Tachyzoites/ mL blood	Genotyping result of sample/isolate by genetic marker:										PCR-RFLP genotype	ToxoDB PCR-RFLP genotype number	Geographic location of alleles in cases of CT		
								SAG1	Alt	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1				Apico	
1	CC	M1 N1	27y 37w/65d			+/- +													I,III		nr	
2	CC	M2 N2	20y 38w/28d	Dis	M/S	+/- +	4860 9902		I I	II III	III III	III II	III III	III I	III III			I,II,III I,II,III		#New (this study)	nr nr	
3	CC	M3 N3	19y 37w/67d	NO	M/S	+ +	40,929 6903			I I								III I,II		#112 or #142	Br nr	
4	CC	M4 N4	/30d	Dis	M/S	+ +	25,00,000 23,000	I I	I I	I I	I I	I I	I I	I I	I I			I I		#10	nr nr	
5	CC	M5 N5	18y 24w/0d	Dis	M/S	- +		1172	I**	I + II	II	II	I + II	II	II	II	II	I + II	Mixed		#New (this study)	nr
6	PtS	M6 N6	30y 37w/26d	Dis	M/S	+ +	21,052 18,354											I + II	Mixed		nr	
7	PtS	M7 N7	17y 39w/10d	NE	Mi	+ +	16,430 12,437			I II								I II			Br, Mex, Tun Tun, Pol, Ser	
8	PrS	M8 N8	38y 37w/278d		Mi	+ +/-	19,468 8256			I	I		II					I I,II		#New (this study)	nr	
9	PrS	M9 N9	40w/0d	NE	Mi	+ +	***		I****	I + III	I	I	I					I	Mixed		#10 or #27, #225 (SAG3)	nr
Total				18		14	13	3	5	12	6	5	4	5	4	3	7					
Frequency (%)				100		78	72	17	28	67	33	28	22	28	22	17	39					

CC: Clinical Case; PtS: Postnatal Screening program; PrS: Prenatal Screening program; M: Mother; N: Newborn; y: years; w: weeks; d: days; Dis: Disseminated; NO: Neuro-ophthalmic; NE: Neurologic; M/S: Moderate/Severe; Mi: Mild; +/-: results were in the cut off in the presence/absence test by qPCR.

* *T. gondii* genotyping was determined from tachyzoites isolated from mice infected with blood from newborn 2.

** All molecular results were obtained from cord blood of newborn 5.

*** Parasitic load of 500000 tachyzoites/mL was detected in the spleen of a mouse infected with amniotic fluid from newborn 9.

**** All molecular results were obtained from spleen of mouse inoculated with amniotic fluid from newborn 9; Br: Brazil; Mex: Mexico; Tun: Tunisia; Ser: Serbia; Pol: Poland; nr: not reported.

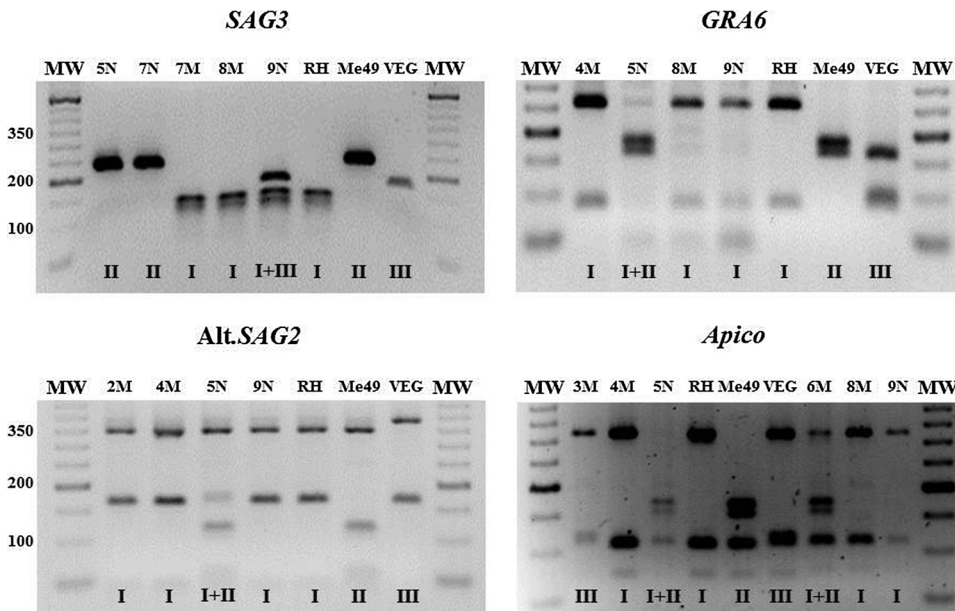


Fig. 1. Examples of mixed infections of *Toxoplasma gondii* from nine human congenital infections in Alt. SAG2, SAG3, GRA6 and Apico genetic markers by PCR-RFLP. MW: Molecular weight marker of 50 bp; #: Pair number (Table 1); M: Mother; N: Newborn; Mixed infections were composed of a combination of I + II or I + III types.

2013; Rico-Torres et al., 2015; Martínez-Flores et al., 2017) while in the Valley of Mexico, Dubey et al. (2004, 2009) found the only clonal genotype (type III, ToxoDB #2) described until now in Central Mexico. In apparent contradiction, we have documented that type I related strains prevail in this region, i.e. three congenital cases due to type I or type I-related strains and type I alleles at GRA6, Alt. SAG2 and SAG3 (including case nine of the present work) and two suddenly death squirrel monkeys (Cedillo-Peláez et al., 2011; Rico-Torres et al., 2012). This is supported by the results of the present study, where most alleles were type I, followed by type II and then type III. In fact, the clonal strain was type I, the second described in Mexico, besides the clonal type III described in chickens (Dubey et al., 2009). To our knowledge this is the second time a clonal strain type I is genotyped from

congenital cases in the world, after that documented in Colombia (Gallego et al., 2004).

Although there are reports on mixed infections in humans, they are quite rare, especially in the congenital form; to our knowledge, only eleven cases have been reported: 6/19 in the United Kingdom, 1/27 in Brazil, 1/6 in Colombia and 3/14 in Tunisia, one of them triple (Aspinall et al., 2003; Gallego et al., 2006; Boughattas et al., 2010; Carneiro et al., 2013). In comparison, we found a quite high rate (5/9) of mixed infections in congenital toxoplasmosis. It must be stressed that we genotyped clinical samples directly in most cases, and that two of them gave clear results of the ten loci.

It is possible that the mother had a mixed infection and transmitted only one strain to her newborn. There is evidence of such a

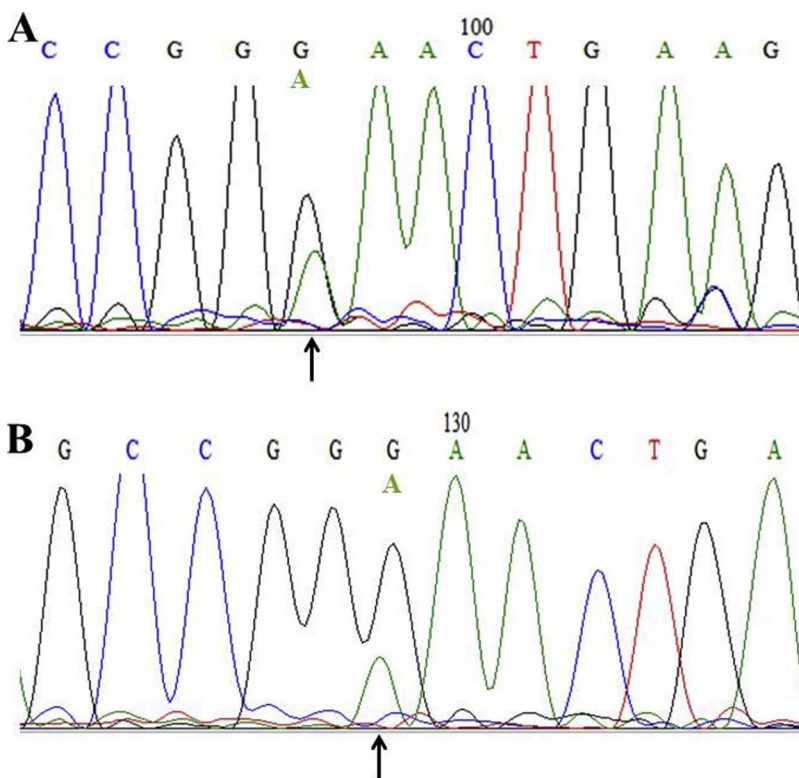


Fig. 2. Sequencing results of SAG3 mixed infection in sample from newborn 9 (black arrows), peaks corresponding to polymorphism type I (black, G) and type III (green, A) of sequences forward (A) and reverse (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

phenomenon in wild boars: a mother infected with at least two strains (I + III) transmitted the mixed infection to two of the fetuses but only one to the third (Calero-Bernal et al., 2013). Another explanation is that only one of the strains could grow in mice. We do not think babies of pairs two and seven acquired toxoplasmosis after birth, because they were diagnosed at day 10 and 28 of age, and the latter had clinical problems during pregnancy. In newborns N1, N3 and N8 that were confirmed at 65, 67 and 278 days after birth, high IgG avidity antibodies and clinical signs even prior birth strongly supported that they had congenital infection as well.

Factors that may determine the severity of congenital infection include the time of vertical transmission during pregnancy and the parasite burden (Romand et al., 2004; Rico-Torres et al., 2016). In the present study, neither of these factors seemed related to pathogeny, although the number of cases was low to analyze these parameters, most received treatment (pre-, postnatally or both) and all had clinical problems, even before birth, which is an alert about the frequency and malignancy of this infection in Mexico. For the same reasons, it was not possible to associate the genotype with the location or severity of the disease. Nevertheless, mixed and type I variants (including the second clonal I reported for congenital cases) were current findings among our patients.

It was quite surprising to find such a great diversity of *T. gondii* in cases of congenital toxoplasmosis in the Mexico City metropolitan area, one of the largest of the world. The reason may include the origin of the food ingested by this large urban population, which is hard to follow, and the large number of feral cats roaming free. The presence of mixed infections augments the preoccupation about these risk factors, especially because they can be related to increased pathology and hence to clinical outcome.

5. Conclusions

We found a great diversity of *T. gondii* genotypes among children with congenital toxoplasmosis acquired in the mega-metropolis of the Valley of Mexico, including mixed infections, new genotypes and predominance of type I alleles.

Conflict of interest

None.

Funding

This work was partially supported by government sources (project 060/2011) and grant 139721 from CONACyT, México.

Ethical approval

The project was approved by the Committees of Research and of Human Research Ethics, which compose de “IRB” of INP, officially registered at the Office for Human Research Protection of the NIH (<http://ohrp.cit.nih.gov/search/search.aspx>) with numbers IRB00008064 and IRB00008065. It was also approved by the Committee of Laboratory Animal Care and Use. Number of approval of the project is 060/2011. Approval letter is available if requested. Both INPer and Gea González also approved the project (numbers 212250-02231 and 21–26-2013, respectively). Mothers of all cases signed an informed consent.

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. Chunlei Su for the info on ToxoDB genotypes provided. Also, to Dr. Diana Barrios-Bautista, Dr. Christian Bonilla-Ríos, and Rafael Lopez-Reboseño for invaluable clinical guidance and/or technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.008>.

References

- Alvarado-Esquivel, C., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Choudhary, S., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Villena, I., Dubey, J.P., 2011. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango Mexico. *J. Parasitol.* 97, 809–812. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2844.1>.
- Aspinall, T.V., Guy, E.C., Roberts, K.E., Joynton, D.H.M., Hyde, J.E., Sims, P.F.G., 2003. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int. J. Parasitol.* 33, 97–103. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00230-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00230-8).
- Baquero-Artigao, F., del Castillo-Martín, F., Fuentes-Corripio, I., Goncá-Mellgren, A., Fortuny-Guasch, C., de la Calle Fernández-Miranda, M., Fernández-Miranda, M., González-Tome, M.L., Couceiro Gianzo, J.A., Neth, O., Ramos Amador, J.T., 2013. Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita. *An. Pediatr.* 79 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.12.001>. 116. e1–116. e16.
- Boughattas, S., Ben-Abdallah, R., Siala, E., Souissi, O., Aoun, K., Bouratbine, A., 2010. Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 1041–1046. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0691>.
- Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F.J., Conde-Glez, C.J., Cedillo-Peláez, C., Vargas-Villavicencio, J.A., Luna-Pastén, H., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L.B., Correa, D., 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 national health surveys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 653–659. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.08.004>.
- Calero-Bernal, R., Gó Mez-Gordo, L., Saugar, J.M., Frontera, E., Pérez-Martín, J.E., Reina, D., Serrano, F.J., Fuentes, L., 2013. Congenital toxoplasmosis in wild boar (*Sus scrofa*) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. *J. Wildl. Dis.* 49, 1019–1023. <http://dx.doi.org/10.7589/2013-01-024>.
- Carneiro, A.C.A.V., Andrade, G.M., Costa, J.G.L., Pinheiro, B.V., Vasconcelos-Santos, D.V., Ferreira, A.M., Su, C., Nélio Januário, José, Vitor, R.W.A., 2013. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 51, 901–907. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02502-12>.
- Cedillo-Peláez, C., Rico-Torres, C.P., Salas-Garrido, C.G., Correa, D., 2011. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Vet. Parasitol.* 180, 368–371. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.012>.
- Cortes, J.A., Gómez, J.E., Silva, P.I., Arévalo, L., Rodríguez, I.A., Álvarez, M.I., Gómez, P.I., 2017. Clinical practice guideline. Integral Care Guidelines for the prevention, early detection and treatment of pregnancy, childbirth and puerperium complications: section on toxoplasmosis in pregnancy. *Infectio* 21, 102–106. <http://dx.doi.org/10.22354/in.v21i2.654>.
- Dubey, J.P., Morales, E.S., Lehmann, T., 2004. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J. Parasitol.* 90, 411–413. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-194R>.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., González-Herrera, A., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Su, C., 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango. Mexico. *J. Parasitol.* 95, 319–322. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1874.1>.
- Dubey, J.P., Alvarado-Esquivel, C., Herrera-Valenzuela, V.H., Ortiz-Diaz, J.J., Oliveira, S., Verma, S.K., Choudhary, S., Kwok, O.C.H., Su, C., 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. *Vet. Parasitol.* 197, 674–677. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.005>.
- Gallego, C., Castaño, J.C., Giraldo, A., Ajzenberg, D., Dardé Gómez, J.E., 2004. Molecular and biological characterization of the CIBMUQ/HDC strain: a reference strain for Colombian *Toxoplasma gondii*. *Biomedica* 24, 282–290.
- Gallego, C., Saavedra-Matiz, C., Gómez-Marín, J.E., 2006. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Trop.* 97, 161–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.10.001>.
- Khan, A., Fux, B., Su, C., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14872–14877. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702356104>.
- Markovic, M., Iovovic, V., Stajner, T., Djokic, V., Klun, I., Bobic, B., Nikolic, A., Djurkovic-Djakovic, O., 2014. Evidence for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in selected intermediate hosts in Serbia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 173–179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2014.03.001>.
- Martín-Hernández, I., 2004. Toxoplasmosis congénita: una mirada al problema. *Rev. Biomed.* 15, 181–190.
- Martínez-Flores, W.A., Palma-García, M., Caballero-Ortega, H., Del Viento-Camacho, A., López-Escamilla, E., Martínez-Hernández, F., Vinuesa, P., Correa, D., Maravilla, P., 2017. Genotyping of *Toxoplasma gondii* with the B1 gene in naturally infected sheep from an endemic region in the Pacific coast of Mexico. *Vector Borne and Zoonotic Dis.* 17, 495–502. <http://dx.doi.org/10.1089/vzb.2016.2085>.
- Nowakowska, D., Colón, I., Remington, J.S., Grigg, M., Golab, E., Wilczynski, J., Sibley, L.D., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital

- toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1382–1389. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.4.1382-1389.2006>.
- Rajendran, C., Su, C., Dubey, J.P., 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect. Genet. Evol.* 12, 359–368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.010>.
- Rico-Torres, C.P., Figueroa-Damián, R., López-Candiani, C., Macías-Avilés, H.A., Cedillo-Peláez, C., Cañedo-Solares, I., Luna-Pastén, H., Tecuati-Herrada, B.L., Correa, D., 2012. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 411–413. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e318241f564>.
- Rico-Torres, C.P., Del Viento-Camacho, A., Caballero-Ortega, H., Besné-Mérida, A., Luna-Pastén, H., Correa, D., Palma-García, J.M., 2015. First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: tissue distribution and genetic characterization. *Vet. Parasitol.* 209, 125–128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.004>.
- Rico-Torres, C.P., Vargas-Villavicencio, J.A., Correa, D., 2016. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1079–1088. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2656-2>.
- Romand, S., Chosson, M., Franck, J., Wallon, M., Kieffer, F., Kaiser, K., Dumon, H., Peyron, F., Thulliez, P., Picot, S., 2004. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 797–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2003.09.039>.
- Shwab, E., Zhu, X., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013001844>.
- Su, C., Schwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009991065>.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5844–5849. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203190109>.
- Vela-Amieva, M., Cañedo-Solares, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Pérez-Andrade, M., González-Contreras, C., Ortiz-Cortés, J., Ortega-Velázquez, V., Galván-Ramírez, M.D.L.L., Ruiz-García, M., Saltigeral-Simentel, P., Ordaz-Favila, J.C., Sánchez, C., Correa, D., 2005. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 142–144.
- Wang, L., Cheng, H.W., Huang, K.Q., Xu, Y.H., Li, Y.N., Du, J., Yu, L., Luo, Q.L., Wei, W., Jiang, L., Shen, J.L., 2013. *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity. *Parasit. Vectors* 6, 273. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-273>.
- Weiss, L.M., Kim, K., 2013. *Toxoplasma Gondii*, Second Edition: The Model Apicomplexan-Perspectives and Methods. Academic Press Amsterdam.
- Wilson, C., Nizet, V.A., Maldonado, Y., Remington, J., O.Klein, J., 2016. *Toxoplasmosis*. Remington and Kleiñs. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, eighth edition. Elsevier Sanders, pp. 949–1042.

De: Int J Parasitol <em@editorialmanager.com>
Para: Heriberto Caballero-Ortega <hcaballero_2000@yahoo.com.mx>
Enviado: viernes, 8 de noviembre de 2019 20:01:43 GMT-6
Asunto: IJPara19_283R1

CC: jan.slapeta@sydney.edu.au, editor@ijp.org.au

Ms. Ref. No.: IJPara19_283R1

Title: Stray dogs in the tropical state of Chiapas, Mexico harbour atypical and novel genotypes of *Toxoplasma gondii*
International Journal for Parasitology

Dear Dr. Caballero-Ortega,

I am pleased to confirm that your paper "Stray dogs in the tropical state of Chiapas, Mexico harbour atypical and novel genotypes of *Toxoplasma gondii*" has been accepted for publication in the International Journal for Parasitology.

For every issue of the IJP the Editor will endeavour to feature an image on the cover from, or relating to, an article in that issue. We invite all authors to submit images that would be suitable. To maximize their aesthetic qualities, these images may be stylized/modified versions of pictures or diagrams from the author's article.

The Editor will choose the image that is the most eye-catching and informative for each issue and complements those chosen for recent issues.

Thank you for submitting your work to this journal.

Yours sincerely,

Jan Slapeta
Deputy Editor
International Journal for Parasitology

For further editorial assistance, please contact the International Journal for Parasitology E-mail: editor@IJP.org.au.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ijpara/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

1 **Stray dogs in the tropical state of Chiapas, Mexico, harbour atypical and novel**
2 **genotypes of *Toxoplasma gondii***

3
4 Luis Fernando Valenzuela-Moreno^{a,b}, Claudia Patricia Rico-Torres^a, Carlos Cedillo-
5 Peláez^a, Héctor Luna-Pastén^a, Sara Teresa Méndez-Cruz^c, María Eréndira Reyes-García^d,
6 Dolores Correa^a, Bruna Farias Alves^e, Hilda Fátima Jesus Pena^{e,*}, Heriberto Caballero-
7 Ortega^{a,*}

8 ^a*Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes*
9 *Sur 3700-C, Colonia Insurgentes-Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530 Ciudad de*
10 *México, México.*

11 ^b*PhD student, Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal,*
12 *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México,*
13 *Av. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N Delegación Coyoacán, C.P. 04510 Ciudad*
14 *Universitaria, Ciudad de México, México.*

15 ^c*Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur*
16 *3700-C, Colonia Insurgentes-Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530 Ciudad de*
17 *México, México.*

18 ^d*Laboratorio de Biotecnología de Pequeños Rumiantes y Patología, FMVZ-UNACH, Tuxtla*
19 *Gutiérrez, Chiapas.*

20 ^e*Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e*
21 *Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São*
22 *Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil.*

23
24 *Corresponding authors.

25 Heriberto Caballero-Ortega, DVM, MSc, Insurgentes Sur 3700C, Col. Insurgentes
26 Cuicuilco, Ciudad de México, C.P. 04530, México. Tel.: +52 55 1084 0900 x 1860, 1873.

27 *E-mail address:* hcaballero_2000@yahoo.com.mx

28

29 Hilda Fátima Jesus Pena, DVM, PhD, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade

30 Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo – SP/ Brasil, CEP 05508-270.

31 Fax: +55 11 3091 7928. *E-mail address:* hfpena@usp.br

32

33 **Abstract**

34 Genotyping of *Toxoplasma gondii* remains a relevant topic of study, since genotypes can
35 be related to the presentation and severity of toxoplasmosis. To date, 292 restriction
36 fragment length polymorphism genotypes have been described around the world.
37 Serosurveys in southeastern Mexico have documented exposure in over 70% of people
38 and certain animals. Recently, we have described new genotypes and mixed infections in
39 feral cats from Quintana Roo. Thus, the aim of this study was to genotype *T. gondii* and to
40 describe its genetic variability, from naturally infected stray dogs of Chiapas, which has
41 different geographical and climatic conditions from those found at the Yucatan Peninsula
42 and the other parts of the country. Eleven stray dogs were captured and bled to obtain
43 DNA, and then they were euthanized to perform necropsies and to collect target tissues.
44 Diagnosis of *T. gondii* was done by quantitative real-time PCR and endpoint PCR.
45 Genotyping was carried out, amplifying 12 polymorphic markers and 15 microsatellites.
46 Atypical SAG3 gene products were cloned and sequenced. All blood samples of dogs
47 were positive to *T. gondii* DNA by PCR. Two isolates were obtained from pooled heart and
48 diaphragm tissue of two dogs. Two complete PCR-RFLP genotypes were identified (type
49 BrIII and #28). Four animals had mixed infections. A new RFLP atypical allele for the
50 SAG3 marker was observed; cloning and sequencing analysis of this locus revealed mixed
51 infection by a strain identical to GT1, and one type I × II intragenic recombinant. The
52 microsatellite analysis revealed that both isolates are atypical. Thus, atypical new
53 genotypes of *T. gondii* and mixed infections were found in dogs of Chiapas. The results
54 found here and in genotyping studies in México suggest that the southeastern region
55 favours wide genetic diversity of *T. gondii* and the possible presence of virulent genotypes
56 such as those found in central and South America.

57 **Keywords:** Atypical strains; Diversity; Genotyping; México; Microsatellites; Mixed
58 infections; Mongrel dogs; Toxoplasmosis

59 **1. Introduction**

60 Infections by *Toxoplasma gondii* are widely prevalent in birds, as well as in
61 terrestrial and marine mammals, including humans, on all continents, with approximately
62 one-third of the global human population infected (Tenter et al., 2000). Nowadays, it is
63 known that the genetic diversity of *T. gondii* is wide, i.e. with the use of 10 polymorphic
64 markers by PCR-RFLP, at least 292 genotypes have been demonstrated worldwide,
65 distributed in 16 haplogroups (Lorenzi et al., 2016; Su et al., 2019). Atypical strains have
66 sometimes been associated with severe outcomes; thus, the identification of these strains
67 is of clinical and epidemiological importance (Ajzenberg et al., 2010). A large majority of
68 unique strains have been identified by studies in wildlife and feral animals, mainly in
69 central and South America, where the diversity of these host species is high (Wendte et al.,
70 2011; Rajendran et al., 2012; Vitaliano et al., 2014). Unlike Canada and the United States,
71 descriptions of *T. gondii* genotypes in northern and central Mexico have shown the
72 presence of recombinant and atypical strains together with the classic types I and III
73 (Dubey et al., 2009; Rico-Torres et al., 2015, 2018). An interesting region for the study of
74 the *T. gondii* genetic diversity is the Mexican southeast. Its climatic characteristics and the
75 presence of wild and feral definitive hosts perpetuate the presence of the parasite (Dubey,
76 2010). Previously, we reported a high genetic diversity of *T. gondii* in feral cats from
77 Quintana Roo, where up to 23 different genotypes were found, 18 of them new
78 (Valenzuela-Moreno et al., 2019). Chiapas is a state with more than 70% *T. gondii*
79 seroprevalence in humans and with climatic conditions similar to those of Quintana Roo
80 (Caballero-Ortega et al., 2012). Therefore, to determine if there are new genotypes as
81 previously found in the Yucatan Peninsula, we typed *T. gondii* from stray dogs from
82 Chiapas; they serve as sentinels for human or livestock exposure due to their custom of
83 feeding from dumpsters, i.e., they can become infected with the parasite by eating meat
84 and raw viscera contaminated with tissue cysts or by eating vegetables and fruits with

85 oocysts. Chiapas, being a state with a tropical climate and with rain for most of the year,
86 favours the viability and dispersion of oocysts; therefore, the water that stray dogs drink
87 from puddles could be contaminated with cat faeces. In addition, they occasionally hunt
88 small synanthropic animals (National Research Council (US) Committee on Animals as
89 Monitors of Environmental Hazards, 1991; Ortega-Pacheco et al., 2017). Dogs also
90 maintain close contact with humans and could be exposed to the same genotypes that
91 infect them.

92

93 **2. Materials and methods**

94 *2.1. Ethical considerations*

95 This study was approved by the research committees of the Instituto Nacional de
96 Pediatría of the Ministry of Health of México (IRB:00008064 and IRB:00008065), which
97 includes the Research and Animal Care Committee (protocol number 2012/013).

98

99 *2.2. Tissue samples from stray dogs*

100 Blood and tissue samples analysed in the present study came from stray dogs that
101 lived in the city of Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. The body condition was evaluated according
102 to the Purina® Body Condition Tool (<http://www.purina.co.uk>), which ranges from 1 to 5, 3
103 being the ideal score. Samples were collected in collaboration with the Biotechnology
104 Laboratory of Small Ruminants and Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine,
105 National Autonomous University of Chiapas (UNACH), México. The stray dogs were
106 tranquilized with xylazine and then 6 ml of whole blood were obtained from the jugular vein
107 for DNA extraction. After that, the animals were euthanized with intravenous overdose of
108 sodium pentobarbital (133 mg/kg, Dolethal®, Vetoquinol, France), according to the
109 Mexican Official Standard NOM-033-ZOO-1995. Necropsies were carried out following the
110 methodology described by Schuneman and Constantino (2012) and samples from heart,

111 lung, liver, spleen, skeletal striated muscle (diaphragm and right gracilis) and brain were
112 used to attempt isolation of the parasite by bioassay in mice.

113

114 *2.3. Isolation in mice*

115 Parasite isolation was accomplished as previously described (Rico-Torres et al.,
116 2015). We followed the NOM-062-ZOO-1999 guidelines for the handling and care of the
117 mice used here. Briefly, the brain and pooled heart and diaphragm tissue from each dog
118 were manually macerated in a mortar in sterile PBS with 10,000 IU/mL of penicillin G; then
119 the homogenate (0.5 mL) was used to inoculate intraperitoneally two BALB/c mice per
120 sample. All inoculated mice were examined every day for 45 days, looking for signs of *T.*
121 *gondii* infection. Animals with severe signs of illness were euthanized and imprints of lung
122 and brain were observed under a compound microscope searching for tachyzoites or
123 tissue cysts. One week post inoculation, peritoneal lavages were made with sterile PBS to
124 obtain tachyzoites. The surviving mice were euthanized 45 days after inoculation; they
125 were considered infected if tachyzoites or tissue cysts were detected in their tissues.

126

127 *2.4. DNA extraction*

128 Following the methodology of Brenier-Pinchart et al. (2015), DNA was extracted
129 from the blood buffy coat of the dogs and from peritoneal lavages of mice infected with *T.*
130 *gondii* following the manufacturer's instructions for the Qiagen Gentra® Puregene® Tissue
131 kit, (Hilden, Germany). DNA obtained was quantified in a spectrophotometer (The Thermo
132 Scientific Nanodrop™ 1000, MA, USA) and kept at -20°C until use.

133

134 *2.5. PCRs and genotyping*

135 In order to demonstrate the presence of parasite DNA in the blood samples, real
136 time and endpoint PCR were performed to amplify the SeqRep529 (Tox4-5) and *B1* gene;

137 parasite burden was also determined by standard curves (Homan and Vercammen, 2000;
138 Kompalic-Cristo et al., 2007; Robert-Gangneux et al., 2010; Cedillo-Peláez et al., 2011).
139 The isolates of *T. gondii* obtained from dogs #3 and #11 were tested by endpoint PCR for
140 the SeqRep529 marker. Positive samples to at least one of the molecular assays were
141 included in a multilocus nested PCR to amplify the polymorphic markers *SAG1*, *SAG2* 5' 3',
142 alt. *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1*, *Apico* (Su et al., 2010) and *CS3*
143 (Pena et al., 2008). All PCR assays (real time and endpoint) were carried out with
144 Amplitaq Gold™ (Thermo Fisher Scientific, cat. 4311806, MA, USA). For the *GRA6* marker,
145 we performed an hemi-nested PCR following the methodology used by Valenzuela-
146 Moreno et al. (2019), using the primers described by Fazaeli et al. (2000) and Su et al.
147 (2010). Briefly, F-*GRA6*: 5'- TTTCCGAGCAGGTGACCT-3' and R-*GRA6*: 5'-
148 TACAAGACATAGAGTGCCCC-3' were used as external primers with an annealing
149 temperature of 55°C; the hemi-nested round was performed using the internal primers
150 described by Su et al. (2010). All amplicons were digested with specific restriction
151 enzymes (New England, Biolabs®, USA) according to Pena et al. (2008) and Su et al.
152 (2010). As positive controls, DNA of RH, Me49 and VEG reference strains (type I, II, and
153 III, respectively) were included, and as a negative control, sterile water. In each nested
154 amplification round, additional controls were added to ensure there was no DNA
155 contamination (positive and negative re-amplification controls).

156 For the microsatellite (MS) typing, only the two isolates were analysed following the
157 methodology described by Ajzenberg et al. (2010). The MS markers (*TUB2*, *W35*, *TgM-A*,
158 *B18*, *B17*, *M33*, *IV.1*, *XI.1*, *M48*, *M102*, *N60*, *N82*, *AA*, *N61*, and *N83*) were tested in a
159 single multiplex PCR assay. The first eight MS markers can distinguish clonal genotypes I,
160 II and III, whereas the last seven markers report the genetic fingerprint of *T. gondii*. An
161 automatic sequencer (3500 Genetic Analyzer AB Hitachi, USA) was used for

162 electrophoresis. DNA from the PTG strain (type II) was used as a positive control. The
163 results were analysed with GeneMapper 4.1 software (Applied Biosystems, USA).

164

165 2.6. Cloning and sequencing

166 Samples that yielded atypical RFLP patterns (*SAG3 locus*) were processed as
167 previously described (Valenzuela-Moreno et al., 2019). Briefly, products were amplified
168 again and cut from the agarose gel, purified and cloned into a pJET 1.2/blunt Cloning
169 Vector and used to transform *Escherichia coli* TOP strain using a commercial kit
170 (GeneJET® PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, Cat. K1231, USA). In order to detect
171 PCR-positive colonies for the desired fragment, a PCR assay was performed using F-In-
172 *SAG3*: 5'-TCTTGTCGGGTGTTCACTCA-3' and R-In-*SAG3*: 5'-
173 CACAAGGAGACCGAGAAGGA-3' primers (Su et al., 2010). Plasmids were extracted and
174 purified from the positive colonies with a commercial kit following the manufacturer's
175 instructions (GeneJET® Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific, Cat. K0503, USA) and
176 they were sequenced at the Instituto Nacional de Medicina Genómica, and the Instituto de
177 Biología-UNAM, México; the electropherograms were visualized and analysed with
178 SnapGene viewer® v 4.1.4. The average Phred quality was over 30 in all sequences;
179 when a nucleotide had a low value, it was corroborated with the antisense sequence. To
180 analyse the recombinant intragenic sequence found in TgDogMxChp2b, we carried out a
181 bioinformatic analysis with DNAsp v 5.10 software. We aligned 206 sequences of the
182 *SAG3* gene (224 nucleotides) downloaded from GenBank and ToxoDB.org, and analysed
183 with the tool for detection of recombination sites. From this analysis four recombination
184 events were predicted, i.e., nucleotides 62-86, 86-108, 108-118 and 127-142.

185

186 2.7. Data and material availability

187 Reference strains sequences GT1, TGGT1_308020; Me49, TGME49_308020; VEG,
188 TGVEG_308020 are available at www.toxodb.org. TgDogMxChp2a MK12786 and
189 TgDogMxChp2b MK12787 available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
190 ToxoDB genotypes are available at: [http://web.utk.edu/~csu1/ListToxoDB-PCR-](http://web.utk.edu/~csu1/ListToxoDB-PCR-RFLPgenotypes.html)
191 [RFLPgenotypes.html](http://web.utk.edu/~csu1/ListToxoDB-PCR-RFLPgenotypes.html)

192

193 **3. Results**

194 Eleven stray dogs were captured; their body condition ranged from severe to
195 slightly underweight; externally, some of them had skin diseases (scabies), fleas were
196 present and two dogs had ticks (not identified); all dogs were adults (>3 years old). During
197 necropsy and histopathological analyses, no lesions compatible with acute or chronic *T.*
198 *gondii* infection were found.

199 *3.1. Molecular identification, parasite load and isolations*

200 By PCR, all dogs were positive for at least one molecular test (quantitative real-time
201 PCR -qPCR- or endpoint PCR). Nine of 11 dogs were positive for the SeqRep529 marker
202 using the qPCR test, while for the *B1* gene all dogs were positive. Loads were between
203 <50 and >9400 parasites/mL of blood. Two isolates were obtained from the pooled heart
204 and diaphragm tissue of dog #3 (TgDogMxChp3) and dog #11 (TgDogMxChp11); all *loci*
205 of these isolates were typed by multiplex nested PCR, resulting in genotypes ToxoDB #08
206 (type BrIII) and #28, respectively (Table 1).

207 *3.2. Genotyping of clinical samples*

208 Ten of the DNA samples obtained from blood could be genotyped for at least one
209 genetic marker. The most frequently characterized locus was *c29-2* (7/10 samples),
210 followed by *SAG3* (4/10) and *L358* (3/10). With this last marker, double infections with I +
211 II alleles were detected in TgDogMxChp3 and TgDogMxChp9. Taking this result, we
212 demonstrated that TgDogMxChp3 was infected with at least three genotypes (Table 1 and

213 Fig. 1). Another multiple infection was determined in TgDogMxChp11, since the *GRA6*
214 marker showed alleles I and III in the isolate and in the blood, respectively. Also, a multiple
215 infection in TgDogMxChp2 was found, since the digestion of the amplicon of *SAG3*
216 resulted in one allele type I and one atypical (u-2), which would correspond to a new
217 genotype (Fig. 1). Thus, we cloned and sequenced the product to confirm the atypical
218 pattern. In the bacterial colonies we obtained two alleles; TgDogMxChp2a (MK12786) was
219 identical to GT1 strain sequence. In the second sequence TgDogMxChp2b, the atypical
220 pattern was due to the recombination of type I and type II strains: from one to 81
221 nucleotides was identical to the type II reference strain (Me49, TGME49_308020) and
222 from 82 to 223 was identical to the type I reference strain (GT1, TGGT1_308020); both
223 sequences are available at www.toxodb.org. RFLP patterns of dog 2 (a and b) were
224 confirmed by *in silico* digestion with the Benchling tool (biology software;
225 <http://www.benchling.com>). After a BLAST search in ToxoDB and GenBank™, the
226 TgDogMxChp2b sequence did not show 100% identity and it was also deposited in the
227 latter databank with accession number **MK12787** (Fig. 2). The recombination intragenic
228 event found in the sequence TgDogMxChp2b happened in the first region predicted by
229 DNAsp v 5.10 software (nucleotides 62 to 86).

230 The MS analysis revealed that both isolates are atypical; isolate TgDogMxChp3 is
231 very close to the P89 strain (ToxoDB #08) and, as far as we know, the isolate
232 TgDogMxChp11 corresponds to a new atypical MS genotype, until now exclusive to
233 México (Table 2).

234

235 **4. Discussion**

236 Studies that report the genetic characterization of *T. gondii* in México are gradually
237 increasing. The interest in characterizing this protozoan in the Neotropical zones of México
238 is due to the combined climatic and biological factors that make it possible that the genetic

239 diversity of *T. gondii* is as wide as that reported in several countries of South America. The
240 high frequency of *T. gondii* infection found in this study by ELISA (72.7%; data not shown)
241 is similar to those previously stated in humans (Caballero-Ortega et al., 2012). Thus, our
242 results reflect the strong infective pressure of *T. gondii* in the same urban environment
243 shared by different species, including humans.

244 Although the number of copies of the *B1* gene and SeqRep529 is variable among
245 strains (Costa and Bretagne, 2012), the combined use of these markers allowed the
246 identification of 100% of the positive samples for *T. gondii*. It has also been suggested to
247 use both markers for the diagnosis of *T. gondii*, since it has been reported that some
248 strains may totally or partially lack SeqRep529 sequence (Wahab et al., 2010). In the
249 samples of dogs with a parasitic load <50 tachyzoites / mL of blood, only one or two
250 markers were typed. However, in dogs 1, 3, 4 and 5, despite the fact that more than 3000
251 parasites / mL of blood were quantified, few loci could be typed (Table 1). This
252 phenomenon has already been reported in congenital cases from the valley of México and
253 cats of the Yucatan Peninsula (Rico-Torres et al., 2018; Valenzuela-Moreno et al., 2019).

254 Multiple infections are a phenomenon that we have already reported, both in the
255 centre and in the southeast of the country. Particularly in this last region, previously we
256 found 7/10 cats infected with more than one genotype of *T. gondii* in the blood, which was
257 expected because it is a hyperendemic region, with a tropical climate favourable to the
258 perpetuation of this parasite. In addition, the existence of wild felids infected with *T. gondii*
259 in this area favours the spread of oocysts with different genotypes, which may be the
260 origin of these multiple infections (Rico-Torres et al., 2018; Valenzuela-Moreno et al.,
261 2019).

262 ToxoDB #28 was previously reported in North and South America (USA, Colombia
263 and Brazil) as well as in one cat from Colima, México, suggesting that this genotype is
264 present in tropical regions of America (Shwab et al., 2014; Rico-Torres et al., 2015).

265 ToxoDB #08 (type BrIII) is a recombinant genotype which is widespread in Brazil and
266 supposed to be avirulent in mice, but with variable virulence in other hosts (Pena et al.,
267 2008; Silva et al., 2014; Chiebao et al., 2016; do Nascimento et al., 2017). This is the first
268 known report of ToxoDB #08 in México and the third country (after Brazil and Venezuela)
269 where it has been found (Shwab et al., 2014). The genotype of these isolates is different
270 from those found in Durango (dogs, cats, a pigeon and a cougar), as well as those
271 reported in chickens and a newborn of Central México (Dubey et al., 2004, 2009, 2013;
272 Alvarado-Esquivel et al., 2011; Rico-Torres et al., 2018).

273 A few years ago, finding DNA of the parasite in blood was uncommon, probably
274 because blood was not a target tissue in healthy individuals; this and a previous paper
275 showed that finding DNA of *T. gondii* is quite common in hyper-endemic regions but it
276 goes unnoticed (Valenzuela-Moreno et al., 2019). Nonetheless, as expected, it is difficult
277 to obtain a complete genotype using DNA from blood with chronic infections, as PCR-
278 RFLP markers have diverse sensitivities even with nested PCRs.

279 The sequence of SAG3 that yielded an atypical RFLP pattern (TgDogMxChp2b)
280 was recombinant, due to a cross-over event between type I and II *T. gondii* strains.
281 According to Khan et al. (2005) and Sibley (2009), chromosomal cross-over is quite rare in
282 *T. gondii*. However, Bontell et al. (2009) sequenced a natural recombinant strain obtained
283 from a chicken in Uganda, and concluded that the isolate inherited whole chromosomes
284 from the parental strains II × III through chromosome sorting, although they found regions
285 of type III background with type II single-nucleotide polymorphisms (SNPs), suggesting
286 intra-genic recombination events. To our knowledge, this is the second SAG3 RFLP
287 atypical allele (u-2) found to date, after the one reported by Pena et al. (2013) in which an
288 insertion of 21 nucleotides in the sequence was found, modifying the RFLP pattern (u-1
289 allele).

290 The fast mutation rate of microsatellites makes them good for identification of
291 individual *T. gondii* isolates, and are helpful to differentiate strains which present the same
292 PCR-RFLP genotypes (Dardé et al., 2007). The isolates included in the microsatellite
293 analysis showed two atypical MS genotypes; TgDogMxChp3 was identical for the eight
294 typing markers to the strain P89 (pig; USA), but with a different fingerprint. The second
295 isolate, TgDogMxChp11, had a MS genotype that seems to be unique and to our
296 knowledge this would be a new genotype, confined to México (Su et al., 2012). This is the
297 first known time that microsatellite alleles have been determined in isolates from México
298 (Table 2).

299 In conclusion, these results support the notion that intermediate hosts such as stray
300 animals, as well as wild, feral and domestic felids, are participating in the dissemination
301 and the generation of some genotypes found throughout the Americas (ToxoDB #08 and
302 #28) but that there are new genotypes in México as well. It can be presumed that the
303 genotypes described here are not virulent for the dogs of this region, since none of them
304 had clinical signs of illness compatible with toxoplasmosis. Mixed infections are becoming
305 usual in the country. The results found here and in other parts of México suggest that the
306 southeast is a region with a wide genetic diversity of *T. gondii* and possibly the presence
307 of virulent types such as those found in central and South America.

308

309 **Acknowledgements**

310 This work was partially supported by the Fondo Sectorial de Investigación para la
311 Educación of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT, grant
312 number A1-S-21955) and by grant 2012/013, Programa E022 Investigación y Desarrollo
313 Tecnológico en Salud, from Instituto Nacional de Pediatría, México. The authors thank Dr.
314 Chunlei Su for the information provided on the *T. gondii* genotypes. We thank MSc César

315 Maza Santiago for the logistical support of captured stray dogs and Rafael López-
316 Reboseño for their excellent technical support.
317

318 **References**

- 319 Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.L., 2010. Genotyping of
320 *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR
321 assay. J. Clin. Microbiol. 48, 4641–4645.
- 322 Alvarado-Esquivel, C., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Choudhary, S.,
323 Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Villena, I., Dubey, J.P., 2011. Prevalence
324 of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. J. Parasitol. 97, 809–
325 812.
- 326 Bontell, I., Hall, N., Ashelford, K.E., Dubey, J., Boyle, J.P., Lindh, J., Smith, J.E., 2009.
327 Whole genome sequencing of a natural recombinant *Toxoplasma gondii* strain reveals
328 chromosome sorting and local allelic variants. Genome Biol. 10, R53.
- 329 Brenier-Pinchart, M.-P., Capderou, E., Bertini, R.-L., Bailly, S., Fricker-Hidalgo, H., Varlet-
330 Marie, E., Murat, J.-B., Sterkers, Y., Touafek, F., Bastien, P., Pelloux, H., 2015.
331 Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the detection of
332 circulating *Toxoplasma gondii*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 82, 289–291.
- 333 Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F.J., Conde-Glez, C.J., Cedillo-Pelaez, C., Vargas-
334 Villavicencio, J.A., Luna-Pastén, H., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L.B., Correa, D.,
335 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico:
336 analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. Trans. R. Soc. Trop. Med.
337 Hyg. 106, 653–659.
- 338 Cedillo-Peláez, C., Rico-Torres, C.P., Salas-Garrido, C.G., Correa, D., 2011. Acute
339 toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. Vet. Parasitol. 180,
340 368–371.
- 341 Chiebao, D.P., Pena, H.F.D.J., Cabral, A.D., Rocca, M.P., Lopes, E.G., Valadas, S.Y.O.B.,
342 Keid, L.B., Grisi Filho, J.H.H., Soares, R.M., 2016. Infection of mice with oocysts of
343 *Toxoplasma gondii* by oral route showed differences of virulence from Brazilian RFLP

344 genotypes Brl and BrIII. Res. Vet. Sci. 107, 257–260.

345 Costa, J.M., Bretagne, S., 2012. Variation of *B1* gene and AF146527 repeat element copy
346 numbers according to *Toxoplasma gondii* strains assessed using real-time
347 quantitative PCR. J. Clin. Microbiol. 50, 1452–1454.

348 Dardé, M.L., Ajzenberg, D., Smith, J., 2007. Population structure and epidemiology of
349 *Toxoplasma gondii*, in: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma gondii*, The Model
350 Apicomplexan: Perspectives and Methods. Academic Press, Amsterdam, pp. 49–80.

351 do Nascimento, L.C., Pena, H.F.J., Leite Filho, R.V., Argenta, F.F., Alves, B.F., Oliveira, S.,
352 Gennari, S.M., Driemeier, D., 2017. Rare case of acute toxoplasmosis in a domestic
353 rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Brazil associated with the type BrIII Brazilian clonal
354 lineage of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 116, 2873–2876.

355 Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second Edition. ed. CRC
356 Press, Boca Raton, Florida.

357 Dubey, J.P., Alvarado-Esquivel, C., Herrera-Valenzuela, V.H., Ortiz-Diaz, J.J., Oliveira, S.,
358 Verma, S.K., Choudhary, S., Kwok, O.C.H., Su, C., 2013. A new atypical genotype
359 mouse virulent strain of *Toxoplasma gondii* isolated from the heart of a wild caught
360 puma (*Felis concolor*) from Durango, Mexico. Vet. Parasitol. 97, 809-812.

361 Dubey, J.P., Morales, E.S., Lehmann, T., 2004. Isolation and genotyping of *Toxoplasma*
362 *gondii* from free-ranging chickens from Mexico. J. Parasitol. 90, 411–413.

363 Dubey, J.P., Velmurugan, G. V, Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-
364 Peña, S., Martínez-García, S., González-Herrera, a, Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Su,
365 C., 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. J.
366 Parasitol. 95, 319–322.

367 Fazaeli, A., Carter, P.E., Darde, M.L., Pennington, T.H., 2000. Molecular typing of
368 *Toxoplasma gondii* strains by *GRA6* gene sequence analysis. Int. J. Parasitol. 30,
369 637–642.

370 Homan, W., Vercammen, M., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp
371 DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR.
372 Int. J. Parasitol. 30, 69–75.

373 Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A.J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tang, K.,
374 Paulsen, I.T., Berriman, M., Boothroyd, J.C., Pfefferkorn, E.R., Dubey, J.P., Ajioka,
375 J.W., Roos, D.S., Wootton, J.C., Sibley, L.D., 2005. Composite genome map and
376 recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma*
377 *gondii*. Nucleic Acids Res. 33, 2980–2992.

378 Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suárez-Mutis, M., Fernandes, O., Britto, C., 2007.
379 Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive *B1* gene for the detection
380 of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. Parasitol. Res. 101, 619–625.

381 Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M.S., Namasivayam, S., Swapna, L.S., Hadjithomas, M.,
382 Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B.P., Ajioka, J.W., Ajzenberg, D., Boothroyd,
383 J.C., Boyle, J.P., Dardé, M.L., Diaz-Miranda, M. a., Dubey, J.P., Fritz, H.M., Gennari,
384 S.M., Gregory, B.D., Kim, K., Saeij, J.P.J., Su, C., White, M.W., Zhu, X.-Q., Howe,
385 D.K., Rosenthal, B.M., Grigg, M.E., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J.C., Roos, D.S.,
386 David Sibley, L., 2016. Local admixture of amplified and diversified secreted
387 pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. Nat.
388 Commun. 7, 10147.

389 National Research Council (US) Committee on Animals as Monitors of Environmental
390 Hazards. 1991. Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards. Washington
391 (DC): National Academies Press, US. Available at:
392 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234944/> doi: 10.17226/1351

393 Ortega-Pacheco, A., Guzmán-Marín, E., Acosta-Viana, K.Y., Vado-Solís, I., Jiménez-
394 Delgadillo, B., Cárdenas-Marrufo, M., Pérez-Osorio, C., Puerto-Solís, M., Jiménez-
395 Coello, M., 2017. Serological survey of *Leptospira interrogans*, *Toxoplasma gondii*

396 and *Trypanosoma cruzi* in free roaming domestic dogs and cats from a marginated
397 rural area of Yucatan Mexico. Vet. Med. Sci. 3, 40–47.

398 Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-
399 virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int. J. Parasitol. 38, 561–569.

400 Pena, H.F.J., Vitaliano, S.N., Beltrame, M. a V, Pereira, F.E.L., Gennari, S.M., Soares,
401 R.M., 2013. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito
402 Santo state, Southeast region, Brazil: new genotypes and a new SAG3 marker allele.
403 Vet. Parasitol. 192, 111–117.

404 Rajendran, C., Su, C., Dubey, J.P., 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii*
405 from Central and South America revealed high diversity within and between
406 populations. Infect. Genet. Evol. 12, 359–368.

407 Rico-Torres, C.P., Del Viento-Camacho, A., Caballero-Ortega, H., Besné-Mérida, A.,
408 Luna-Pastén, H., Correa, D., Palma-García, J.M., 2015. First isolation of *Toxoplasma*
409 *gondii* from cats of Colima, Mexico: Tissue distribution and genetic characterization.
410 Vet. Parasitol. 209, 125–128.

411 Rico-Torres, C.P., Valenzuela-Moreno, L.F., Luna-Pastén, H., Figueroa-Damián, R.,
412 Gómez-Toscano, V., Hernández-Delgado, L., Escobedo-Torres, M.P., Correa, D.,
413 2018. High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital
414 toxoplasmosis cases in the mega-metropolis of Central Mexico. Acta Trop. 178, 124–
415 129.

416 Robert-Gangneux, F., Dupretz, P., Yvenou, C., Quinio, D., Poulain, P., Guiguen, C.,
417 Gangneux, J.P., 2010. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of
418 congenital toxoplasmosis. Pediatr. Infect. Dis. J. 29, 33–38.

419 Schuneman, M.A., Constantino, C.F., 2002. Tecnicas de Necropsia en Animales
420 Domésticos. Editorial Manual Moderno, Distrito Federal, México.

421 Shwab, E., Zhu, X., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J., Su, C., 2014.

422 Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus
423 PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 141, 453–461.

424 Sibley, L.D., 2009. Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*
425 39, 915–924.

426 Silva, L.A., Andrade, R.O., Carneiro, A.C.A. V, Vitor, R.W.A., 2014. Overlapping
427 *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in
428 Southeastern Brazil. *PLoS One* 9(2): e90237.

429 Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka,
430 J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma*
431 *gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct
432 ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5844–5849.

433 Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an
434 integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*.
435 *Parasitology* 137, 1–11.

436 Su, R., Dong, H., Li, T., Jiang, Y., Yuan, Z., Su, C., Zhang, L., Yang, Y., 2019. *Toxoplasma*
437 *gondii* in four captive kangaroos (*Macropus* spp.) in China: Isolation of a strain of a
438 new genotype from an eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*). *Int. J. Parasitol.*
439 *Parasites Wildl.* 8, 234–239.

440 Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to
441 humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217–1258.

442 Valenzuela-Moreno, L.F., Rico-Torres, C.P., Cedillo-Peláez, C., Luna-Pastén, H., Méndez-
443 Cruz, S.T., Lara-Martínez, G., Correa, D., Caballero-Ortega, H., 2019. Mixed
444 *Toxoplasma gondii* infection and new genotypes in feral cats of Quintana Roo, México.
445 *Acta Trop.* 193, 199–205.

446 Vitaliano, S.N., Soares, H.S., Minervino, A.H.H., Santos, A.L.Q., Werther, K., Marvulo, M.F.
447 V, Siqueira, D.B., Pena, H.F.J., Soares, R.M., Su, C., Gennari, S.M., 2014. Genetic

448 characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new
449 genotypes. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 276–283.

450 Wahab, T., Edvinsson, B., Palm, D., Lindh, J., 2010. Comparison of the AF146527 and *B1*
451 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma*
452 *gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 591–592.

453 Wendte, J.M., Gibson, A.K., Grigg, M.E., 2011. Population genetics of *Toxoplasma gondii*:
454 new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Vet. Parasitol.* 182, 96–111.

455

456 **Figure legends**

457

458 **Fig. 1.** Representative PCR- restriction fragment length polymorphism patterns of atypical
459 *Toxoplasma gondii* strains and mixed infections in stray dogs' blood from Chiapas, México.

460 (A) PCR for the *SAG3* locus in blood samples and in the isolates obtained from dogs 3

461 and 11 (*). (B) An atypical RFLP pattern and mixed infection was found in dog 2 and is

462 highlighted with a red square; in dog 3, another mixed infection (yellow squares) was

463 demonstrated; RFLP patterns are different in samples from blood and in the isolate

464 obtained from pooled heart and diaphragm tissue. Genotypes are specified at the bottom.

465 MW, molecular weight marker of 100 bp; RH, Me49 and VEG are type I, II and III

466 reference strains respectively; D, dog ID (Table 1).

467

468 **Fig. 2.** Multiple sequence alignment of the *SAG3* locus in blood samples obtained from

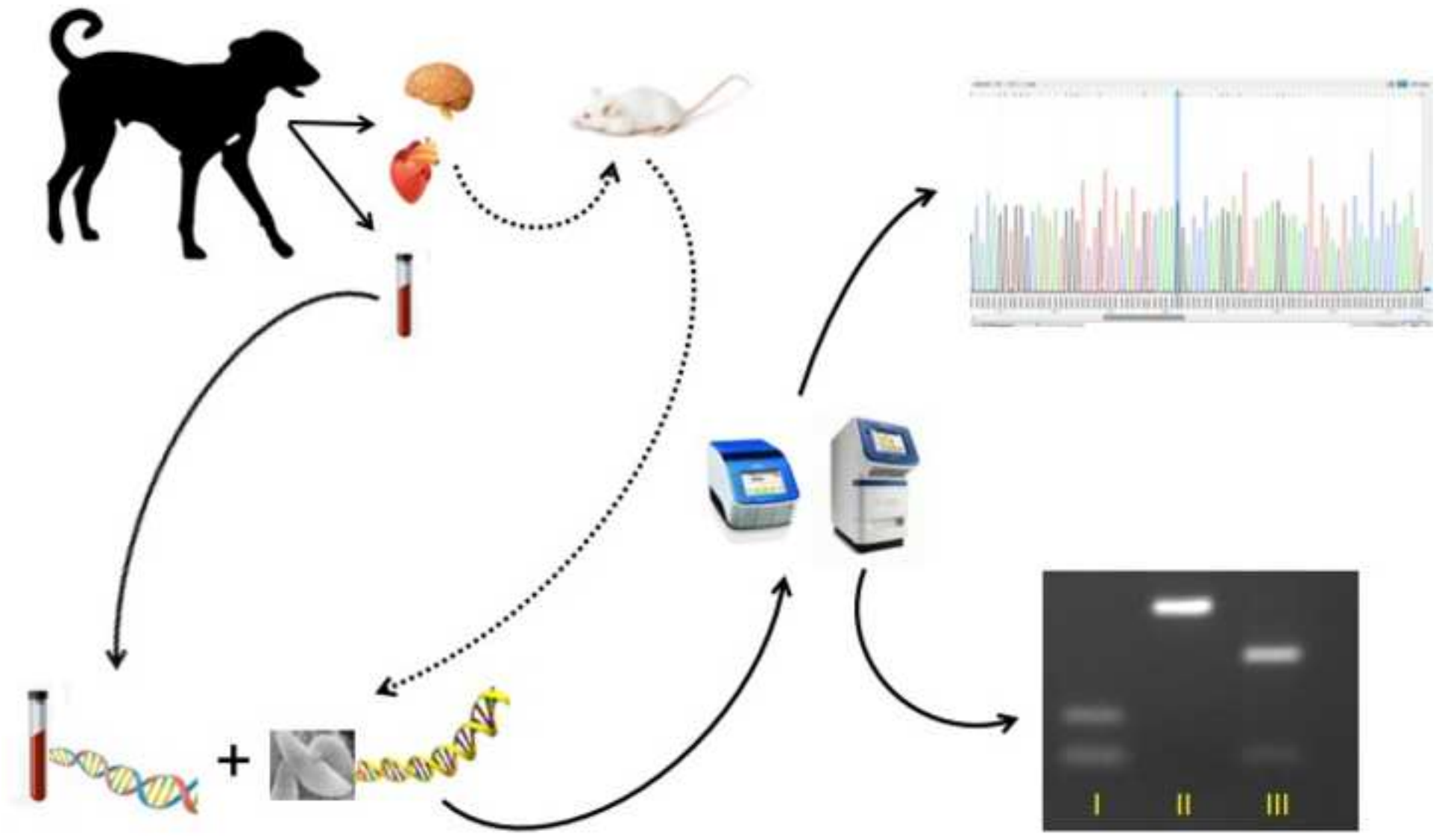
469 stray dogs from Chiapas, México. The two cloned sequences from TgDogMxChp2 (a and

470 b) were aligned with *SAG3* reference strain sequences GT1, Me49 and VEG (types I, II

471 and III, respectively). The alignment was performed with BioEdit® v5.0.6 software and

472 sequences with Gene ID: GT1, TGGT1_308020; Me49, TGME49_308020; VEG,

473 TGVEG_308020 in www.toxodb.org.



- All blood samples from Chiapas dogs were positive for at least one molecular test.
- High frequency of mixed infections was found in four out ten dogs.
- Two isolates of *T. gondii* were obtained from eleven mongrel dogs by bioassay in mice.
- One of the isolates had a unique MS genotype, so far confined to México.
- An atypical RFLP pattern was found in the *SAG3* sequence, due to a crossing-over event between type I and II *T. gondii* strains.

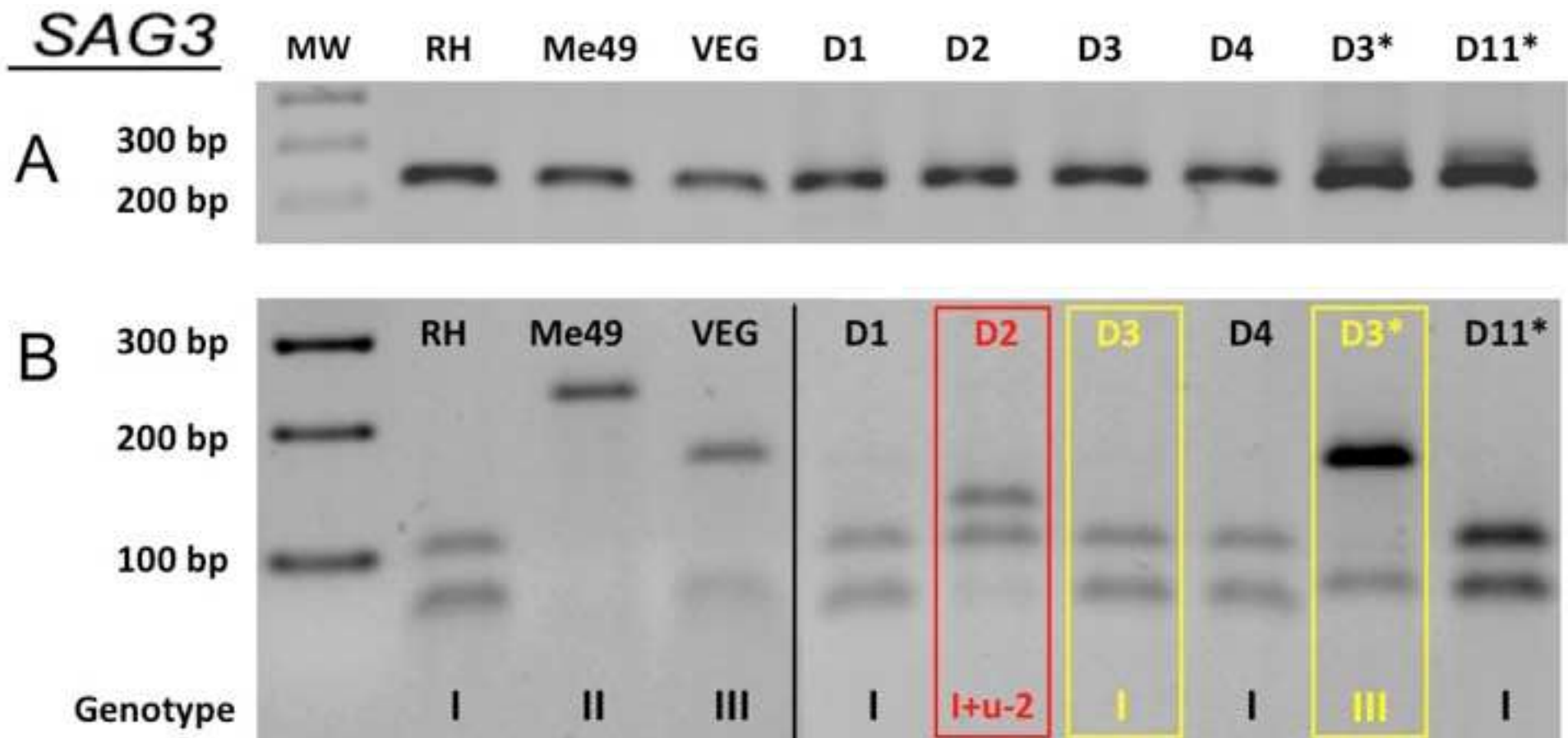


Figure 1

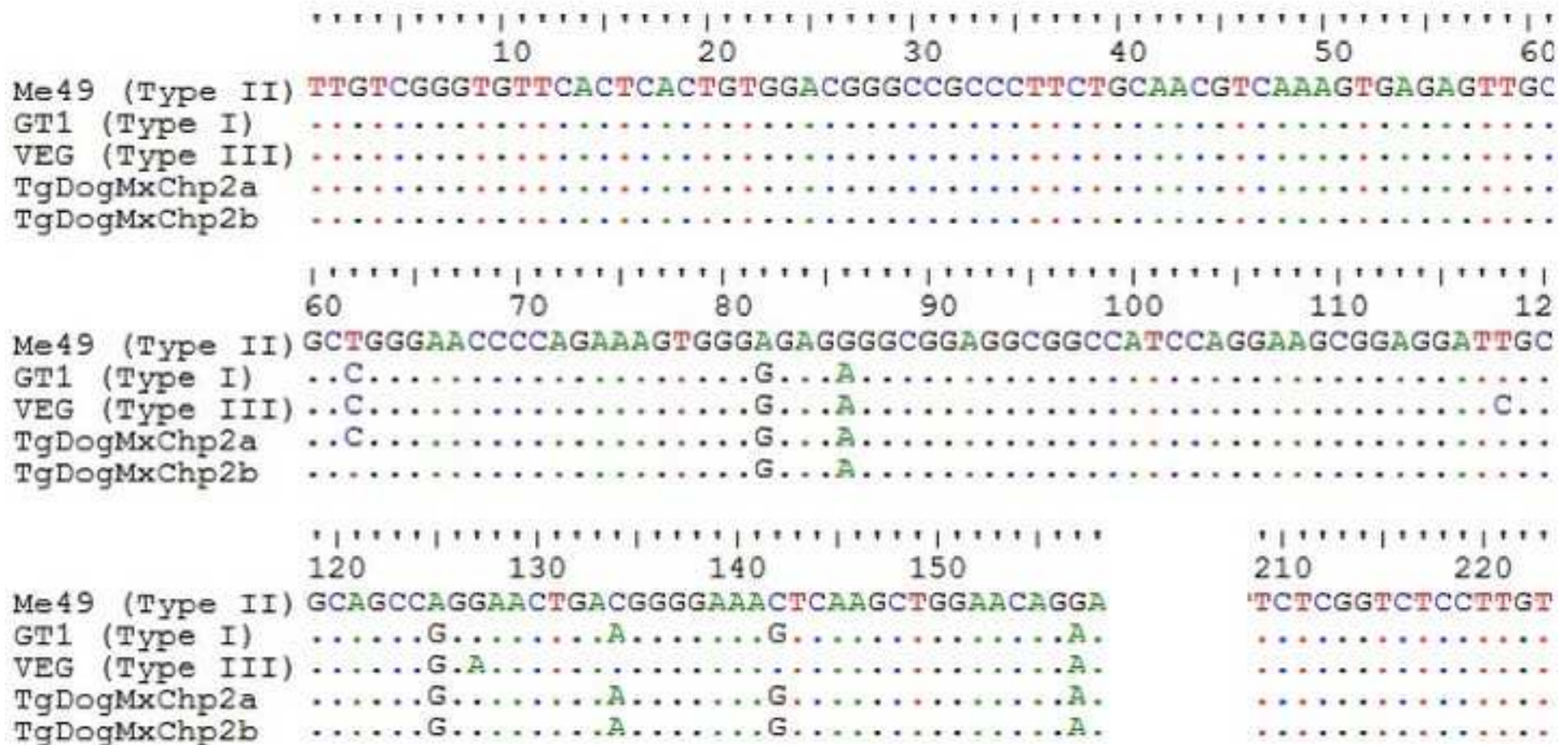


Figure 2